JACQUELINE MAZZUCHELLI DE SOUZA

**MODELAGEM ESTRUTURAL E ANÁLISE *IN SILICO* DA PROTEÍNA E6 DO
GÊNERO *DELTAPAPILLOMAVIRUS***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

São Paulo
2018

JACQUELINE MAZZUCHELLI DE SOUZA

**MODELAGEM ESTRUTURAL E ANÁLISE *IN SILICO* DA PROTEÍNA E6 DO
GÊNERO *DELTAPAPILLOMAVIRUS***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto
Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor em
Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof(a) Dr(a). Rita de Cassia Stocco

Coorientador: Prof(a) Dr(a) Claudia Elisabeth
Thompson

Versão original

São Paulo
2018

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Mazzuchelli de Souza, Jacqueline
Modelagem estrutural e análise In silico da
proteína E6 do gênero Deltapapillomavirus /
Jacqueline Mazzuchelli de Souza; orientador Rita de
Cassia Stocco; coorientador Claudia Elizabeth
Thompson. -- São Paulo, 2018.
170 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Papilomavírs. 2. Deltapapillomavirus. 3.
Proteína E6. 4. Modelagem Molecular. 5. Diagnóstico
viral. I. Stocco, Rita de Cassia , orientador. II.
Elizabeth Thompson, Claudia, coorientador. III.
Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Jacqueline Mazzuchelli de Souza

Título da Tese: Modelagem estrutural e análise *in silico* da proteína E6 do gênero *Deltapapillomavirus*

Orientador: Prof.(a) Dr(a). Rita de Cassia Stocco

Coorientador: Prof.(a) Dr(a) Claudia Elisabeth Thompsom

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a):

Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a):

Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a):

Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a):

Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente:

Assinatura:

Nome:

Instituição:

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB)

Av. Dr. Vital Brasil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brasil

Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505

ceuaib@butantan.gov.br

São Paulo, 21 de março de 2014

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Modelagem estrutural e análise in silico de proteínas early dos papilomavírus bovino", protocolo nº **I-1231/14**, sob a responsabilidade de Rita de Cássia Stocco e Jaqueline Mazzuchelli de Souza, não envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica.

This is to certify that the proposal "Structural modeling and in silico analysis of bovine papillomavirus early proteins", protocol nº **I-1231/14**, under the responsibility of Rita de Cássia Stocco and Jaqueline Mazzuchelli de Souza, has been reviewed by the Institute Butantan Animal Care and Use Committee, and that it does not involve breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata, in scientific research.

Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEUAIB

Comissão de Ética no Uso de Animais

São Paulo, 29 de janeiro de 2018
CEUAx N [5766081117](#)

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Rita De Cássia Stocco

Área: Genética

Equipe envolvida: Jacqueline Mazzuchelli De Souza - [executor](#) (Instituto Butantan / Usp);

Título do projeto: "Diagnóstico viral de lesões de ovinos (*Ovis aries*) por métodos moleculares".

Parecer Consubstanciado da CEUA IB

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto Butantan, na reunião de 18/01/2018, **ANALISOU** e **APROVOU** o protocolo de estudo acima referenciado. A partir desta data, é dever do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.

Jose Ricardo Jensen
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

Maria Leonor Sarno de Oliveira
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

À minha família, em especial ao Miguel e ao Gabriel.

Para Maristela e Joaquim.

AGRADECIMENTOS

A Dra. Rita de Cassia Stocco, pela oportunidade e ensinamentos durante esses longos nove anos. Obrigada por lutar pelo "nosso" laboratório e pelos seus alunos, como jamais visto.

A Dra Claudia Elizabeth Thompsom, pela colaboração, aprendizado, confiança e pelas boas risadas.

Ao Rodrigo Franco de Carvalho, por segurar minha mão desde 2009. Obrigada pelo profissionalismo, pela amizade e parceria.

Ao Rodrigo Araldi, pelas valiosas discussões e por toda ajuda, principalmente na reta final.

As secretárias do Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia, Eliane e Fábيا, pela atenção, confiança, apoio profissional e emocional, desde o mestrado. Sem vocês, isso nunca seria possível.

Ao Diego, por todo auxílio e pelas risadas; Dra Suely, pelo apoio profissional e pessoal, sempre; Thalita, pela pouca, mas importante e leve convivência.

Aos funcionários e técnicos do Laboratório de Genética do Instituto Butantan: Rose, pelo trabalho impecável e pela nossa amizade; Olga, por todas as soluções e boas risadas; Ivone, pela competência imprescindível para o bom funcionamento dos experimentos; Dilce; pela habilidade em nos ajudar nas mais diversas situações.

Ao Dr Willy Beçak, minha admiração e agradecimento por todos os sábios conselhos.

A Dra Roxane Piazza, por dividir comigo seus conhecimentos e seus alunos. Meu muito obrigada aos meus colegas do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan: Thais, Bruna, Ludmila, Dani Luz, Fernando e Bruno. Obrigada pelos experimentos e pelas festas.

Aos amigos de Minas e de São Paulo, obrigada pela torcida e pelas divertidas mensagens. Porque chorar, só se for de tanto rir.

À Ellen Nathalia Thompson e ao Dr Mark Thompson, pela disposição em sempre ajudar. Vocês são uma família excepcional.

À Dra Tania Casado, que me acolheu no Escritório de Desenvolvimento de Carreiras USP (ECar) e me apresentou à Nair Romeu. Nair, obrigada por ser essa profissional maravilhosa e por me ajudar a encontrar caminhos.

Àqueles que não somente dividiram apartamento comigo em um dos momentos mais importantes e difíceis, mas também foram bons amigos. Obrigada Walther, Breno e em especial, Pedro Ivo, por estar comigo do começo ao fim.

À família Saboya, especialmente ao Mathias, à Jeanne e ao Marc. Vocês tornaram a França possível. Meu eterno agradecimento pela ajuda, pelos ensinamentos e momentos inesquecíveis. Merci!

Por fim, àqueles que, perto ou longe, sempre me apoiaram: minha família. Especialmente aos meus tios Geraldo e Solange, minhas irmãs Adriana e Amanda, meu cunhado Jhonatan e meus sobrinhos Miguel e Gabriel. Foram dias de luta para nunca nos esquecermos que, juntos, somos mais fortes.

E, depois de pensar muito em cada proteína se dobrando perfeitamente e nos acontecimentos do final desse processo, se Deus não existe, eu não acredito em mais nada. Obrigada!

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia que permitiu a realização desse trabalho.

À Fundação Butantan pela Bolsa Pesquisa concedida.

Ao Instituto Pasteur pelo apoio financeiro para a realização do Vaccinology Course, em Paris, França.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro concedido, especialmente pela Concessão do Benefício Complementar (processo 2016/09450-7), o qual permitiu minha ida à Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

“Si tu réalises que la vie n'est pas là
Que le matin tu te lèves
Sans savoir où tu vas
Résiste”

France Gall

RESUMO

MAZZUCHELLI-DE-SOUZA, J. **Modelagem estrutural e análise *in silico* da proteína E6 do gênero *Deltapapillomavirus***. 2018 (178 f). Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Papilomavírus (PVs) são vírus amplamente estudados, sendo enfatizada sua capacidade de infectar os tecidos epitelial e mucoso em diversos animais, incluindo humanos, causando lesões benignas que podem, ocasionalmente, resultar em câncer. Dentre os gêneros que infectam animais, os *Deltapapillomavirus* têm uma importância veterinária, ecológica e histórica, pois são capazes de infectar seu hospedeiro natural e outros animais. Por isso, esse trabalho contempla todos os tipos virais pertencentes aos *Delta*-PVs, incluindo sua história. Dentre as proteínas traduzidas pelos PVs, três são consideradas proteínas oncogênicas: E5, E6 e E7. Determinar a estrutura de uma proteína é crucial para a elucidação da sua função, possibilitando aplicações nas áreas de engenharia de proteínas, anotação genômica e desenho racional de fármacos. A estrutura tridimensional da proteína E6 de cada tipo viral pertencente ao gênero *Deltapapillomavirus* foi determinada por modelagem molecular por homologia. A história evolutiva dessas proteínas foi avaliada com base na geração de árvores filogenéticas e suas propriedades físico-químicas foram analisadas. Além disso, devido ao seu alto grau de conservação, a E6 demonstrou ser útil como um marcador molecular. Apesar de serem consideradas raras, foram observadas lesões papilomatosas em carneiros em uma fazenda do estado de São Paulo. Foi realizado o diagnóstico molecular dessas lesões. Os resultados mostraram pela primeira vez no mundo que, apesar de serem ovinos, o agente causador da papilomatose era um papilomavírus bovino, o BPV2, um *Delta*-PV. Logo, além de discutir os *Delta*-PVs, esta tese demonstra na prática a habilidade desse gênero em romper a barreira espécie-específica.

Palavras-chave: Papilomavírus. *Deltapapillomavirus*. Proteína E6. Modelagem Molecular. Diagnóstico viral.

ABSTRACT

MAZZUCHELLI-DE-SOUZA, J. **Structural modelling and in silico analysis of E6 protein of the *Deltapapillomavirus* genus**. 2018. (178 f.). Ph. D. these (Biothecnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Papillomaviruses (PVs) are widely studied viruses, emphasizing their ability to infect the epithelial and mucosal tissues in several animals, including humans, causing benign lesions that may occasionally result in cancer. Among the genera that infect animals, *Deltapapillomaviruses* have a veterinary, ecological and historical importance because they are capable of infecting their natural host and other animals. Therefore, this work contemplates all viral types belonging to the *Delta*-PVs, including their history. Among the proteins translated by the PVs, three of them are considered oncogenic proteins: E5, E6 and E7. Determining the structure of a protein is crucial to the elucidation of its function, allowing applications in the areas of protein engineering, genomic annotation and rational design of drugs. The three-dimensional structure of the E6 protein of each viral type belonging to the genus *Deltapapillomavirus* was determined by molecular modeling by homology. The evolutionary history of these proteins was evaluated based on the generation of phylogenetic trees and their physicochemical properties were analyzed. In addition, due to its high degree of conservation, E6 has been shown to be useful as a molecular marker. Despite being considered rare, papillomas lesions were observed in sheep on a farm in the state of São Paulo. The molecular diagnosis of these lesions was performed. The results showed for the first time in the world that, despite being ovines, the causative agent of papillomatosis was a bovine papillomavirus, BPV2, a *Delta*-PV. Thus, in addition to discussing *Delta*-PVs, this thesis demonstrates in practice the ability of this genre to break the species-specific barrier.

Keywords: Papillomavirus. *Deltapapillomavirus*. E6 protein. Molecular Modelling. Viral diagnosis.

Lista de Ilustrações

Figura 1 - Representação do genoma completo do gênero <i>Deltapapillomavirus</i>	46
Figura 2 - Ângulos de torção (ômega, phi e psi) da cadeia proteica principal.....	63
Figura 3 - Ovinos (<i>Ovis aries</i>) dos quais foram retiradas as lesões cutâneas.....	70
Figura 4 - Ovinos (<i>Ovis aries</i>) dos quais foram retiradas as lesões cutâneas.....	71
Figura 5 - Genoma completo de OaPV1 e 2, traduzido em aminoácidos pelo programa BLASTx e alinhado ao banco de dados.....	75
Figura 6 - Alinhamento do genoma completo dos tipos virais OaPV1 e OaPV2 às proteínas pertencentes à família pfam00518 (E6), pelo programa BLASTx.....	76
Figura 7 - Visualização da estrutura tridimensional da proteína E6 de BPV1.....	81
Figura 8 - Visualização das estruturas tridimensionais das proteínas E6.....	82
Figura 9 - Árvore filogenética das proteínas E6 de <i>Deltapapillomavirus</i> por NJ e p-distance.....	89
Figura 10 - Árvore filogenética das proteínas E6 de <i>Deltapapillomavirus</i> , por NJ e Poisson.....	90
Figura 11 - Árvore filogenética das proteínas E6 de <i>Deltapapillomavirus</i> , por NJ e JTT.....	91
Figura 12 - Árvore filogenética das proteínas E6 de <i>Deltapapillomavirus</i> por Máxima Verossimilhança.....	92
Figura 13 - Alinhamento múltiplo das proteínas E6 dos <i>Bos-Deltapapillomavirus</i>	93
Figura 14 - Árvore filogenética da superfamília E6 gerada por NJ.....	95
Figura 15 - Árvore filogenética das sequências de E6 de do gênero <i>Alphapapillomavirus</i> por NJ.....	96
Figura 16 - Sequência dos genes L1 e E6 BPV2 (GenBank ID MF045490) indicando as regiões amplificadas e obtidas pelo sequenciamento de DNA.....	99

Figura 17 – Análise das estruturas secundárias das proteínas E6 dos <i>Deltapapillomavirus</i>	107
Figura 18 - Comparação entre as árvores filogenéticas geradas por Neighbor-Joining + p-distance e Neighbor-Joining + Poisson, com base nas sequências das proteínas E6.....	108
Figura 19 - Comparação entre as árvores filogenéticas geradas por Neighbor-Joining + p-distance e Neighbor-Joining + JTT, com base nas sequências das proteínas E6.....	109
Figura 20 - Comparação entre as árvores filogenéticas geradas por Neighbor-Joining + p-distance e Máxima Verossimilhança, com base nas sequências das proteínas E6.....	109
Figura 21 - Comparação entre as árvores filogenéticas geradas por Máxima Verossimilhança, com base nas sequências da ORF L1 por Lunardi e colaboradores e das proteínas E6 dos <i>Deltapapillomavirus</i>	110
Figura 22 - Comparação entre as árvores filogenéticas geradas por Máxima Verossimilhança, com base nas sequências da ORF L1 por Zhu e colaboradores e das proteínas E6 dos <i>Deltapapillomavirus</i>	111
Figura 23 - Comparação entre as árvores filogenéticas geradas por Neighbor-Joining, com base nas sequências da ORF L1 por Érdelyi e colaboradores e das proteínas E6 dos <i>Deltapapillomavirus</i>	112
Figura 24 – Comparação entre os tipos virais da vacina Gardasil 9® e aqueles analisados de acordo com a sequência da proteína E6.....	117

Lista de Quadros

Quadro 1 - Genêro dos <i>Papillomavirus</i> , de acordo com o Papillomavirus Episteme (PaVE).....	44
Quadro 2 - Modelo de E6 escolhido para cada tipo viral.....	80

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Estudos envolvendo a proteína E6 de HPV e BPV.....	38
Tabela 2 – Classificação dos Papilomavírus de acordo com a similaridade entre as sequências gênicas de L1.....	43
Tabela 3 – Espécies de Deltapapillomavírus.....	47
Tabela 4 – Diferentes métodos e parâmetros utilizados na análise filogenética das proteínas E6 de <i>Deltapapillomavirus</i>	69
Tabela 5 – Comparação do tamanho das sequências de aminoácidos antes, entre e depois das regiões C-x-x-C conservadas.....	77
Tabela 6 – Determinação do peso molecular e do ponto isoelétrico (pI) das proteínas E6 de cada tipo viral pertencente ao gênero <i>Deltapapillomavirus</i> , pelo programa ProtParam.....	78
Tabela 7 – Dados obtidos após o alinhamento individual das proteínas E6 dos tipos virais pertencentes ao gênero <i>Deltapapillomavirus</i>	79
Tabela 8 – Sequências homólogas à E6 de BPV14 proposta e seus valores de identidade com base nas sequências de aminoácidos.....	93
Tabela 9 – Análise das sequências obtidas	100

Lista de Apêndices

Apêndice 1 - Resultados do gráfico de Ramachandran, gerado pelo programa PROCHECK para o AaPV1.	15050
Apêndice 2 - Resultados do gráfico de Ramachandran, gerado pelo programa PROCHECK para o BgPV1.	151
Apêndice 3 - Resultados do gráfico de Ramachandran, gerado pelo programa PROCHECK para o BPV2.	152
Apêndice 4 - Resultados do gráfico de Ramachandran, gerado pelo programa PROCHECK para o BPV13.	1533
Apêndice 5 - Resultados do gráfico de Ramachandran, gerado pelo programa PROCHECK para o BPV14.	1544
Apêndice 6 - Resultados do gráfico de Ramachandran, gerado pelo programa PROCHECK para o CcaPV1.	1555
Apêndice 7 - Resultados do gráfico de Ramachandran, gerado pelo programa PROCHECK para o CdPV1.	1566
Apêndice 8 - Resultados do gráfico de Ramachandran, gerado pelo programa PROCHECK para o CdPV2.	157
Apêndice 9 - Resultados do gráfico de Ramachandran, gerado pelo programa PROCHECK para o OaPV1.	1588
Apêndice 10 - Resultados do gráfico de Ramachandran, gerado pelo programa PROCHECK para o OaPV2.	1599
Apêndice 11 - Resultados do gráfico de Ramachandran, gerado pelo programa PROCHECK para o OvPV1.	16060
Apêndice 12 - Resultados do gráfico de Ramachandran, gerado pelo programa PROCHECK para o RalPV1.	1611
Apêndice 13 - Resultados do gráfico de Ramachandran, gerado pelo programa PROCHECK para o RtPV1.	162
Apêndice 14 - Análise dos modelos gerados para a proteína E6 do AaPV1 pelo PROCHECK.	1633
Apêndice 15 - Análise dos modelos gerados para a proteína E6 do BgPV1 pelo PROCHECK.	1633
Apêndice 16 - Análise dos modelos gerados para a proteína E6 do BPV2 pelo PROCHECK.	1644
Apêndice 17 - Análise dos modelos gerados para a proteína E6 do BPV13 pelo PROCHECK.	1644
Apêndice 18 - Análise dos modelos gerados para a proteína E6 do BPV14 pelo PROCHECK.	1655

Apêndice 19 - Análise dos modelos gerados para a proteína E6 do CcaPV1 pelo PROCHECK.	1655
Apêndice 20 - Análise dos modelos gerados para a proteína E6 do CdPV1 pelo PROCHECK.	1666
Apêndice 21 - Análise dos modelos gerados para a proteína E6 do CdPV2 pelo PROCHECK.	1666
Apêndice 22 - Análise dos modelos gerados para a proteína E6 do OaPV1 pelo PROCHECK.	1677
Apêndice 23 - Análise dos modelos gerados para a proteína E6 do OaPV2 pelo PROCHECK.	1677
Apêndice 24 - Análise dos modelos gerados para a proteína E6 do OvPV1 pelo PROCHECK.	1688
Apêndice 25 - Análise dos modelos gerados para a proteína E6 do RaIPV1 pelo PROCHECK.	1699
Apêndice 26 - Análise dos modelos gerados para a proteína E6 do RtPV1 pelo PROCHECK.	1699

Lista de Anexos

Anexo 1 - Publicação: Proteína E6 do BPV, análise de sequência e evolução molecular...	1711
Anexo 2 - Publicação: Potencial mutagênico da E6 de BPV1.....	1722
Anexo 3 - Publicação: Revisão sistemática sobre papilomavírus.	1733
Anexo 4 - Publicação: Produção de VLPs para vacinas profiláticas.	1744
Anexo 5 - Artigo submetido para publicação como Rapid Communication: Detecção de BPV2 em ovinos.....	175
Anexo 6 – Certificado de participação em Curso Internacional.....	176
Anexo 7 – Certificado de participação em Evento Científico Internacional.....	177

Lista de Abreviaturas e Siglas

AaPV – *Alces alces papillomavirus*

BLASTp – Protein Basic Local Alignment Search Tool

BPV – papilomavírus bovino ou *Bos taurus papillomavirus*

BgPV1 – *Bos grunniens papillomavirus*

C – Citosina (base nitrogenada) ou Cisteína (aminoácido)

C127 – linhagem celular de glândula mamária de camundongo (ATCC CLR-1804)

CcaPV – *Capreolus capreolus papillomavirus*

CdPV – *Camelus dromedarius papillomavirus*

CRPV – *Cotton rabbit papillomavirus*

C-terminal – carboxiterminal

DDBJ – DNA Data Bank of Japan

Delta-PVs – *Deltapapillomavirus*

DNA – ácido desoxirribonucleico

DPV – *Deer papapillomavirus*

E – proteínas precoces (*early*)

EEPV – European Elk papillomavirus

E6AP – proteína ubiquitina ligase

E. coli – *Escherichia coli*

eIF4E – fator de iniciação da tradução eucariótica 4E

EMBL – European Molecular Biology Laboratory

FcaPVs – *Felis catus papillomavirus*

FcPV – *Fringilla coelebs papillomavirus*

FeSarPV – feline sarcoid-associated papillomavirus

FlPV – *Francolinus leucoscepus papillomavirus*

G – Guanina (base nitrogenada) ou Guanidina (aminoácido)

G1 – *gap 1* ou growth (primeira fase de intervalo do ciclo celular)

G2 – *gap 2* ou growth (segunda fase de intervalo do ciclo celular)

GcPV – *Giraffa camelopardalis papillomavirus*

hTERT – Human telomerase reverse transcriptase

HPV – papilomavírus humano

ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses

ID – *identity* ou identidade

IRF-3 – Interferon regulatory factor 3

Kb – quilobase

kDa – quilodalton

L – proteínas tardias (*late*)

LCR – *long control region*

MAFFT – Multiple Alignment using Fast Fourier Transform - programa de alinhamento múltiplo de sequências

NCBI – National Center for Biotechnology Information

NIH – *National Institute of Health*

NIH 3T3 – linhagem de fibroblastos de embrião de camundongo (ATCC CRL-1658)

OaPV – *Ovis aries papillomavirus*

OPV – antiga sigla de *Ovis aries papillomavirus*

ORF – *open reading frame* (quadro aberto de leitura)

OvPV – *Odocoileus virginianus papillomavirus*

PaVE – Papillomavirus Episteme

pb – pares de base

PB – papilomatose bovina

PDB – Protein Data Bank

PePV – *Psittacus erithacus papillomavirus*

pI – ponto isoelétrico

PRANK – Probabilistic Multiple Alignment Kit

pRb – proteína retinoblastoma

PV – papilomavírus

RF – *reading frame* ou matriz de leitura

RtPV – *Rangifer tarandus papillomavirus*

RaPV – *Rusa alfredi papillomavirus*

S – fase de síntese interfásica do ciclo celular

SfPV – *Sylvilagus floridanus papillomavirus*

VLPs – *virus-like particles* (partículas semelhantes a vírus)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	25
1.1 Objetivo geral	27
1.2 Objetivos específicos	27
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	28
2.1 Características do genoma dos papilomavírus e suas proteínas	29
2.1.1 A proteína E6.....	31
2.2 Infecção pelos papilomavírus	37
2.3 Métodos de detecção viral.....	38
2.4 Classificação dos papilomavírus	39
2.4.1 O gênero <i>Deltapapillomavirus</i>	42
2.4.1.1 Espécies de <i>Deltapapillomavirus</i>	44
2.4.1.1.1 <i>DELTAPAPILOMAVIRUS</i> 4	47
2.4.1.1.1.1 <i>BOS TAURUS PAPILLOMAVIRUS</i> TIPO 1 (BPV1)	47
2.4.1.1.1.2 <i>BOS TAURUS PAPILLOMAVIRUS</i> TIPO 2 (BPV2)	48
2.4.1.1.1.3 <i>BOS TAURUS PAPILLOMAVIRUS</i> TIPO 13 (BPV13)	49
2.4.1.1.1.4 <i>BOS TAURUS PAPILLOMAVIRUS</i> TIPO 14 (BPV14)	49
2.4.1.1.1.5 <i>BOS GRUNNIENS PAPILLOMAVIRUS</i> TIPO 1 (BgPV1)	51
2.4.1.1.2 <i>DELTAPAPILLOMAVIRUS</i> 1	52
2.4.1.1.2.1 <i>ALCES ALCES PAPILLOMAVIRUS</i> TIPO 1 (AaPV1)	52
2.4.1.1.2.2 <i>RANGIFER TARANDUS PAPILLOMAVIRUS</i> TIPO 1 (RTPV1)	52
2.4.1.1.3 <i>DELTAPAPILLOMAVIRUS</i> 2.....	53
2.4.1.1.3.1 <i>ODOCOILEUS VIRGINIANUS PAPILLOMAVIRUS</i> TIPO 1 (OvPV1)...53	
2.4.1.1.4 <i>DELTAPAPILLOMAVIRUS</i> 3	55
2.4.1.1.4.1 <i>OVIS ARIES PAPILLOMAVIRUS</i> TIPOS 1, 2 E 4 (OaPV1, OaPV2 E OaPV4)	55
2.4.1.1.5 <i>DELTAPAPILLOMAVIRUS</i> 5	55
2.4.1.1.5.1 <i>CAPREOLUS CAPREOLUS PAPILLOMAVIRUS</i> TIPO 1 (CcaPV1)56	
2.4.1.1.5.2 <i>RUSA ALFREDI PAPILLOMAVIRUS</i> TIPO 1 (RalPV1)	56
2.4.1.1.6 <i>DELTAPAPILLOMAVIRUS</i> 6 (OU SUPOSTO DELTA-6)	56
2.4.1.1.7 SUPOSTOS TIPOS DE <i>DELTAPAPILLOMAVIRUS</i>	57
2.5 Bioinformática	58
3 MATERIAL E MÉTODOS	63

3.1 Modelagem molecular comparativa	64
3.1.1 Identificação de sequências de E6 de Deltapapillomavirus	64
3.1.2 Identificação da proteína molde	64
3.1.3 Alinhamentos individuais de sequências de E6 de Deltapapillomavirus.....	65
3.1.4 Construção dos moldes de E6 de Deltapapillomavirus	65
3.1.5 Validação dos modelos de E6 de Deltapapillomavirus	65
3.1.6 Topologia e estrutura bidimensional dos modelos de E6 dos Deltapapillomavirus selecionados.....	65
3.2 Análise filogenética de proteínas de E6 de Deltapapillomavirus.....	66
3.2.1 Conjunto de dados e Alinhamentos	66
3.2.2 Análise Filogenética de E6 de Deltapapillomavírus.....	66
3.3 Análise das sequências E6 com base no BPV14	67
3.3.1 Anilhamento das proteínas E6 dos Bos-Deltapapillomavirus.....	67
3.3.2 Obtenção e alinhamento global de sequências de E6 de Deltapapillomavirus..	67
3.3.3 Análise Filogenética da proteína E6 dos Papilomavírus.....	68
3.4 Diagnóstico Molecular das lesões de carneiros	68
3.4.1 Obtenção das amostras de lesões de carneiros.....	68
3.4.2 Extração de DNA.....	69
3.4.3 Diagnóstico por PCR.....	69
3.4.3.1 AMPLIFICAÇÃO COM PRIMERS GENÉRICOS (DELTA-EPSILON)	69
3.4.3.2 AMPLIFICAÇÃO COM OS PRIMERS ESPECÍFICOS.....	70
3.4.3.3 AMPLIFICAÇÃO COM OS PRIMERS PARA E6.....	70
3.4.3.4 PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR.....	71

3.4.3.5 SEQUENCIAMENTO DOS PRODUTOS DE PCR.....	71
4 RESULTADOS.....	72
4.1 Modelagem molecular comparativa.....	73
4.1.1 Identificação de sequências de E6 de Deltapapillomavirus.....	73
4.1.2 Identificação da proteína molde.....	76
4.1.3 Construção dos modelos de E6 de Deltapapillomavirus.....	77
4.1.4 Validação dos modelos de E6 de Deltapapillomavirus.....	77
4.1.5 estrutura 3D de cada proteína E6 de Deltapapillomavirus modelada, topologia e estrutura bidimensional	79
4.2 Análise filogenética de proteínas de E6 de Deltapapillomavirus.....	86
4.3 Análise das proteínas E6 com base no BPV14.....	90
4.3.1 Anilhamento múltiplo das proteínas E6 dos Bos-Deltapapillomavirus.....	90
4.3.2 Obtenção e alinhamento global de sequências de E6 de Deltapapillomavirus...	91
4.3.3 Análise filogenética das sequências da proteína E6 dos diferentes PVs.....	92
4.3.4 Análise filogenética dos Alphapapillomavirus.....	93
4.4 Diagnóstico Molecular das lesões de carneiros.....	95
4.4.1 Primers genéricos.....	95
4.4.2 Primers específicos para BPV2.....	96
4.4.3 Primers específicos para a região E6 de BPV2.....	96
5 DISCUSSÃO.....	99
6 CONCLUSÃO.....	118
7 REFERÊNCIAS.....	120

1 INTRODUÇÃO

Os tipos virais pertencentes aos *Delta*-PVs são responsáveis, principalmente, pelo desenvolvimento de fibropapilomas em bovinos e de sarcóides em equinos, relacionados à ação das oncoproteínas virais (COOK; OLSON, 1951; JELÍNEK; TACHEZY, 2005; LUNARDI et al., 2013a; NASIR; CAMPO, 2008).

O genoma dos papilomavírus possui todas as características básicas que um suposto tipo deve ter, isto é: regiões responsáveis pela replicação (“long control region” – LCR), pela transcrição (“Early region” – E1 and E2) e, finalmente, pela montagem do capsídeo viral (“Late region” – L1 and L2); além das “proteínas adaptativas” (E5, E6 e/ou E7), associadas à proliferação e transformação celular (GARCÍA-VALLVÉ; ALONSO; BRAVO, 2005; GOTTSCHLING et al., 2007; VAN DOORSLAER, 2013a). As similaridades e diferenças com base na sequência L1 constituem o principal critério utilizado para a classificação dos PVs (ICTV; DE VILLIERS et al., 2004). Três desses produtos são considerados proteínas oncogênicas: E5, E6 e E7, pela capacidade de estimular a proliferação e sobrevivência celular e de modular a diferenciação de queratinócitos (VANDE POL; KLINGELHUTZ, 2013).

Considerando a importância dos papilomavírus e da sua classificação - muitas vezes modificada e questionada -, o gênero *Delta* em especial e o papel transformante das oncoproteínas, discute a estrutura do gene e da proteína E6, bem como analisa comparativa e evolutivamente proteínas E6 de *Delta*-PVs, buscando um melhor entendimento da história evolutiva dos papilomavírus. A proteína E6 de BPVs foi objeto de estudos teóricos computacionais, bem como experimentais que levaram à sua obtenção na forma recombinante pela expressão em *E. coli* (MAZZUCHELLI-DE-SOUZA et al., 2013). Conforme as análises computacionais foram progredindo, surgiram novas e intrigantes questões. Como exemplo, durante o desenvolvimento desta tese, foi publicado um novo *Delta*-PV, o BPV14 (MUNDAY et al., 2015) e, ao iniciarmos a modelagem molecular da proteína E6 desse tipo viral, foi observado o quão discrepante ela era em relação às proteínas dos outros PVs pertencentes ao mesmo gênero. Isso nos motivou a realizar análises detalhadas de sequência e filogenia (MAZZUCHELLI-DE-SOUZA; STOCCO; THOMPSON, 2015). A classificação de um tipo viral com base somente na análise da sua região conservada L1 tem se mostrado cada vez mais insuficiente, fazendo com que outros fatores sejam avaliados. Neste aspecto, a proteína E6, devido ao seu alto grau de conservação, parece ser útil como um marcador molecular. Logo, torna-se evidente a importância da análise criteriosa de sequências e de estudos estruturais e evolutivos utilizando ferramentas de modelagem molecular e filogenética das proteínas E6 dos *Deltapapillomavirus*.

O último tipo viral descrito pertencente ao gênero Delta-PV, foi o *Ovis aries papillomavirus* tipo 4 (OaPV4), que tem os ovinos como hospedeiro natural. Na área veterinária, o papilomavírus leva a grandes prejuízos econômicos. O crescimento da ovinocultura no Brasil e o surgimento de lesões em animais premiados desperta o interesse de criadores e pesquisadores quanto ao diagnóstico da doença, visando o seu entendimento e a busca por métodos terapêuticos. Apesar de serem consideradas raras, foram observadas lesões papilomatosas em carneiros em uma fazenda do estado de São Paulo. As lesões foram extraídas e doadas ao Laboratório de Genética do Instituto Butantan. O diagnóstico mostrou que o BPV2, que tem os bovinos como hospedeiro natural, era o agente causador da infecção - sugestivamente produtiva. Logo, além de discutir os *Delta*-PVs, esta tese demonstra na prática a habilidade deste gênero em romper a barreira espécie-específica.

1.1 Objetivo geral

Devido à importância dos *Deltapapillomavirus* e da proteína E6 como agente oncogênico, o presente trabalho teve como objetivo a análise comparativa e evolutiva da proteína E6 de *Deltapapillomavirus*, bem como a análise estrutural, utilizando modelagem molecular por homologia, e o diagnóstico molecular.

1.2 Objetivos específicos

- a) Fazer o levantamento de todos os tipos virais pertencentes ao gênero *Deltapapillomavirus*, inclusive historicamente;
- b) Analisar as sequências dos *Delta*-PVs, incluindo a identificação de ORFs;
- c) Fazer a modelagem molecular comparativa por homologia das proteínas E6 dos *Delta*-PVs;
- d) Realizar o estudo evolutivo dos papilomavirus com base na proteína E6;
- e) Diagnosticar lesões cutâneas de carneiros.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Características do genoma dos papilomavírus e suas proteínas

Os papilomavírus (PVs) se constituem em vírus com genoma de DNA circular dupla fita não segmentado, cópia única e com tamanho variando entre 5.300 e 8.000 nucleotídeos (ICTV, 2010). Este genoma é dividido em duas regiões: a região denominada LCR (“long control region” ou região de controle principal), sendo uma região de regulação contendo o “ori” viral (ponto de origem da replicação do genoma), com elementos *cis*-regulatórios necessários para a replicação e transcrição do DNA do vírus e a região contendo as ORFs (“open reading frames” ou matrizes de leitura aberta), sendo esta subdividida em regiões precoce (“early” ou E) e tardia (“late” ou L). A região de transcrição precoce codifica genes para proteínas não estruturais e a região de transcrição tardia codifica genes para proteínas do capsídeo (BORZACCHIELLO; ROPERTO, 2008; CAMPO, 2002; NASIR et al., 2007; PEREIRA; HITZEROTH; RYBICKI, 2009; STANLEY; PETT; COLEMAN, 2007).

A região E é transcrita primariamente logo após a infecção celular pelo vírus, estando seus transcritos relacionados à replicação, transcrição e transformação celular, designadas E1-E9, dependendo do tipo viral (DE VILLIERS et al., 2004; ERIKSSON et al., 1994; MÜNGER; HOWLEY, 2002).

Os genes E1 e E2 expressam proteínas regulatórias que modulam a transcrição e replicação viral (BAKER; HOWLEY, 1987), ativando ou reprimindo promotores virais (HAM et al., 1991). O padrão da expressão dos genes virais é dependente da expressão das proteínas virais E1 e E2 que permitem a manutenção do DNA viral na forma epissomal e facilitam a correta segregação dos genomas durante a divisão celular (YOU et al., 2004). Em baixos níveis, a E2 ativa a transcrição viral, enquanto que em altas concentrações, a transcrição é reprimida (HEGDE, 2002).

A proteína codificada pelo gene E4 associa-se com a rede de queratina celular, provocando sua desestabilização e auxiliando, assim, a liberação das partículas virais (DOORBAR, 2005). A proteína E4 é formada pelo processamento alternativo de transcritos do gene E1, formando transcritos E1/E4, sendo expressa durante o ciclo do BPV, em maior grau nas camadas suprabasais diferenciadas do epitélio (DOORBAR et al., 1991; ROBERTS et al., 1997). Já a proteína E5 é uma proteína hidrofóbica de membrana, expressa nos estágios iniciais da infecção viral, capaz de transformar fibroblastos de rato e queratinócitos humanos (LEECHANACHAI et al., 1992; LEPTAK et al., 1991). Sua expressão modifica a resposta celular a fatores de crescimento e bloqueia a expressão na superfície de moléculas do MHC

(BRAVO; CRUSIUS; ALONSO, 2005), estando também associada ao processo de malignização dos queratinócitos em conjunto com a proteína E7 (BOUVARD et al., 1994).

A proteína E5 é uma oncoproteína com tamanho considerado pequeno quando comparada às outras proteínas dos PVs possuindo, por exemplo, 44 aminoácidos no BPV1 e 42 no BPV4. É uma proteína com relatado alto potencial oncogênico, associado ao aparecimento de diferentes formas de tumores malignos, mostrando também ser a porção transcrita a partir da região gênica próxima à extremidade 3' essencial à transformação celular *in vitro* (BURKHARDT; DIMAIO; SCHLEGEL, 1987; PENNIE et al., 1993; SCHILLER et al., 1986; SCHLEGEL et al., 1986).

Resumidamente, a proteína E6 inativa a proteína supressora de tumor p53, facilitando sua degradação (MÜNGER; HOWLEY, 2002). A perda de atividade da proteína p53 resulta no crescimento celular desregulado e instabilidade genômica, características de células imortalizadas (HARTWELL, 1992). Outros estudos mostraram que a oncoproteína E6 do BPV1 pode causar transformação celular independentemente da degradação da proteína p53, porém os mecanismos envolvidos ainda não foram totalmente esclarecidos. Foi demonstrado que E6 de BPV1 interage com CBP/p300. Essa interação resulta na inibição do co-fator de transcrição necessário ao funcionamento da p53 (ZIMMERMANN et al., 2000).

Os produtos dos genes E6 e E7 são essenciais no processo de transformação e imortalização celular (RIVOIRE et al., 2001). Estudos realizados em diferentes linhagens celulares de câncer cervical, infectadas com HPV16, mostraram a expressão somente das ORFs E6 e E7, especulando-se que a fusão das proteínas E6-E7 seja importante para a progressão maligna (BAKER; HOWLEY, 1987). É sugerido que os genes E6 e E7 têm uma atuação sinérgica no processo de indução da imortalização de queratinócitos humanos genitais, apesar de ser demonstrado que em algumas células, como diferentes tipos de células epiteliais mamárias, estas proteínas podem atuar separadamente (WAZER et al., 1995).

A proteína E7 possui uma região conservada (L-x-C-x-E) que se liga à família de proteínas supressoras de tumor (MCLAUGHLIN-DRUBIN; MÜNGER, 2009). Logo, dentre outras funções, liga-se à forma hipofosforilada da proteína pRb, resultando na inativação desta última e permitindo, portanto, a progressão para a fase S do ciclo celular (HERWIG; STRAUSS, 1997; JONES; MÜNGER, 1996). Entretanto, nem todas as proteínas E7 de PVs possuem essa região conservada, assim como nem todos os tipos virais possuem o gene que codifica essa proteína (STEVENS et al., 2008a, 2008b; VAN BRESSEM et al., 2007).

A ORF E9 foi descrita pela primeira vez em 1994, sendo posteriormente identificada nos genomas de *Rangifer tarandus papillomavirus* (RtPV), *Alces alces papillomavirus* (AaPV)

e *Odokoileus virginianus papillomavirus* (OvPV), sendo traduzida em uma proteína com tamanho de 40 aminoácidos, extremamente hidrofóbica, com atividade transformante em células C127 (ERIKSSON et al., 1994).

A região L expressa, tardiamente, as proteínas responsáveis pela formação do capsídeo viral, L1 e L2. A proteína L1 possui peso molecular de 54-58 kDa, sendo organizada em 72 pentâmeros e com capacidade de se auto estruturar em VLPs (“vírus like particles”) (FREITAS et al., 2007; VILLA et al., 2005). A proteína L2, com peso molecular de 68-76 kDa, possui cerca de 469 aminoácidos e se liga ao DNA viral, favorecendo a encapsidação. As proteínas L atuam em conjunto na ligação viral aos receptores celulares (LIU et al., 1997; TOMITA et al., 2007; TRUS et al., 1997). Alguns tipos de PVs, como o BPV3, BPV4 e BPV12 supostamente possuem região codificadora para a proteína L3, mas sua função ainda é desconhecida (CAMPO, 2002; MÜNGER; HOWLEY, 2002; PATEL; SMITH; CAMPO, 1987; TERA; DESALLE; BURK, 2002).

2.1.1 A proteína E6

A especulação de que a proteína E6 poderia desempenhar uma função importante em tumores malignos, já na década de 80, foi reforçada pela descoberta de que papilomavírus de coelhos, *Sylvilagus floridanus papillomavirus* 1 (SfPV1, antes denominado CRPV; GenBank ID: K02708) mantinham sua ORF E6 transcricionalmente ativa em carcinomas transplantados, levando à transformação celular (DANOS et al., 1985; NASSERI; WETTSTEIN, 1984). Além disso, estudos sobre os tumores derivados de células do colo uterino humano e das linhagens celulares derivadas destas mostraram que proteínas E6 continuaram sendo expressas muitos anos após os eventos iniciais da transformação (ANDROPHY et al., 1987; BANKS et al., 1987). Nos anos seguintes, vários trabalhos mostraram, a partir de construções gênicas e expressão da proteína E6 em culturas celulares, que a E6 era realmente uma proteína eficiente na transformação *in vitro* (DAS; BOHL; VANDE POL, 2000; TONG; HOWLEY, 1997). Porém, somente em 2014, usando a proteína recombinante E6 de BPV1 purificada (MAZZUCHELLI-DE-SOUZA et al., 2013), foi demonstrado o seu potencial oncogênico *per se* em cultura de linfócitos (ARALDI et al., 2015).

O produto da ORF E6 é uma proteína básica com tendência a se tornar carregada positivamente em pH fisiológico, a qual contém os motivos conservados (“zinc fingers”) compostos pelas sequências ricas em cisteína C-x-x-C. As proteínas E6 dos *Deltapapillomavirus* apresentam, em média, 137 aminoácidos de comprimento com um similar

espaçamento de 36 aminoácidos entre seus domínios conservados (BARBOSA; LOWY; SCHILLER, 1989; ULLMAN et al., 1996; CHEN; HONG; ANDROPHY, 1997; LUNARDI et al., 2013b; MAZZUCHELLI-DE-SOUZA et al., 2013; TONG et al., 1997, 1998), sendo caracterizadas como proteínas transformantes expressas nos estágios da infecção.

O tamanho da proteína E6 pode variar de acordo com a espécie viral. Por exemplo, dois PVs que infectam aves, o *Francolinus leucoscepus papillomavirus* 1 (FIPV1, GenBank ID: EU18879) e o *Fringilla coelebs papillomavirus* 1 (FcPV1, GenBank ID: AY057109) expressam proteínas E6 consideradas pequenas e incomuns, com 83 e 85 aminoácidos, respectivamente (TERAI; DESALLE; BURK, 2002; VAN DOORSLAER et al., 2009), enquanto que no *Bos taurus papillomavirus* 14 (BPV14, GenBank ID: KP276343) esta apresenta 164 aminoácidos (MUNDAY et al., 2015).

Cole e Danos sugeriram que a ORF E6 seria formada pela duplicação de sequências gênicas, com uma região contendo quatro repetições C-x-x-C, formando dois motivos conservados, ricos em cisteína, entre os diferentes tipos virais (COLE; DANOS, 1987), sendo tal característica frequentemente encontrada em proteínas que são capazes de se ligar a metais e ao DNA (BERG, 1986a). Assim, a E6 é caracterizada como uma proteína “zinc-finger” (BARBOSA; LOWY; SCHILLER, 1989). Apesar da ORF E6 ser considerada altamente conservada entre os PVs, algumas discrepâncias são observadas quando comparamos os PVs, desde diferenças na sua composição físico-química, até sua inexistência no genoma viral, características discutidas a seguir.

Alguns papilomavírus de aves, como aqueles já citados (FIPV1 e FcPV1), possuem a proteína E6 com somente um domínio “zinc-finger” (TERAI; DESALLE; BURK, 2002; VAN DOORSLAER et al., 2009). Diferenças encontradas na ORF E6 podem resultar em proteínas que atuam de maneira distinta, tal como ocorre nos papilomavírus humanos (HPV) em relação a sua capacidade de promover ou não o câncer, sendo classificados, respectivamente, como de alto ou baixo risco (ZUR HAUSEN; SCHNEIDER, 1987), e estando essa capacidade diretamente relacionada à atividade da proteína E6 (BARBOSA et al., 1991). Diferenças na regulação da transcrição gênica e na capacidade de “splicing”, bem como na capacidade de ligação a outros compostos, mostram que as proteínas E6 de baixo risco possuem uma atividade menos efetiva na transformação celular do que aquelas dos PVs de alto risco (BARBOSA et al., 1991).

Uma das primeiras explicações para as diferenças encontradas na biologia e atuação das proteínas E6 em função de sua estrutura veio da forma como estas se ligam, *in vitro*, à proteína supressora de tumor p53, mostrando que essa ligação ocorre nos HPVs de alto risco, enquanto

que nos HPVs de baixo risco essa ligação é instável ou não acontece (BARBOSA et al., 1991; SCHILLER et al., 1986; STOREY; OSBORN; CRAWFORD, 1990). Outra diferença importante observada entre as proteínas E6 de HPV e de BPV é o fato de que a E6 dos HPVs marca a proteína p53 para ser degradada via ubiquitinação pelo recrutamento da AP-53 (HUIBREGTSE; SCHEFFNER; HOWLEY, 1993a, 1993b; SCHEFFNER et al., 1990a), enquanto que nos BPVs esta também apresenta atividade transformante, mas sem degradar a p53, através de mecanismos que ainda não foram totalmente esclarecidos (CHEN; HONG; ANDROPHY, 1997).

Uma mesma espécie de vírus, ou seja, vírus que têm um mesmo hospedeiro, como o BPV1 (GenBank ID: X02346) e o BPV5 (GenBank ID: AF457465), *Delta* e *Epsilonpapillomavirus*, respectivamente, que infectam bovinos, apresentam as ORFs E6 e E7 *in tandem*, enquanto o BPV3 (GenBank ID: AF486184) e o BPV4 (GenBank ID: X05817), ambos *Xipapillomavirus*, não possuem a ORF E6 (GARCÍA-VALLVÉ; ALONSO; BRAVO, 2005). Nenhuma das espécies de *Xipapillomavirus* apresentam a ORF E6 (VAN DOORSLAER, 2013b). Um outro exemplo é o *Psittacus erithacus papillomavirus* 1 (PePV1, GenBank ID: AF420235), gênero *Thetapapillomavirus*, que não possui a ORF E6, possivelmente em razão de eventos de deleção, conforme indicam resultados de análises genéticas (TERAI et al., 2002; VAN DOORSLAER et al., 2009).

O BPV tem contribuído significativamente como modelo para entender a genética dos papilomavírus e o papel dos genes de replicação precoce (E) na transformação celular, também devido às constantes descobertas relacionadas aos tumores equinos e bovinos (BORZACCHIELLO et al., 2009; LUNARDI et al., 2013a). Muito do que se sabe vem ou do estudo do BPV (BOCANETI et al., 2016; BORZACCHIELLO, 2008; CAMPO, 2002; CAMPOS et al., 2008) ou do HPV (DE VILLIERS, 2013), sendo que proteínas E6 de outros tipos virais, por exemplo, muitas vezes são definidas somente quando o genoma completo é sequenciado e o novo tipo viral é descrito, não sendo encontrado nenhum outro registro a respeito delas. Além disso, em relação à E6, geralmente, são citadas características já amplamente divulgadas, como a região C-x-x-C (ERDÉLYI et al., 2008; LUNARDI et al., 2013b; MUNDAY et al., 2015), sem um maior aprofundamento sobre questões funcionais e mecanismos moleculares de atuação. Frequentemente, nem todas as regiões, com exceção da ORF L1 que será necessária à classificação do novo tipo viral, são determinadas, como no OaPV1 e OaPV2, onde não é possível identificar a ORF E6 (DELLIUS et al., 1997, submissão direta).

A proteína E6 pode se ligar a uma gama de proteínas celulares (NGUYEN et al., 2003). Uma das características mais conhecidas da E6 - já citada - é a capacidade de degradação ou inativação da p53, podendo se associar direta ou indiretamente a esta proteína que é responsável pela regulação da passagem da fase G1 para S e da fase G2 para M no ciclo celular. A proteína viral E6 recruta a proteína celular E6AP, que funciona como uma ubiquitina-ligase para o complexo contendo p53. Este recrutamento resulta na ubiquitinação de p53 seguido de sua rápida degradação. Logo, sem a proteína p53, a célula perde a capacidade de corrigir possíveis danos no DNA, passando à divisão celular sem ocorrer o reparo. Consequentemente, aumenta-se a frequência das mutações, dos rearranjos cromossômicos e das aneuploidias. O acúmulo de eventos mutacionais é a causa subjacente ao desenvolvimento de um fenótipo neoplásico, resultando no câncer (GRIFFITHS et al., 2008; KEHMEIER et al., 2002; NORONHA et al., 1999; STUBENRAUCH; LAIMINS, 1999; VOUSDEN, 1993).

Existem evidências de que a proteína E6 inativa o complexo CBP/p300, um regulador transcricional que controla várias respostas celulares, entre elas a ativação do gene TP53 (ZIMMERMANN et al., 2000). Foi encontrada uma associação entre as oncoproteínas E6 dos vírus cutâneos HPV1, HPV8 e BPV1 e o co-ativador da proteína NOTCH, o MAML1, comprovando que a proteína E6 do BPV reprime a transcrição de NOTCH, consequentemente atrasando a diferenciação de queratinócitos (BRIMER et al., 2012). Além destes, outros ligantes à proteína E6 já foram descritos (ZUR HAUSEN, 2000).

Um estudo recente mostrou que a proteína E6 do HPV induz a expressão do fator de iniciação da tradução eucariótica 4E (eIF4E), o qual é sabidamente superexpresso em câncer cervical. A regulação de eIF4E pela E6 influencia a proliferação celular, o ciclo celular, a migração e a apoptose (WANG; RODEN, 2014).

Foi demonstrado que a E6 do HPV interage e leva à degradação de proteínas contendo o domínio PDZ (STORRS; SILVERSTEIN, 2007; THOMAS et al., 2002), um domínio estrutural, conservado, com cerca de 80-90 aminoácidos, encontrado em proteínas sinalizadoras de bactérias, leveduras, plantas e animais (BOXUS et al., 2008; PONTING, 2008), localizado na região C-terminal (NGUYEN et al., 2003). Estes domínios ajudam na ancoragem de proteínas transmembrana ao citosqueleto, na adesão célula-célula e na organização dos complexos de sinalização (RANGANATHAN; ROSS, 1997). PDZ é um acrônimo que combina as primeiras letras de três proteínas onde esse domínio foi identificado pela primeira vez, sendo elas: (i) “post synaptic density protein” (PSD95); (ii) “*Drosophila* disc large tumor supressor” (Dlg1); (iii) “zonula occludens-1 protein” (zo-1) (KENNEDY, 1995). A associação de E6 a estas proteínas parece ter um papel importante no

ciclo viral do HPV. Além disso, essa ligação leva ao processo de carcinogênese, já que algumas dessas proteínas contendo o domínio PDZ podem atuar como proteínas supressoras de tumor (HEBNER; LAIMINS, 2006; THOMAS et al., 2002).

A proteína E6 do BPV1 se liga ao motivo ácido (L-x-x-L-L) de várias proteínas, levando à regulação da motilidade, da adesão celular e da expressão gênica pela interação proteína-proteína (TUMBARELLO; BROWN; TURNER, 2002). Um exemplo é a ligação ao complexo adaptador AP1 (TONG et al., 1998) e à paxilina, componente das adesões focais. A interação com a paxilina é necessária para a transformação celular pela E6 do BPV1 e, *in vivo*, a competição com os motivos L-x-x-L-L pode bloquear a transformação causada pela E6 (BOHL et al., 2000; TONG; HOWLEY, 1997; WADE; BRIMER; POL, 2008). A proteína E6 do HPV16 também se liga ao motivo L-x-x-L-L no fator de transcrição IRF-3, levando à inativação de seu transcrito, o que proporciona ao vírus um meio para contornar a resposta imune antiviral de uma célula infectada por HPV16 (RONCO et al., 1998). O IRF-3 é responsável por promover a produção de interferons importantes para o desenvolvimento de respostas imune inatas antivirais (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012).

A proteína E6 também apresenta atividade de telomerase (KISSELJOV, 2000; SCULLY, 2002). O DNA telomérico é composto por cerca de 100 a 1000 repetições da sequência TTAGGG e tem como função proteger os cromossomos contra quebras. Quando os telômeros ficam muito curtos, servem como um sinalizador para a parada das divisões celulares (AHMED; TOLLEFSBOL, 2001). A atividade de telomerase desempenhada pela E6 leva à não parada da divisão celular, ou seja, à imortalização dessas células, o que pode ocorrer em 85% a 90% das células cancerígenas (KISSELJOV, 2000; SCULLY, 2002).

Um resumo dos estudos envolvendo a proteína E6 está apresentado na tabela 1.

Tabela 1 - Estudos envolvendo a proteína E6 de HPV e BPV

Interação com a célula hospedeira	Tipo viral	Método e observação	Referências
Facilitação da entrada do vírus à célula	BPV	E6 facilita a entrada do BPV através da interação com a clatrina	(TONG et al., 1997)
Efeito anti-apoptótico	HPV	E6 promove a degradação de <i>Bax</i> , resultando em um efeito anti-apoptótico	(JACKSON; STOREY, 2000) (THOMAS; BANKS, 1999)
Ligação à E6AP ubiquitina ligase	HPV	E6 expressas em <i>E. coli</i> e em células de inseto ligam-se à E6AP ubiquitina ligase	(DANIELS et al., 1997) (KAO et al., 2000) (SCHEFFNER et al., 1993)
Ligação ao DNA	HPV	E6 expressa em <i>E. coli</i> se liga ao DNA	(IFTNER et al., 2002) (IMAI et al., 1989) (LUSKY et al., 1983)
Imortalização celular	HPV	E6 promove a degradação da p53 e a imortalização celular	(DALAL et al., 1996) (HUIBREGTSE; SCHEFFNER; HOWLEY, 1991) (SCHEFFNER et al., 1990b)
“Downregulation” epigenética da p53	HPV	E6 expressa em baculovírus induz a hipoacetilação da p53	(ELBEL et al., 1997) (THOMAS; CHIANG, 2005)
	HPV	E6 expressa em <i>E. coli</i> interage com a p300/CBP, reduzindo os níveis de p53	(ZIMMERMANN et al., 1999)
	BPV	E6 interagem com a p300/CBP, reduzindo os níveis de p53	(ZIMMERMANN et al., 2000)
Desorganização do aparato mitótico	HPV	E6 transfectada	(DUENSING et al., 2000) (DUENSING; MÜNGER, 2002) (THOMPSON et al., 1997)
Transformação maligna em cultura celular	HPV	Células NIH 3T3 transfectadas com o genoma completo de HPV16	(BANKS et al., 1987) (BOHL et al., 2000) (MANTOVANI; BANKS, 2001) (SONG; PITOT; LAMBERT, 1999) (YASUMOTO et al., 1986) (DAS; BOHL; VANDE POL, 2000)
Interação com a paxilina	BPV	E6 de BPV1 interage com a paxilina, reduzindo a adesão focal	(VANDE POL et al. 1998) (TONG; HOWLEY, 1997) (TONG et al., 1997) (WADE; BRIMER; POL, 2008)
Atividade repressora da telomerase	HPV	E6 induz a expressão de hTERT, reduzindo a atividade da telomerase	(GEWIN et al., 2004) (KLINGELHUTZ; FOSTER; MCDUGALL, 1996) (OH; KYO; LAIMINS, 2001)
Depleção da resposta imune	HPV	E6 expressa em levedura reduz os níveis de IRF-3	(RONCO et al., 1998)

Fonte: Tabela modificada de ARALDI, MAZZUCHELLI-DE-SOUZA et al., 2015b.

2.2 Infecção pelos papilomavírus

Diferentes tipos de PVs estão associados a lesões hiperplásicas (epiteliais cutâneas, mucocutâneas e mucosas), podendo ocasionar proliferações benignas como verrugas (papilomas), além de neoplasias intra-epiteliais anogenitais, papilomas nas regiões da orofaringe e esofaringe, infecções na conjuntiva, cânceres de bexiga, fibromas e até mesmo sarcomas (CARR; GYORF, 2000; MORENO-LÓPEZ; MÖRNER; PETTERSSON, 1986; OLSON et al., 1959; ZUR HAUSEN, 1996, 2000).

Uma infecção, de acordo com o dicionário médico, pode ser produtiva ou abortiva. A infecção, por si só, é a capacidade de um microrganismo de invadir um organismo. Na infecção produtiva, ocorre a replicação e formação de novos agentes infectantes. Em medicina, principalmente no que diz respeito aos vírus, o termo "infecção abortiva" é usado para designar o curso abreviado de uma doença infecciosa com poucos sintomas, ou seja, uma infecção onde alguns ou todos os componentes do vírus são sintetizados, mas não são formadas novas partículas virais infectantes. Isso ocorre pela infecção por vírus defeituosos ou porque a célula hospedeira não é permissiva e impede a replicação de um vírus em particular. Esse tipo de infecção é também conhecida como “não permissiva” (The Free Dictionary by FARLEX).

Durante o início da infecção pelos papilomas, os vírus entram em contato com as células da membrana basal por meio de microlesões no epitélio, colocando o genoma viral em contato com o genoma da célula hospedeira. As células da membrana basal apresentam DNA viral com baixo número de cópias e na forma episomal. Após a divisão celular na camada basal, as células descendentes são impelidas em direção à camada de queratinócitos para-basais, sendo que um subconjunto destas células, sob a influência dos oncogenes virais, não consegue se diferenciar, entrando novamente no ciclo celular. Consequentemente, o DNA viral é amplificado, elevando seu número de cópias (CHOW; BROKER, 1994; STUBENRAUCH; LAIMINS, 1999). As células com DNA viral amplificado se multiplicam e se movem cada vez mais em direção ao epitélio estratificado. Os queratinócitos supra-basais contendo o genoma viral amplificado expressam as proteínas tardias estruturais. Finalmente, o DNA viral é encapsulado e novas partículas virais se desprendem na camada mais superficial. Logo, as células sofrem alterações de duas formas principais: (i) inibindo a diferenciação, de modo que a amplificação do genoma viral possa prosseguir; (ii) posteriormente, permitindo a diferenciação, formando um epitélio que sirva de barreira para o hospedeiro, permitindo a expressão de proteínas do capsídeo viral. A liberação de novos vírus ocorre no epitélio diferenciado queratinizado (BRIMER et al., 2012; DOORBAR, 2005).

Infecções por PVs podem desencadear uma resposta imune no hospedeiro, levando normalmente à regressão da doença (BORZACCHIELLO; ROPERTO, 2008). No entanto, em alguns casos, as proliferações papilomatosas induzidas por alguns tipos virais específicos podem vir a se tornar lesões malignas (tumores malignos) (DE VILLIERS et al., 2004). Esta progressão está frequentemente associada a co-fatores (LEAL et al., 2003).

2.3 Métodos de detecção viral

Em razão da dificuldade em realizar o isolamento viral *in vitro* (WOSIACKI et al., 2005), os primeiros diagnósticos de infecções por PVs foram baseados nos achados histológicos das lesões e nas alterações da morfologia celular. Entretanto, com a utilização em larga escala de técnicas de biologia molecular, principalmente com as aplicações da reação em cadeia da polimerase (PCR), foi possível estabelecer um novo padrão para a identificação viral, com o uso de uma técnica bastante sensível, capaz de detectar uma única cópia do genoma por célula (SHAMANIN; DELIUS; DE VILLIERS, 1994). Após a PCR, o sequenciamento de DNA aumenta a precisão na genotipagem e identificação de microorganismos, sendo um método altamente confiável (GHARIZADEH et al., 2003).

Técnicas de hibridização como o “Southern blot” e hibridização *in situ* (ISH) também são utilizadas na detecção dos PVs, por exemplo, na detecção de BPVs em sangue periférico e tecidos do trato reprodutivo, verrugas, sangue e plasma, bem como no sangue de bezerros recém-nascidos o que, neste caso, indica uma possível transmissão vertical (DE CARVALHO et al., 2003; DINIZ et al., 2009; FREITAS et al., 2003; JELÍNEK; TACHEZY, 2005; LINDSEY et al., 2009; STOCCO DOS SANTOS et al., 1998).

Diversos iniciadores genéricos têm sido utilizados para detecção geral de sequências de DNA viral. O par de iniciadores FAP59/FAP64 (FORSLUND et al., 1999) foi desenhado para amplificação de regiões conservadas do gene de L1 de HPV, detectando este vírus em tumores cutâneos ou tecido normal. Além dos iniciadores genéricos, podem ser utilizados marcadores para tipos específicos de BPV, por meio de sequências particulares de alguns desses tipos. Iniciadores específicos para BPV2 foram utilizados na detecção de sequências desse tipo viral no trato reprodutivo e em gametas (DE CARVALHO et al., 2003). Campos et al. (2008) detectaram três tipos de BPV (1, 2 e 4) em sangue, verruga e cultura primária de tecido a partir do emprego de iniciadores específicos para os tipos virais mencionados (CAMPOS et al., 2008). A detecção de BPV com iniciadores específicos foi realizada em vários tipos de amostras

biológicas como verrugas, sangue periférico, plasma, gametas, esperma, placenta, líquido amniótico, leite, colostro (FREITAS et al., 2007; LINDSEY et al., 2009; STOCCO DOS SANTOS et al., 1998), além da identificação de BPV em sarcóides equinos (LUNARDI et al., 2013a; NASIR; REID, 1999).

2.4 Classificação dos papilomavírus

Papilomavírus e poliomavírus formaram, por muito tempo, uma única família: *Papovaviridae* (WILDY, 1971, citado em FENNER, 1976). Estudos envolvendo os PVs datam da década de 1930, quando o papilomavírus Shope foi primeiro descrito como agente causador de papilomas cutâneos em coelhos (“cottontail rabbits”) (SHOPE, 1937). Em 1997, conforme consta na página do Comitê Internacional de Taxonomia Viral (“The International Committee on Taxonomy of Viruses” – ICTV – Divisão de Virologia, União Internacional de Associações de Microbiologia), o sétimo relatório publicado pelo comitê documenta a divisão da *Papovaviridae* em duas novas famílias: (i) *Polyomaviridae*, composta pelo gênero *Polyomavirus*; (ii) *Papillomaviridae*, contendo, até então, um único gênero que foi denominado *Papillomavirus* (ICTV).

O ICTV, a partir de relatórios enviados por subcomitês, é responsável pela oficialização dos critérios de classificação e, conseqüentemente, pela nomenclatura dos vírus (FENNER, 1976). O comitê tem um critério de classificação taxonômica dos vírus em geral baseado em: (i) identidade de sequências; (ii) hospedeiros naturais dos vírus; (iii) tropismo celular e tecidual; (iv) patogenicidade e citopatogenicidade; (v) forma de transmissão; (vi) propriedades físico-químicas; (vii) e propriedades antigênicas (VAN REGENMORTEL et al., 1997). Em relação aos papilomavírus, como naturalmente eles não apresentam uma resposta imune robusta, os mesmos não são classificados com base nos sorotipos, sendo esse critério pouco analisado (BERNARD et al., 2010). As análises filogenéticas realizadas por vários pesquisadores, destacando-se Chen et al. (1995), utilizando a região L1, juntamente às observações realizadas por membros do ICTV (FAUQUET et al., 2005), serviram para a classificação proposta em 2003, baseada na identidade de sequências nucleotídicas e atualmente utilizada (BERNARD et al., 2010; DE VILLIERS, 2013; DE VILLIERS et al., 2004). Ou seja, a classificação formal dos PVs é baseada predominantemente na identidade entre as sequências de nucleotídeos somada às propriedades médicas e biológicas desses vírus (CHAN et al., 1995, 1992; RANST; KAPLANLT; BURK, 1992; SHAMANIN; DELIUS; DE

VILLIERS, 1994). Porém, a utilização de técnicas consideradas mais modernas na identificação de novos vírus, como a metagenômica, vem sendo discutida (DE VILLIERS, 2013).

A constatação de uma variedade de papilomavírus se deu pelo isolamento do DNA viral a partir de verrugas humanas, que era submetido à restrição enzimática e subsequente montagem de seus mapas físicos (FAVRE, 1975; GISSMANN; PFISTER; ZUR HAUSEN, 1977; GISSMANN; ZUR HAUSEN, 1976; ORTH et al., 1978). Com isso, muitos laboratórios adotaram sua própria nomenclatura para descrever os papilomavírus (DE VILLIERS, 2013). Em 1979, inicia-se a tentativa de unificação de uma nomenclatura, sendo determinado, por exemplo, que os papilomavírus humanos passariam a ter a sigla (HPV) e esta seria acompanhada por um número (COGGIN; ZUR HAUSEN, 1979).

Técnicas como clonagem molecular e sequenciamento permitiram avanços no estudo dos papilomavírus, sendo que, em 1980, o HPV1 teve seu genoma completo clonado (DANOS; KATINKA; YANIV, 1980; HEILMAN et al., 1980) e, em 1982, seu DNA foi sequenciado (DANOS; KATINKA; YANIV, 1982). Também em 1982, o genoma completo do BPV1 foi determinado (CHEN et al., 1982), permitindo a organização de vários genomas pela comparação à sua sequência de DNA.

A partir de 1983 e 1984, informações a respeito da possibilidade da associação entre os tipos virais HPV16 e HPV18 e o surgimento de cânceres (BOSHART et al., 1984; DÜNST et al., 1983) fizeram com que o HPV ganhasse a atenção de vários países, gerando um rápido crescimento no número de isolados e caracterização de novos tipos (DE VILLIERS, 2013). O médico alemão Harald zur Hausen postulou que os HPVs oncogênicos eram os agentes causadores do segundo câncer mais comum entre as mulheres, o câncer cervical, o que lhe rendeu o Prêmio Nobel em Fisiologia ou Medicina em 2008 (Nobelprize.org).

Em 1986, inicia-se uma nova e importante fase em relação aos papilomavírus: a amplificação do DNA viral pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e a observação da automontagem das partículas virais *in vitro* (SALUNKE; CASPAR; GARCEA, 1986). Logo, iniciadores sintetizados para a amplificação da região conservada L1 permitiram a identificação de uma grande quantidade de supostos novos tipos de HPV (SHAMANIN; DELIUS; DE VILLIERS, 1994).

Posteriormente, foi decidido que as sequências L1, E6 e E7 deveriam ser analisadas para a definição de novos tipos, sendo estabelecida uma identidade de pelo menos 90% para cada região, para classificação como sendo amostras de um mesmo tipo viral. Porém, em 1995, esta definição foi novamente alterada, ficando estabelecida a identidade mínima de 90% somente para a região L1 (DE VILLIERS, 2013). Logo, em relação à ORF L1: (i) diferenças acima de

10% entre duas sequências definem um novo tipo de PV; (ii) diferenças entre 2% e 10% identificam um novo subtipo viral; (iii) divergências menores que 2% definem de uma nova variante (DE VILLIERS et al., 2004).

Os papilomavírus, tradicionalmente descritos como “tipos”, tiveram o termo GÊNERO introduzido em 2004, definido como os tipos de PV que apresentem pelo menos 60% de identidade entre suas sequências L1 (DE VILLIERS et al., 2004), substituindo termos filogenéticos como “supergrupos” e “ramos principais” (CHAN et al., 1995) MYERS et al., 1994). Naquele mesmo ano, ficou estabelecido o termo ESPÉCIE como aqueles tipos pertencentes ao mesmo gênero e com sequências entre 60 e 70% de identidade, substituindo termos como “grupos”, “subgrupos” e “ramos menores” (DE VILLIERS et al., 2004). E o já citado tradicional termo TIPO foi mantido entre os pesquisadores da área dos PVs, sendo caracterizado como aquelas espécies que apresentam similaridade entre as ORFs L1 entre 71 e 89% (DE VILLIERS et al., 2004) (Tabela 2).

Tabela 2 - Classificação dos Papilomavírus de acordo com na identidade entre as sequências gênicas de L1.

Classificação	Porcentagem
Gênero	< 60%
Espécie	60-70%
Tipo	71-89%
Subtipo	2-10%
Variante	< 2%

Ficaram estabelecidos os nomes em grego (letra acompanhada da palavra “*papillomavirus*”) para a determinação dos gêneros (DE VILLIERS et al., 2004) e do prefixo “Dyo” (em grego, “pela segunda vez”) na frente dos nomes em grego para nomear novos gêneros, uma vez que a quantidade de gêneros dos PVs já ultrapassa o número de letras que compõem o alfabeto grego (BERNARD et al., 2010). Em 2015, Burk e colaboradores propuseram ao ICTV a continuação dessa nomenclatura, adicionando “Treis” (em grego, “pela terceira vez”) e assim por diante, sendo proibida a adição dos prefixos aos gêneros *Alphapapillomavirus*, *Betapapillomavirus* e *Gammapapillomavirus*, a fim de evitar equívocos com os tipos de grande importância médica (HPVs), classificados como pertencentes a estes gêneros (documento 2015.014a-atD disponível em <http://talk.ictvonline.org/files/m/>).

Além da classificação genotípica baseada na sequência nucleotídica, o ICTV recomenda que sejam incluídas informações fenotípicas, como tropismo celular e a relação vírus hospedeiro para a definição de gênero e espécie dos PVs (BERNARD et al., 2010; VAN REGENMORTEL, 2000). Alguns PVs ainda se encontram como “unclassified genera” e, segundo o ICTV e o PaVE, são classificados 49 gêneros (Quadro 1).

Quadro 1 - Gênero dos *Papillomavirus*, de acordo com o Papillomavirus Episteme (PaVE).

Gêneros dos <i>Papillomavirus</i>		
<i>Alphapapillomavirus</i>	<i>Dyopsipapillomavirus</i>	<i>Omikronpapillomavirus</i>
<i>Betapapillomavirus</i>	<i>Dyorchopapillomavirus</i>	<i>Phipapillomavirus</i>
<i>Chipapillomavirus</i>	<i>Dyosigmapapillomavirus</i>	<i>Pipapillomavirus</i>
<i>Deltapapillomavirus</i>	<i>Dyotapapillomavirus</i>	<i>Psipapillomavirus</i>
<i>Dyochipapillomavirus</i>	<i>Dyothetapapillomavirus</i>	<i>Rhopapillomavirus</i>
<i>Dyodeltapapillomavirus</i>	<i>Dyousilonpapillomavirus</i>	<i>Sigmapapillomavirus</i>
<i>Dyoepsilonpapillomavirus</i>	<i>Dyoxipapillomavirus</i>	<i>Taupapillomavirus</i>
<i>Dyoetapapillomavirus</i>	<i>Dyozetapapillomavirus</i>	<i>Thetapapillomavirus</i>
<i>Dyoiotapapillomavirus</i>	<i>Epsilonpapillomavirus</i>	<i>Treisdeltapapillomavirus</i>
<i>Dyokappapapillomavirus</i>	<i>Etapapillomavirus</i>	<i>Treisepsilonpapillomavirus</i>
<i>Dyolambdapapillomavirus</i>	<i>Gammapapillomavirus</i>	<i>Treisetapapillomavirus</i>
<i>Dyomupapillomavirus</i>	<i>Iotapapillomavirus</i>	<i>Treiszetapapillomavirus</i>
<i>Dyonupapillomavirus</i>	<i>Kappapapillomavirus</i>	<i>Upsilonpapillomavirus</i>
<i>Dyomegapapillomavirus</i>	<i>Lambdapapillomavirus</i>	<i>Xipapillomavirus</i>
<i>Dyoomikronpapillomavirus</i>	<i>Mupapillomavirus</i>	<i>Zetapapillomavirus</i>
<i>Dyophipapillomavirus</i>	<i>Nupapillomavirus</i>	
<i>Dyopipapillomavirus</i>	<i>Omegapapillomavirus</i>	

2.4.1 O gênero *Deltapapillomavirus*

Os tipos virais pertencentes ao gênero *Deltapapillomavirus* destacam-se entre os PVs por dois motivos. Primeiro, os *Delta*-PVs podem produzir dois tipos de patologia: os papilomas cutâneos e os fibropapilomas em diferentes animais, tais como bovinos, alces e dromedários (AHOLA et al., 1986; CHEN et al., 1982; URE et al., 2011). Ou seja, são capazes de infectar células tanto do tecido epitelial, conforme outros PVs, quanto do tecido conjuntivo, considerado um mecanismo de patogenicidade diferenciado (JARRETT et al., 1984; LUNARDI et al., 2013a, 2013b; NARECHANIA et al., 2004). Adicionalmente, estão associados ao surgimento de fibromatose e fibroses pulmonares (KOLLER; OLSON, 1972; MORENO-LÓPEZ; MÖRNER; PETTERSSON, 1986). Segundo, dentre os tipos de papilomavírus que acometem animais não humanos, os *Delta*-PVs destacam-se pela capacidade de contaminar animais diferentes do seu hospedeiro natural, apesar dos PVs serem considerados espécie-específicos (BERNARD et al., 2010; LUNARDI et al., 2013a, 2013b).

Duas espécies de *Deltapapillomavirus*, o BPV1 e, mais raramente, o BPV2, são conhecidas por causarem fibropapilomas em seu hospedeiro natural (bovinos) e sarcóide em equinos (AMTMANN; MÜLLER; SAUER, 1980; NASIR; REID, 1999), o tipo mais comum de câncer epitelial em equinos no mundo (CHEN et al., 1982; JACKSON, 1936; PASCOE; SUMMERS, 1981). O sarcóide equino tem recorrência elevada, podendo estar associado à invasão pelos fibroblastos transformados do sarcóide, permitindo que essas células se infiltrem no tecido saudável circundante (YUAN et al., 2010, 2011). Porém, a infecção em equinos causada por BPV não resulta na produção de partículas virais, de forma que o modo de transmissão ainda não foi totalmente entendido (CHAMBERS et al., 2003).

Por muito tempo, o sarcóide equino causado por esses dois tipos virais representou o único caso documentado de infecção por PV em uma outra espécie além do seu hospedeiro natural (GORMAN, 1985; LANCASTER; THEILEN; OLSON, 1979). O BPV também já foi identificado em antas (KIDNEY e BERROCAL, 2008), zebras, girafas, antílopes (VAN DYK et al., 2011) e búfalos (PANGTY et al., 2010). Em 2013, foi identificada pela primeira vez a presença de BPV1 e BPV2 em iaques (BAM et al., 2013). Em 2015, foi documentado que o tipo mais recente de papilomavírus bovino descrito, o BPV14, era capaz de infectar gatos (MUNDAY et al., 2015).

O fato de ser o único gênero capaz de ultrapassar a barreira espécie-específica pode ser um critério adicional para a classificação de um tipo viral dentro de um gênero. Lunardi et al. classificaram o BPV13 como pertencente ao gênero *Delta* considerando, além da similaridade não totalmente conclusiva da ORF L1 e das alterações histopatológicas encontradas entre esse

novo PV e os tipos BPV1 e BPV2, sua capacidade de infectar tanto bovinos quanto equinos (LUNARDI et al., 2013a, 2013b).

Tipicamente, os *Deltapapillomavirus* apresentam um genoma dividido em: E6, E7, E1, E2, E4, E5, E9, L2, e L1 (ERDÉLYI et al., 2008; ERIKSSON et al., 1994), não obrigatoriamente apresentando todas as ORFs aqui citadas (Figura 1).

Figura 1 - Representação do genoma completo do gênero *Deltapapillomavirus*.

Fonte: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/192.html, modificada pela autora

2.4.1.1 Espécies de *Deltapapillomavirus*

Atualmente, estão descritas 15 espécies como pertencentes ao gênero *Deltapapillomavirus* (Tabela 3), classificadas entre *Delta-PV1* a *Delta-PV6*, além de um tipo (CdPV2) considerado como *Delta-PV*, mas ainda encontrado como “unclassified *Deltapapillomavirus*” (AHOLA et al., 1986; BURK; TERAII, 2001, não publicado; CHEN et al., 1982; ERDÉLYI et al., 2008; GROFF; LANCASTER, 1985; LANCASTER, 1986, não publicado; LUNARDI et al., 2013b; MUNDAY et al., 2015; URE et al., 2011; ZANIER et al., 2013; ZHU et al., 2013).

Tabela 3 - Espécies de *Deltapapillomavirus*.

	Abreviatura científica (*)	Nomenclatura	Nome científico do hospedeiro	Nome usual do hospedeiro (inglês)	Número de acesso no NCBI	Número de acesso no NCBI da proteína E6	Tamanho da E6 (aa)	Referência
1	AaPV1 (EEPV)	<i>Alces alces papillomavirus</i> 1	<i>Alces alces</i>	Alce (European elk)	M15953	AAA66849	135	Ahola et al. (1986)
	RtPV1 (RPV)	<i>Rangifer tarandus papillomavirus</i> 1	<i>Rangifer tarandus</i>	Rena ou caribou (Reindeer)	AF443292	AAN09915	135	Burk and Terai (2001)**
2	OvPV1 (DPV)	<i>Odocoileus virginianus papillomavirus</i> 1	<i>Odocoileus virginianus</i>	Veado-da- virgínia ou cariacu (American White-tailed deer)	M11910	AAA66841	135	Groff e Lancaster (1985)
3	OaPV1 (OvPV1)	<i>Ovis aries papillomavirus</i> 1	<i>Ovis aries</i>	Ovelha (Domestic sheep)	U83594	Indeterminado	Indeterminado	Dellius et al. (1997)**
	OaPV2 (OvPV2)	<i>Ovis aries papillomavirus</i> 2	<i>Ovis aries</i>	Ovelha (Domestic sheep)	U83595	Indeterminado	Indeterminado	Dellius et al. (1997)**
	OaPV4	<i>Ovis aries papillomavirus</i> 4	<i>Ovis aries</i>	Ovelha (Domestic sheep)	KX954121	ASC60394	123	Tore et al. (2017)
4	BPV1 (BPV1)	<i>Bos taurus papillomavirus</i> 1	<i>Bos taurus</i>	Vaca ou boi (Domestic cow)	X02346	CAB46509 ou 3PY7	137	Chen et al. (1982) Zanier et al. (2013)
	BPV2 (BPV2)	<i>Bos taurus papillomavirus</i> 2	<i>Bos taurus</i>	Vaca ou boi (Domestic cow)	M20219	AAA66831	137	Groff e Lancaster (1986)*

	BPV13	<i>Bos taurus papillomavirus</i> 13	<i>Bos taurus</i>	Vaca ou boi (Domestic cow)	JQ798171	AFR76812	137	Lunardi et al. (2013a)
	BPV14	<i>Bos taurus papillomavirus</i> 14	<i>Bos taurus</i>	Vaca ou boi (Domestic cow)	KP276343	AKB94037	164	Munday et al. (2015)
	BgPV1	<i>Bos grunniens papillomavirus</i> 1	<i>Bos grunniens</i>	Iaque (Yak)	JX174437	AFQ90262.1	137	Zhu et al. (2013)
5	CcaPV1 (RdPV1 and CcPV1)	<i>Capreolus capreolus papillomavirus</i> 1	<i>Capreolus capreolus</i>	Corça (Western roe deer)	EF680235	ABV27560	134	Erdelyi et al. (2008)
	RalPV1	<i>Rusa alfredi papillomavirus</i> 1	<i>Rusa alfredi</i>	Veado-das-Filipinas (Visayan spotted deer)	KT626573	ALO50069	134	Fux (2015)* Fux et al. (2016)
6	CdPV1	<i>Camelus dromedarius papillomavirus</i> 1	<i>Camelus dromedarius</i>	Dromedário (Dromedaries)	HQ912790	ADZ53049	128	Ure et al. (2011)
Unclass	CdPV2	<i>Camelus dromedarius papillomavirus</i> 2	<i>Camelus dromedarius</i>	Dromedário (Dromedaries)	HQ912791	ADZ53060	132	Ure et al. (2011)

Tabela baseada em: (i) BERNARD et al., 2010; (ii) dados do NCBI, incluindo <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=151340>; (iii) dados do Pave (<https://pave.niaid.nih.gov/>). * Primeira abreviatura usada; **Submissão direta. aa: aminoácidos

2.4.1.1.1 DELTAPAPILOMAVIRUS 4

A descrição de cada tipo viral pertencente aos *Deltapapillomavirus* será iniciada por aqueles classificados como *Delta-PV4*, porque o *Bos taurus papillomavirus* tipo 1 (BPV1), o primeiro tipo identificado (CHEN et al., 1982), tem uma importância histórica e é usado na classificação de novos tipos de papilomavírus com base na comparação de genomas.

2.4.1.1.1.1 BOS TAURUS PAPILLOMAVIRUS TIPO 1 (BPV1)

O *Bos taurus* (LINNAEUS, 1758) *papillomavirus* tipo 1 (BPV1) é o tipo de BPV mais estudado, sendo, há muitos anos, amplamente usado como modelo para estudos de infecção e persistência do HPV (SCHILLER; VASS; LOWY, 1984). Inicialmente chamado *Bovine papillomavirus*, a nomenclatura BPV, a qual faz referência aos bovinos (boi e vaca) foi mantida por já ser tão usual, sendo suprimido o “t” de *taurus* (BERNARD et al., 2010).

A sequência completa de nucleotídeos do BPV1 (GenBank ID: X02346), contendo 7.945 pb, foi determinada em 1982 por Chen e colaboradores (CHEN et al., 1982), mas já era sabido que o vírus era o responsável por causar fibropapilomas em bovinos (LANCASTER; OLSON, 1978) e sarcóide em equinos (OLSON; COOK, 1951). Até então, a identificação de quais proteínas do vírus eram expressas nas células transformadas pelo BPV1 era incerta. Com base no alinhamento com o recém sequenciado HPV1, determinado naquele mesmo ano (DANOS; KATINKA; YANIV, 1982), foram determinados e nomeados os genes L1, L2, E1 e E2 no BPV1, além de outras ORFs identificadas, mas não nomeadas (CHEN et al., 1982). Posteriormente, outras ORFs foram identificadas (SARVER et al., 1984).

Dois grupos, independentemente, chegaram à conclusão que uma ORF presente no genoma do BPV1, a E6, era capaz de transformar células C127, classificando o produto desse gene, com aproximadamente 15 kDa, como a segunda proteína transformante (SCHILLER; VASS; LOWY, 1984; YANG; OKAYAMA; HOWLEY, 1985). Curiosamente, até então, a proteína E2 era considerada (a principal) transformante nos papilomavírus (SARVER et al., 1984).

O BPV1 é comumente associado a lesões nos tetos e úbere (BORZACCHIELLO; ROPERTO, 2008; CAMPO, 2002; JARRETT et al., 1991),

causando também fibropapilomas no pênis, levando à necrose e à perda da função reprodutiva (GARDINER et al., 2008).

No BPV1, o gene E6 codifica uma proteína com 137 aminoácidos (GenBank ID: CAB46509) que atua como um ativador transcricional (DANOS et al., 1983; JACKSON; CAMPO, 1991). A proteína E6 do BPV1 contém quatro repetições C-x-x-C, evolutivamente conservadas entre os PVs, constituindo os dois motivos para ligação ao zinco (“zinc finger”) (VAN DOORSLAER et al., 2009), que permite sua ligação ao DNA (BERG, 1986b; WAIN-HOBSON et al., 1985) e também capaz de se ligar a diferentes proteínas, conforme descrito anteriormente.

O BPV1 vem sendo estudado há mais de 30 anos, tanto para o entendimento das suas características moleculares e biológicas, quanto para o estudo das propriedades básicas dos vírus do papiloma, incluindo as proteínas transformantes, tal como a E6 (MUNDAY; FAIRLEY; ATKINSON, 2016). Porém, somente no começo de 2013, por difração de raios-X, foi determinada a estrutura tridimensional completa por cristalografia da proteína E6 de BPV1, a partir de uma proteína recombinante fusionada a ligantes (ZANIER et al., 2013). Dessa forma, abriu-se um leque de possibilidades para seu estudo, incluindo modelagem *in silico* de proteínas semelhantes e a comparação estrutural e funcional de E6 de diferentes tipos virais.

2.4.1.1.1.2 *BOS TAURUS PAPILLOMAVIRUS* TIPO 2 (BPV2)

O *Bos taurus papillomavirus* tipo 2 (BPV2), até então descrito como *Bovine papillomavirus* tipo 2, foi isolado e identificado a partir de papilomas de cabeça e pescoço de bovinos (LANCASTER; THEILEN; OLSON, 1979). A caracterização molecular do genoma do BPV2 pelo uso de enzimas de restrição permitiu a montagem do seu mapa genômico físico em 1981 (CAMPO et al., 1981). Porém, somente em 1986, a sequência do genoma completo do BPV2 foi depositada (GenBank ID: M20219) (GROFF; LANCASTER, 1986, submissão direta).

O BPV2 é amplamente estudado por ser o agente causador de tumores malignos de bexiga em bovinos (WOSIACKI et al., 2005), levando também à hematúria enzoótica crônica, uma condição clínica caracterizada pela presença de sangue na urina (MAXIE; NEWMAN, 2007), sendo esses quadros associados ao consumo de samambaias (principalmente *Pteridium aquilinum*) presentes nas pastagens (BORZACCHIELLO et al., 2003; ROPERTO et al., 2010). Assim como outros *Delta*-PVs, o BPV2 é capaz de

causar sarcóides em equinos (AMTMANN; MÜLLER; SAUER, 1980; LUNARDI et al., 2013a; NASIR; REID, 1999). O potencial de transmissão do BPV2 vem sendo discutido, uma vez que seu DNA já foi detectado no sangue periférico de bovinos (ARALDI et al., 2013).

A proteína E6 do BPV2 (GenBank ID: AAA6683), que possui 137 aminoácidos (GROFF, MITRA, LANCASTER, 1995, não publicado), foi expressa e purificada em sistema bacteriano pela primeira vez em 2013 (MAZZUCHELLI-DE-SOUZA et al., 2013), sendo observada a presença de aminoácidos conservados, como o domínio “zinc finger” e realizada a análise de suas regiões antigênicas.

2.4.1.1.1.3 *BOS TAURUS PAPILLOMAVIRUS* TIPO 13 (BPV13)

Em 2013, um novo tipo de *Bos taurus papillomavirus* foi descrito, o BPV13 (GenBank ID: JQ798171), sendo isolado a partir de papilomas cutâneos da orelha de bovinos no Brasil, tendo seu genoma completo 7.961 pb (LUNARDI et al., 2013b).

O alinhamento da ORF L1 do BPV13 apresentou 88,8% de similaridade em relação ao BPV2 e 85,4% ao BPV1, sendo que, pela análise filogenética, o BPV13 e o BPV2 formaram um grupo monofilético, classificando o novo tipo viral como um membro dos *Deltapapillomavirus* 4 (LUNARDI et al., 2013b).

Oito ORFs foram identificadas no genoma do BPV13 (E1, E2, E4, E5, E6, E7, L1 e L2) e a ORF E6 (GenBank ID: AFR76812) mostrou um tamanho de 414 nucleotídeos, com uma proteína apresentando as regiões C-x-x-C conservadas e 137 aminoácidos (LUNARDI et al., 2013b).

O BPV13 foi isolado também a partir de sarcóide equino, colocando-o como o terceiro tipo de BPV, juntamente com os BPVs 1 e 2, capaz de infectar outros animais além do seu hospedeiro natural; além disso, foi relacionada a presença desse ao surgimento de tumores de bexiga (LUNARDI et al., 2013a).

2.4.1.1.1.4 *BOS TAURUS PAPILLOMAVIRUS* TIPO 14 (BPV14)

Inicialmente depositado como Papilomavírus Associado ao Sarcóide Felino (do inglês “feline sarcoid-associated papillomavirus”), ou FeSarPV (GenBank ID: FJ977616) (MUNDAY; KNIGHT, 2010), esse então tipo viral, detectado em sarcóide felino, foi

posteriormente diagnosticado a partir de lesões de outros gatos domésticos e de leões (ORBELL; YOUNG; MUNDAY, 2011; TEIFKE et al., 2003).

Devido ao fato do FeSarPV ter sido amplificado a partir de pele normal e de fibropapilomas de bovinos (DA SILVA et al., 2012; MUNDAY; KNIGHT, 2010), mas nos felinos ser detectado somente em sarcóides e não em pele normal (MUNDAY; KNIGHT; HOWE, 2010), tornou-se necessária a amplificação do genoma viral total (MUNDAY et al., 2015). O DNA viral foi amplificado a partir de tecidos sabidamente infectados pelo FeSarPV, sendo: (i) uma lesão do tipo sarcóide felino; (ii) duas amostras de pele normal de bovino, (iii) duas amostras de fibropapilomas de bovinos (MUNDAY et al., 2015; MUNDAY; KNIGHT, 2010). Todas as amostras amplificadas possuíam sequências idênticas à sequência L1 de FeSarPV e o genoma completo amplificado a partir do sarcóide felino apresentou 7.966 pb, com sete ORFs identificadas: E1, E2, E5, E6, E7, L1 e L2 (MUNDAY et al., 2015).

A análise a partir da comparação da ORF 1 do suposto novo tipo viral a outros PVs mostrou identidade acima de 61% em relação àqueles pertencentes ao gênero *Deltapapillomavirus* e acima de 70% com as quatro espécies (BgPV1, BPV1, BPV2, BPV13) classificadas como *Delta*-PV 4 (MUNDAY et al., 2015). Além disso, quando comparada aos *Felis catus papillomavirus* (FcaPVs), que têm o gato doméstico como hospedeiro natural, a sequência analisada apresentou uma porcentagem de identidade menor em relação FcaPV1 (GenBank ID: AF480454), ao FcaPV2 (GenBank ID: EU796884) e ao FcaPV3 (GenBank ID: JX972168) do que àquela em quando comparada aos BPVs (LANGE et al., 2009; MUNDAY et al., 2013, 2015). Apesar das amostras de bovino terem sido diagnosticadas como coinfectadas com outros tipos de BPV, com base em todas as análises concluiu-se que o hospedeiro natural do novo tipo viral era bovino, classificando-o como um novo tipo de *Bos taurus* PV, nomeado BPV14 (GenBank ID: KP276343), tendo suas ORFs identificadas (MUNDAY et al., 2015).

Na proteína E6 do BPV14, foram identificadas as regiões conservadas (C-x-x-C). Porém, foi documentado que a ORF E6 possuía 495 nucleotídeos e seu produto 137 aminoácidos, tendo sido depositada uma proteína E6 com 164 aminoácidos (GenBank ID: AKB94037) (MUNDAY et al., 2015). Adicionalmente, os autores relatam no artigo uma distância entre as regiões conservadas de 30 nucleotídeos e não aminoácidos, como deve ser quando se refere a proteínas. Há, portanto, uma incongruência em relação ao tamanho comumente encontrado para E6.

Como na fazenda de gado de onde vieram as amostras, somente um entre vinte gatos apresentava lesão, foi sugerido que este seria o hospedeiro (não natural) final do BPV14, não ocorrendo a duplicação viral, nem sua transmissão a outros animais (MUNDAY et al., 2015). Por fim, concluiu-se que o sarcóide felino seria causado pelo BPV14, caracterizando uma infecção entre espécies (MUNDAY et al., 2015).

Até 2015, havia treze tipos de *Bos taurus papillomavirus* (BPV) descritos, sendo classificados como pertencentes a três gêneros: *Delta*, *Epsilon* e *Xipapillomavirus* (BERNARD et al., 2010; HATAMA et al., 2011; LUNARDI et al., 2013b; ZHU et al., 2013); além do BPV7, não pertencente a nenhum gênero de PV (OGAWA et al., 2007). A partir de 2015, a quantidade de BPVs descritos praticamente dobrou. Atualmente, estão classificados 23 tipos de BPV e, a partir de 2015, a quantidade de BPVs descritos praticamente dobrou, sendo eles, de acordo com o PaVE: *Delta* (BPV1, 2, 13, 14); *Epsilon* (BPV5 and 8); *Xi* (BPV3, 4, 6, 9, 10, 11, 12, 15, 17, 20 e 23), *Dyokappapapillomavirus* (BPV 16, 18 e 22); os BPVs 19 e 21 continuam como “unclassified genus” (BAUERMANN et al., 2017; DAUDT et al., 2016). Por fim, o BPV7 foi classificado como *Dyoxipapillomavirus*, único tipo pertencente a esse gênero (ICTV).

Dentre os novos tipos descritos, o BPV14 (MUNDAY et al., 2015) recebeu especial atenção por dois motivos: (i) era um novo tipo de BPV pertencente aos *Delta*-PVs, gênero objeto de estudo; (ii) foi observado que a proteína E6 descrita como produto do BPV14 se tratava de uma proteína bastante peculiar. Foi documentado que a proteína E6 do novo PV possuía um tamanho de 137 aminoácidos, o que não corresponde ao tamanho da ORF E6 (495 nucleotídeos). Já no GenBank (GenBank ID: AKB94037), sua sequência depositada possui 164 aminoácidos, com a presença de duas metioninas (M).

Essas incongruências motivaram a realização de análises adicionais a partir da sequência E6 do BPV14, incluindo a filogenia baseada nas proteínas E6 de outros PVs, considerando a importância da descrição de novos tipos virais e o papel transformante desempenhado por essas proteínas (MAZZUCHELLI-DE-SOUZA, STOCCO, THOMPSON, 2015).

2.4.1.1.1.5 *BOS GRUNNIENS PAPILLOMAVIRUS* TIPO 1 (BgPV1)

A partir de fibropapilomas em iaques (*Bos grunniens*) (LINNAEUS, 1766), foi identificado um novo tipo viral, o *Bos grunniens papillomavirus* 1 (BgPV1), com um genoma completo constituído por 7.946 pb (GenBank ID: JX174437) (ZHU et al., 2013).

A partir do alinhamento da ORF L1, não foi possível classificar o gênero do BgPV1, por apresentar similaridade tanto com os *Delta*-PVs quanto com Epsilon-PVs. Porém, pela análise filogenética utilizando essa mesma região, o BgPV1 formou um grupo monofilético com os BPVs 1 e 2, possibilitando a classificação do novo tipo viral como pertencente ao *Deltapapillomavirus* 4. Além disso, o alinhamento dos genomas de BgPV1 e dos dez (até então descritos) *Delta*-PVs indicou uma identidade de 82.3% em relação ao BPV1 e 82.1% em relação ao BPV2 (ZHU et al., 2013). Foram determinadas oito ORFs no genoma do BgPV1, sendo elas: E6, E7, E1, E2, E4, E5, L1 e L2. A ORF E6 apresentou 414 nucleotídeos, o que resulta em uma proteína com 137 aminoácidos (GenBank ID: AFQ90262).

2.4.1.1.2 DELTAPAPILLOMAVIRUS 1

2.4.1.1.2.1 ALCES ALCES PAPILLOMAVIRUS TIPO 1 (AaPV1)

Inicialmente chamado EEPV (AHOLA et al., 1986), sigla referente a “European Elk”, nome comum em inglês para alce, o AaPV (GenBank ID: M15953) recebe essa nomenclatura (BERNARD et al., 2010) por ter sido isolado pela primeira vez de fibropapilomas de *Alces alces* (LINNAEUS, 1758), seu hospedeiro natural. Além de fibropapilomas, foi documentado que o AaPV é capaz de causar, mesmo que raramente, fibromas pulmonares de caráter benigno (MORENO-LÓPEZ; MÖRNER; PETTERSSON, 1986; STENLUND et al., 1983).

O AaPV foi isolado e clonado em 1981, mas teve seu genoma completo descrito pela primeira vez em 1986, com um tamanho de 5.732 pb (AHOLA et al., 1986). Porém, de acordo com a última atualização da sua sequência no GenBank (16 de outubro de 2008), o AaPV possui um genoma com tamanho de 8.095 pb (GenBank ID: M15953). Foi determinado que o AaPV é evolutivamente mais próximo do BPV1 e do DPV (OvPV1) (AHOLA et al., 1986). Atualmente, o AaPV1 é classificado como *Deltapapillomavirus* 1 e o OvPV1 como *Deltapapillomavirus* 2 (BERNARD, 2010).

O AaPV teve sua ORF E6 determinada e foi observado que a proteína E6 possui cinco repetições C-x-x-C, interespaçadas por 5, 29, 35 e 29 aminoácidos, com tamanho total de 135 aminoácidos (GenBank ID: AAA66849) (AHOLA et al., 1986).

2.4.1.1.2.2 RANGIFER TARANDUS PAPILLOMAVIRUS TIPO 1 (RTPV1)

Em vários países da região Ártica, as renas ou caribu (em inglês, reindeer ou caribou) (*Rangifer tarandus*, LINNAEUS, 1758), têm uma importância ecológica, econômica, histórica e cultural (SMITS et al., 2013). Dentre as enfermidades que afetam as renas está a papilomatose do tecido conjuntivo, associada aos papilomavírus (*Rangifer tarandus papillomavirus* types 2 and 3, RtPV2 and RtPV3) (ERIKSSON et al., 1994; SMITS et al., 2013) e, mais raramente, as fibropapilomatoses associadas ao RtPV1 e os papilomas cutâneos associados ao RtPV2 (SMITS et al., 2013). Embora sejam os agentes causadores dessas doenças, existem poucos relatos sobre os RtPVs.

Isolado e purificado a partir de uma lesão epitelial – um fibropapiloma – de uma rena da Suécia e, inicialmente nomeado como RPV (MORENO-LOPEZ et al., 1987), o genoma do RtPV1 foi determinado em 2001 (BURK; TERAU, 2001, submissão direta). Atualmente, o RtPV1 está classificado como um tipo viral pertencente ao gênero *Deltapapillomavirus* (NCBI) e seu genoma possui 8.090 pb com nove ORFs identificadas: E6, E7, E1, E2, E4, E5, E9, L2, e L1.

Em relação ao gênero do RtPV2 (Genbank ID: KC810012, NCBI Reference Sequence: NC_021930.1), de acordo com o PaVE, é classificado como pertencente aos *Xipapillomavirus* 3 (PaVE), enquanto no NCBI, o RtPV permanece como “unclassified”, ou não classificado. De acordo com Smits et al., o RtPV2 pode representar um novo gênero da família *Papillomaviridae*, devido à sua alta similaridade com o gênero *Xipapillomavirus* (SMITS et al., 2013). No entanto, seu genoma possui a ORF E6, sendo que uma das principais características desse gênero é exatamente a ausência do gene E6 (ICTV). Já o RtPV3 (SMITS et al., 2013) teve sua sequência parcial depositada no GenBank (GenBank ID: KC810013) e seu gênero permanece não classificado. Finalmente, o RtPV4 (GenBank ID: KJ719447) foi proposto como pertencente a um novo gênero, ainda não determinado (SCHÜRCH et al., 2014).

2.4.1.1.3 DELTAPAPILLOMAVIRUS 2

2.4.1.1.3.1 ODOCOILEUS VIRGINIANUS PAPILLOMAVIRUS TIPO 1 (OvPV1)

O genoma completo do *Odocoileus virginianus* (ZIMMERMANN, 1780) *papillomavirus* 1 (OvPV1) foi isolado do “American white-tailed deer” ou veado da cauda branca, também conhecido no Brasil como cariacu ou veado da Virgínia, e descrito pela primeira vez (GROFF; LANCASTER, 1985) como *Deer papapillomavirus* (DPV1).

Também foi relatado o isolamento do DNA viral a partir de fibropapilomas do veado-mula (em inglês, “mule deer”), um veado norte-americano de nome científico *Odocoileus hemionus* (RAFINESQUE, 1817) (GROFF; LANCASTER, 1985; LANCASTER e SUNDBERG, 1982; SUNDBERG et al., 1985). De acordo com a nomenclatura atual, OvPV1 foi adotada em substituição a DPV (BERNARD et al., 2010).

A sequência do OvPV1 (GenBank ID: M11910), com 8.371 pb, teve suas regiões determinadas pela comparação ao genoma do BPV1 e se mostrou similar aos outros papilomavírus até então descritos (GROFF; LANCASTER, 1985). O OvPV1 foi documentado como sendo uma classe incomum de papilomavírus, por causar primeiro a proliferação de fibroblastos primeiro, sendo os vírus maduros encontrados somente na camada epitelial queratinizada, sem que ocorra a proliferação dessa camada. Por outro lado, a maioria dos papilomavírus, rotineiramente, causam neoplasias somente epiteliais, ou seja, há a proliferação da camada epitelial, como no caso das lesões associadas ao HPV; ou neoplasias epiteliais seguidas pela proliferação de fibroblastos, de forma que a infecção dos fibroblastos acontece como um segundo evento, como àquelas causadas pelos BPVs do tipo 1 e 2 (GROFF; LANCASTER, 1985).

Estudos mostraram que tanto o OvPV1 quanto o BPV1 eram capazes de transformar culturas celulares de camundongo NIH 3T3. Porém, o OvPV1 não provocava o mesmo em linhagens celulares de camundongo C127, distinguindo-o de outros tipos como o BPV1, BPV2, AaPV1 (originalmente EEPV) e HPV5 (GROFF; LANCASTER, 1985).

Análises envolvendo a organização genética e as regiões homólogas entre OvPV1 e BPV1 mostraram que a principal diferença era a ausência da ORF E5 no OvPV1 e a presença da ORF L3 no seu genoma (GROFF; LANCASTER, 1985). A ORF E6 foi identificada com base na comparação do genoma do OvPV ao BPV1 e possui 408 nucleotídeos (GROFF; LANCASTER, 1985), o que corresponde a uma produto de 135 aminoácidos (GenBank ID: AAA66841), estando de acordo com a última atualização da sua sequência (18 de maio de 1995) no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/808788>).

A proteína E6, conforme esperado para os PVs, contém quatro repetições C-x-x-C (DANOS et al., 1983), separadas por 29, 35 e 29 resíduos de aminoácidos no OvPV (GROFF; LANCASTER, 1985). Mais uma vez era chamada a atenção para os dados mais recentes publicados sobre o potencial transformante da E6 (GROFF; LANCASTER, 1985; SCHILLER; VASS; LOWY, 1984; YANG; OKAYAMA; HOWLEY, 1985).

2.4.1.1.4 DELTAPAPILLOMAVIRUS 3

2.4.1.1.4.1 OVIS ARIES PAPILLOMAVIRUS TIPOS 1, 2 E 4 (OaPV1, OaPV2 E OaPV4)

Os genomas dos *Ovis aries* (LINNAEUS, 1758) *papillomavirus* tipo 1 e 2 (OaPV1 e OaPV2) foram depositados diretamente no GenBank por Dellius e colaboradores em 1997 (GenBank ID: U83594 e U83595, respectivamente), sendo os únicos PVs classificados como *Deltapapillomavirus* 3 (GenBank ID: U83594 e U83594). Em 2017, Tore et al descreveram o OaPV tipo 4 (GenBank ID: KX954121) (TORE et al., 2017). Os *Ovis aries papillomavirus* também são encontrados na literatura como OPV ou ainda OvPV, podendo ser confundida com a nomenclatura agora oficial do *Odocoileus virginianus papillomavirus* (BERNARD et al., 2010; ERDÉLYI et al., 2008; GROFF; LANCASTER, 1985),

Embora alguns estudos venham utilizando a sequência do gene E6 de OaPVs para análises, principalmente relacionadas à filogenia (LUNARDI et al., 2013b; TORE et al., 2017), as mesmas não foram depositadas nos bancos de dados. Isso também ocorre com as sequências de E1^{E4} (DOORBAR, 2013) e L2 (TORE et al., 2017). As sequências E1, E2, E5, L2, e L1 de OaPV1 foram recentemente depositadas (KARLIS et al., 2015, submissão direta). Porém, foi observada uma discrepância da proteína E2 de OaPV1 em relação a essa proteína em outros tipos virais; o NCBI foi contatado e, após análise, a mesma será atualizada (J. Mazzuchelli-deSouza, comunicação pessoal).

Em relação ao OaPV2, somente a ORF L1 foi determinada. O genoma do OaPV4 foi determinado com 7.758 kb e possui sete ORFs (E6, E7, E1, E2, E5, L2, e L1) (TORE et al., 2017).

Apesar de serem frequentemente usados na geração de árvores filogenéticas para a classificação de novos tipos virais descritos (ERDÉLYI et al., 2008; LUNARDI et al., 2013b; ZHU et al., 2013), não existem muitas informações na literatura a respeito dos OaPVs 1 e 2. Além disso, já foi documentado que papilomas são raros em ovelhas (MAXIE, 2015). O OaPV melhor descrito é o OaPV3 (GenBank ID: FJ796965), porém é classificado como pertencente ao gênero *Dyokappapapillomavirus*, relacionado a carcinomas de células escamosas em ovelhas (ALBERTI et al., 2010).

2.4.1.1.5 DELTAPAPILLOMAVIRUS 5

2.4.1.1.5.1 CAPREOLUS CAPREOLUS PAPILLOMAVIRUS TIPO 1 (CcaPV1)

O genoma completo do CcaPV1 (GenBank ID: EF680235) foi isolado e amplificado a partir de fibropapilomas de corças (ERDÉLYI et al., 2008), cujo nome científico é *Capreolus capreolus* (LINNAEUS, 1758). Originalmente, a nomenclatura recebida foi CcPV (ERDÉLYI et al., 2008), sendo também citado na literatura como RdPV ou RDPV, em referência ao nome comum do hospedeiro em inglês, “roe deer” (ERDÉLYI et al., 2008; MOAR; JARRET, 1985; MORENO-LOPEZ et al., 1987).

Com um tamanho de 8.032 pb, o genoma do CcaPV possui ORFs consideradas tipicamente de um *Deltapapillomavirus*: E6, E7, E1, E2, E4, E5, E9, L2, e L1 (ERDÉLYI et al., 2008; ERIKSSON et al., 1994).

A análise filogenética usando as ORFs E1–E2–L2–L1 concatenadas indicou que o CcaPV é um grupo irmão do grupo monofilético formado pelos *Delta*-PVs OvPV1, AaPV1 e RtPV1 (ERDÉLYI et al., 2008). Atualmente, o CcaPV é classificado como *Deltapapillomavirus* 5 (BERNARD et al., 2010), juntamente com o mais recente *Delta*-PV descrito, o *Rusa alfredi papillomavirus* (RalPV) (FUX et al., 2016).

A ORF E6 do CcaPV1 foi descrita como tendo um tamanho de 405 nucleotídeos e um produto com 134 aminoácidos (GenBank ID: ABV27560) (ERDÉLYI et al., 2008).

2.4.1.1.5.2 *RUSA ALFREDI PAPILLOMAVIRUS* TIPO 1 (RalPV1)

O mais recente tipo viral pertencente ao gênero *Deltapapillomavirus* teve sua sequência depositada em 2015 como “*Deltapapillomavirus* 5 isolate DE1641-14, complete genome” (FUX, 2015, submissão direta), sendo classificado em 2016 como *Rusa alfredi papillomavirus* 1 (RalPV1) (Gen Bank ID: KT626573) (FUX et al., 2016).

Pertencente aos *Delta*-PVs 5, juntamente com o CcaPV1 (*Capreolus capreolus papillomavirus* 1, GenBank ID: EF680235), o RalPV1 foi isolado de fibropapilomas do veado-das-filipinas (em inglês, Visayan spotted deer ou Philippine spotted deer), nome científico *Rusa alfredi* (SCLATER, 1870), com um genoma constituído por 8.029 pb e sete ORFs: E6, E7, E1, E2, E5, L1 e L2 (FUX et al., 2016).

2.4.1.1.6 *DELTAPAPILLOMAVIRUS* 6 (OU SUPOSTO *DELTA*-6)

2.4.1.1.6.1 *CAMELUS DROMEDARIUS PAPILLOMAVIRUS* TIPO 1 E 2 (CdPV1 E CdPV2)

Apesar da papilomatose em dromedários (*Camelus dromedarius*) (LINNAEUS, 1758) ter sido descrita pela primeira vez em 1990 (MUNZ et al., 1990), o genoma completo dos agentes causadores, o CdPV1 (GenBank ID: HQ912790) e o CdPV2 (GenBank ID: HQ912791) só foram sequenciados em 2011 e apresentaram 7.679 e 7.906 pb de tamanho, respectivamente (URE et al., 2011).

O DNA viral foi isolado de lesões do tipo couve-flor e de nódulos presentes nos lábios de dois dromedários, cada um apresentando um tipo de lesão. Cada amostra foi sequenciada e com base na sequência da ORF L1 concluiu-se que uma delas possui 66.3% de identidade em relação ao BPV1, sendo o novo tipo viral descrito como CdPV1, e a outra possui 64.6% de identidade em relação ao BPV1 e BPV2, sendo então o novo tipo viral descrito como CdPV2 (URE et al., 2011).

Foram identificadas, em ambos os genomas, sete ORFs (E6, E7, E1, E2, E4, L2 e L1), e sugerida a existência de uma ORF adicional (E5), além da presença das regiões conservadas na proteína E6 (URE et al., 2011).

2.4.1.1.7 SUPOSTOS TIPOS DE *DELTAPAPILLOMAVIRUS*

Embora os bancos de dados mais utilizados para análise dos papilomavírus sejam o NCBI e o “Papillomavirus Episteme” (PaVE), o órgão oficialmente responsável pela classificação dos vírus é o ICTV. De acordo com esse comitê, o último documento incluindo dados sobre os *Deltapapillomavirus* é datado de 2013, quando uma nova espécie – *Delta-6* – foi criada e o *Camelus dromedarius* papillomavírus tipo 1 foi inserido (ICTV Code 2012.008bV). Alguns tipos de papilomavírus aqui citados permanecem como não classificados em relação ao gênero ou foram classificados como *Deltapapillomavirus* por alguns autores.

Nesse trabalho, foram avaliados, principalmente, aqueles PVs que foram classificados como *Delta*-PVs pelo NCBI. A exceção foi o CdPV2 que, embora permaneça como “unclassified Papillomaviridae” pelo NCBI, é frequentemente classificado como pertencente aos *Delta-6* e usado na análise de outros tipos virais e na geração de árvores filogenéticas (LUNARDI et al., 2013a,b; VANMECHELEN et al., 2017).

Em 2013, um novo PV, nomeado *Cervus elaphus papillomavirus* type 1 (CePV1, GenBank ID: JQ744282) foi descrito e apresentou características similares às aquelas

encontradas nos *Delta*-PVs (SCAGLIARINI et al., 2013). Porém, esse tipo continua como gênero não classificado no NCBI.

O mais recente suposto tipo classificado como *Delta*-PV foi o *Giraffa camelopardalis papillomavirus* tipo 1 (GcPV1, GenBank ID: KX954132), o qual teve seu genoma completo depositado no NCBI em 2017 (VANMECHELEN et al., 2017), permanecendo como "unclassified Papillomaviridae". Por outro lado, de acordo com a árvore filogenética apresentada pelo PaVE, o GcPV1 é um *Deltapapillomavirus*.

2.5 Bioinformática

A Bioinformática, termo encontrado na literatura a partir do início dos anos 1990, é muitas vezes definida como a aplicação de técnicas computacionais para a organização e o entendimento de dados biológicos, os quais são produzidos em uma escala muito elevada graças aos avanços na ciência (COLARES, 2005; LUSCOMBE; GREENBAUM; GERSTEIN, 2001; REICHHARDT, 1999). Por exemplo, há exatos 70 anos, os americanos Stanford Moore e William H. Stein elucidaram como ocorre a ligação entre os aminoácidos, rendendo-lhes o prêmio Nobel de Química em 1972. Em 1955, o inglês Frederick Sanger completa a análise da sequência de aminoácidos da insulina bovina, a primeira proteína a ser sequenciada, além de desenvolver, em 1977, uma técnica revolucionária, o sequenciamento do DNA, rendendo-lhe os Prêmios Nobel de Química em 1958 e 1980, respectivamente (ALBERTS et al., 2004; Nobelprize.org).

Dados como sequências nucleotídicas, genes e genomas completos devem ser organizados e depositados em bancos de dados públicos, passando por um processo de curadoria e avaliação a fim de que sejam mantidos de maneira correta e adequada e permitindo fácil acesso a todos. Os principais bancos de dados públicos são o NCBI (National Center for Biotechnology Information), o EMBL (European Molecular Biology Laboratory) e o DDBJ (DNA Data Bank of Japan) (BENSON et al., 2000; BAKER et al., 2000; OKAYAMA et al., 1998; TATENO et al., 2002; WELLER et al., 2002). Já o Protein Data Bank (PDB) é um banco para depósito de estruturas tridimensionais de proteínas, RNAs e macromoléculas variadas (BERMAN et al., 2000). O desenvolvimento de métodos estatísticos, matemáticos e computacionais tem sido intenso nos últimos anos, impulsionado pela disponibilidade de um grande volume de dados biológicos. Tais métodos são de enorme importância para a análise desses dados, para a predição da

estrutura e funções dos genes, bem como para o entendimento da história evolutiva de genes e genomas e do papel funcional das diferentes proteínas (COLARES, 2005).

Proteínas são as moléculas estruturalmente mais complexas e funcionalmente mais sofisticadas que conhecemos (ALBERTS et al., 2004). Há quatro níveis de classificação estrutural de uma proteína: (i) primária, que corresponde à sequência de aminoácidos; (ii) secundária, constituída pelas α -hélices e folhas β ; (iii) terciária, correspondendo à conformação tridimensional ou dobramento; (iv) quaternária, formada pelo complexo de mais de uma cadeia polipeptídica (ALBERTS et al., 2004, LINDERSTROM-LANG, 1952).

A estrutura tridimensional (3D) de uma proteína está diretamente ligada à sua função e a lacuna existente entre a determinação da sua sequência de aminoácidos e a resolução da sua estrutura por métodos experimentais pode ser, de certa forma, resolvida por meio de métodos computacionais (XIANG, 2006).

Se por um lado cada vez mais proteínas são determinadas, aumentando a quantidade de depósitos nos bancos de dados, por outro, estruturalmente, existe um número de possibilidades de dobramento de uma proteína, estimada entre 1.000 e 10.000; ou seja, a forma terciária que os aminoácidos podem assumir é limitada, fazendo com que o número de estruturas depositadas não aumente ou até mesmo diminua (CHOTHIA, 1992; ORENGO; JONES; THORNTON, 1994; LUSCOMBE; GREENBAUM; GERSTEIN, 2001). Logo, um modelo 3D de uma proteína alvo pode ser construído a partir de proteínas que possuem relação de similaridade estrutural (GINALSKI, 2006).

A modelagem molecular comparativa por homologia possibilita a determinação da estrutura tridimensional de uma proteína partindo da sua sequência primária e usando como molde a estrutura já conhecida de uma proteína homóloga, desde que exista entre elas, pelo menos, 25% de identidade (ALTSCHUL et al, 1990; HILBERT; JAENICKE, 1993; MOONEY et al, 2011; KOLINSKI et al., 1999).

Para a modelagem molecular de estruturas tridimensionais *in silico*, o MODELLER é o programa mais usado (MARTÍ-RENO et al., 2000). Após a geração dos modelos, é necessária a validação para a escolha do melhor, levando em consideração critérios estereoquímicos. Considerando que dois átomos não podem se sobrepor, há limitação sobre os possíveis ângulos de ligação numa cadeia polipeptídica. Além disso, devemos considerar o tipo e a qualidade das ligações que formam tanto a cadeia principal quanto a cadeia lateral (ALBERTS et al., 2004).

O programa PROCHECK (LASKOWSKI et al., 1993) é um dos "softwares" que analisa

a estereoquímica da estrutura proteica, avaliando o ambiente de cada resíduo de aminoácido e da estrutura global, como os ângulos formados entre eles e suas distorções, as ligações entre os resíduos e a planaridade. A cadeia principal de um peptídeo possui três ângulos de torção: (i) ômega (ω), formado entre os átomos de nitrogênio (N) e carbono (C) do grupo carbonila; (ii) phi (ϕ), formado entre os átomos de nitrogênio (N) e carbono α ($C\alpha$) da cadeia principal; (iii) psi (ψ), formado entre o carbono α ($C\alpha$) e o carbono (C) do grupo carbonila (Figura 2). Os átomos envolvidos na formação do ângulo ômega encontram-se no mesmo plano ($\omega=180^\circ$ trans ou 0° cis) (BRANDEN; TOOZE, 1998). Os ângulos phi e psi possuem livre rotação e são os principais responsáveis por determinar a conformação de um polipeptídeo, sendo que não podem apresentar qualquer valor, pois certas combinações não são acessíveis devido ao impedimento estérico. Para a avaliação da qualidade de modelos teóricos ou experimentais de proteínas, são examinados os valores permitidos ($\phi \times \psi$), a partir de diagramas de contorno estérico chamados de gráficos de Ramachandran, os quais apontam os resíduos que se encontram nas regiões energeticamente mais favoráveis e desfavoráveis (RAMACHANDRAN; RAMAKRISHNAN; SASISEKHARAN, 1963).

Figura 2 - Ângulos de torção (ômega, phi e psi) da cadeia proteica principal.

ω : ômega, ϕ : phi, ψ : psi.

C: átomo de carbono;

H: átomo de hidrogênio;

N: átomo de nitrogênio;

O: átomo de oxigênio;

Cα em vermelho: carbono alfa;

C e O em verde: átomos do grupo carbonila; N e H em azul: átomos do grupo amina.

Fonte: <http://www.chembio.uoguelph.ca/educmat/phy456/456lec01.htm>, modificada pela autora.

Outro programa amplamente utilizado na validação dos modelos gerados é o VERIFY-3D (LÜTHY; BOWIE; EISENBERG, 1992), o qual analisa erros estruturais com o intuito de avaliar a confiabilidade de um modelo. Com base na coerência entre o modelo atômico 3D gerado e o molde é gerada uma pontuação (“score”), em relação a uma matriz elaborada a partir de uma análise estatística envolvendo as estruturas proteicas do PDB. A posição de cada resíduo do modelo 3D é caracterizada pelo seu ambiente químico, definido por três parâmetros: (i) a área do resíduo que está voltada para o interior da proteína; (ii) a área coberta por átomos polares, (iii) a estrutura secundária. O perfil obtido para cada resíduo é comparado estatisticamente com a preferência de cada um dos

20 aminoácidos por um determinado ambiente. Os valores obtidos pelo VERIFY devem ser, preferencialmente, maiores do que zero, onde uma estrutura 3D com pontuações maiores são consideradas mais adequadas do que aquelas que com escore baixo (BOWIE; LÜTHY; EISENBERG, 1991; LÜTHY; BOWIE; EISENBERG, 1992). Por fim, o Fator-G representa a média de todos os parâmetros analisados (ENGH; HUBER, 1991).

Programas computacionais como o BioEdit (HALL, 1999), o Aliview (LARSSON, 2014) e o ClustalW (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994) permitem a análise de sequências nucleotídicas e de aminoácidos, por meio de alinhamentos e geração de matrizes de similaridade, necessários para a obtenção de filogenias. As análises filogenéticas são baseadas na premissa de que os membros do mesmo grupo evoluem a partir de um ancestral comum (AMORIM, 2002) e alguns "softwares" são amplamente utilizados para a geração dessas árvores, como o MEGA (TAMURA et al., 2013) e o PhyML (GUINDON; GASCUEL, 2003). A geração de árvores filogenéticas vem permitindo a classificação de diferentes papilomavírus levando, inclusive, à revisão dos critérios adotados e das nomenclaturas utilizadas (DE VILLIERS et al., 2004; BERNARD et al., 2010).

Importantes características sobre os papilomavírus podem ser determinadas utilizando a Bioinformática, tendo como material de estudo as sequências depositadas nos bancos de dados. Como exemplo, podemos citar as análises realizadas sobre diferentes HPV's, avaliando sua filogenia direcionada ao entendimento da sua patogenicidade, incluindo as proteínas oncogênicas E6 e E7 (DAF et al., 2010); a evolução das regiões C-x-x-C conservadas nessas mesmas proteínas (VAN DOORLAER et al., 2009); a predição estrutural por homologia das proteínas E6 e E7 diferentes tipos de HPV (KUMAR et al., 2012). A partir de 2013, a predição de proteínas E6 de diferentes papilomavírus pôde ser ampliada, graças à determinação, por difração de raios-X, da estrutura das proteínas E6 de BPV1 e HPV16 (ZANIER et al., 2013).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Modelagem molecular comparativa

3.1.1. Identificação de sequências de E6 de *Deltapapillomavirus*

Foi realizada a busca no banco de dados GenBank (BENSON et al., 2000) de todas as sequências correspondentes às proteínas E6 de todos os *Deltapapillomavirus* descritos até 2017. Conforme dito anteriormente, foram avaliados, principalmente, aqueles PVs que foram classificados como *Delta*-PVs pelo NCBI. Dos 15 tipos virais aqui estudados, classificados como pertencentes a esse gênero, 13 possuem a sequência de aminoácidos da E6 determinada (AaPV1 AAA66849, BgPV1 AFQ90262, BPV1 CAB46509, BPV2 AAA66831, BPV13 AFR76812, BPV14 AKB 94037, CcaPV1 ABV27560, CdPV1 YP_004306465, CdPV2 YP_004306472, OaPV4 ASC60394, OvPV1 AAA66841, RalPV1 ALO50069, RtPV1 AAN09915) (Tabela 3 - INTRODUÇÃO).

Os genomas completos dos tipos OaPV1 (GenBank ID: U83594) e OaPV2 (GenBank ID: U83595) (DELIUS et al., 1997, submissão direta; KARLIS et al., 2000, submissão direta) estão disponíveis no GenBank. No entanto, a sequência da proteína E6 não está depositada separadamente. Assim, a fim de determiná-la, foi realizado o BLASTx (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) a partir dos genomas completos. Após identificação da superfamília correspondente, foram realizadas a anotação gênica manual e a tradução a partir da sequência de nucleotídeos. Obtida a sequência de aminoácidos, as regiões conservadas (C-x-x-C) foram identificadas e comparadas às outras sequências de E6 acima citadas.

Foi determinado que o último tipo viral a ter sua proteína modelada e avaliada seria o RalPV1. Logo, o OaPV4, o mais recente tipo viral pertencente aos *Delta*-PVs, teve sua proteína E6 avaliada em alguns aspectos, mas não modelada.

Todas as proteínas tiveram seu peso molecular e ponto isoelétrico (pI) determinados pelo programa ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) (GASTEIGER et al., 2005).

3.1.2. Identificação da proteína molde

As sequências proteicas de E6 a serem modeladas foram submetidas ao BLASTp (ALTSCHUL et al., 1990; ALTSCHUL et al., 1997) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), sendo selecionada a opção “Protein Data Bank proteins (PDB)” como base de dados

(Database”) para o alinhamento e seleção do molde. Como critério, foi estabelecido um mínimo de 25% de identidade, entre as proteínas alvo (a serem modeladas) e molde, e a maior cobertura possível.

3.1.3. Alinhamentos individuais de sequências de E6 de Deltapapillomavirus

Cada sequência de E6 a ser modelada foi alinhada à sequência do molde através do algoritmo MAFFT (KATO, 2013) no software AliView (LARSSON, 2014), sendo as alterações manuais realizadas quando necessárias.

3.1.4. Construção dos modelos de E6 de Deltapapillomavirus

O programa MODELLER6v2 (SALI; BLUNDELL, 1993) foi utilizado para construção dos modelos proteicos de acordo com a metodologia de modelagem molecular comparativa por homologia. Foram gerados 10 modelos para cada uma das 13 proteínas de E6, totalizando 130 modelos a serem avaliados, a fim de identificar a melhor representação estrutural para cada proteína considerada.

3.1.5. Validação dos modelos de E6 de Deltapapillomavirus

Os modelos gerados foram avaliados de acordo com os seus parâmetros estereoquímicos, usando o programa PROCHECK, e do escore médio 3D-1D por meio do programa VERIFY-3D (LÜTHY; BOWIE; EISENBERG, 1992), ambos disponíveis no servidor NIH MBI Laboratory for Structural Genomics and Proteomics (<http://nihserver.mbi.ucla.edu/SAVES/>). Os principais parâmetros estereoquímicos considerados para validação e escolha do melhor modelo foram: (i) Gráfico de Ramachandran; (ii) Planaridade de ligação peptídica; (iii) Distorções angulares e (iv) Qualidade estereoquímica total (Fator-G). Já o programa VERIFY-3D foi utilizado para avaliar a coerência entre a estrutura gerada e a estrutura molde, de acordo com o ambiente químico dos aminoácidos.

3.1.6. Topologia e estrutura bidimensional dos modelos de E6 dos Deltapapillomavirus selecionados

A partir do arquivo PDB de cada modelo final selecionado, o diagrama da topologia de cada proteína foi gerado utilizando o programa PDBsum, assim como as estruturas secundárias (LASKOWSKI, 2009).

3.2. Análise filogenética de proteínas E6 de *Deltapapillomavirus*

3.2.1. Conjunto de dados e Alinhamentos

A fim de realizar a análise evolutiva de proteínas E6 de todos os *Deltapapillomavirus* já descritos, todas sequências citadas em 1.1.1. foram alinhadas, incluindo um grupo externo formado pelas sequências das proteínas E6 dos tipos HPV-6 (GenBank ID: ALT54569), HPV-11 (GenBank ID: AFC88060), HPV-16 (GenBank ID: AF125673) e HPV-18 (GenBank ID: ALT54635), todas pertencentes ao gênero *Alphapapillomavirus*. Assim, foi possível a obtenção de árvores filogenéticas enraizadas.

Os alinhamentos foram realizados usando o programa PRANK - Probabilistic Multiple Alignment Kit (<http://www.ebi.ac.uk/goldman-srv/webprank/>) (LOYTYNOJA; GOLDMAN, 2005), um alinhador de alta acurácia.

*3.2.2. Análise Filogenética de E6 de *Deltapapillomavirus**

Os métodos de distância e de máxima verossimilhança foram utilizados para a obtenção das filogenias de E6 de *Deltapapillomavirus*. No primeiro caso, foi usado o programa MEGA - Molecular Evolutionary Genetics Analysis v.6.06 (TAMURA et al., 2013), com o algoritmo Neighbor-Joining (NJ) (SAITOU; NEI, 1987). Três diferentes matrizes, representando três modelos evolutivos distintos, foram testadas: (i) p-distance; (ii) Poisson e (iii) Jones-Taylor-Thornton (JTT). Todas as análises foram realizadas com 1.000 replicatas de *bootstrap*, que se trata de uma técnica estatística, cujos valores determinam o grau de suporte dos nós dos ramos (FELSENSTEIN, 1985). Todos os ramos com valores de *bootstrap* acima ou igual a 80% foram considerados bem suportados e os *gaps* foram tratados utilizando-se a opção "pairwise deletion".

O método de máxima verossimilhança (Maximum Likelihood - ML) (ALDRICH, 1997) foi usado no programa MEGA, com o modelo de substituição GTR+G+I (General Time Reversible + Gamma distribution + Invariable Sites) (TAVARÉ, 1986), com 1000 replicatas de *bootstrap*.

A tabela 4 resume os diferentes métodos e parâmetros utilizados na análise filogenética das proteínas E6 de *Deltapapillomavirus*.

Tabela 4 - Diferentes métodos e parâmetros utilizados na análise filogenética das proteínas E6 de *Deltapapillomavirus*.

Programa	Método de Análise	Modelo de substituição	Nº de replicatas
MEGA6.06	Neighbour-Joining	p-distance	1000*
MEGA6.06	Neighbour-Joining	Poisson	1000*
MEGA6.06	Neighbour-Joining	JTT	1000*
MEGA6.06	Máxima Verossimilhança	GTR+G+I	1000*

*Bootstrap

JTT: Jones-Taylor-Thornton

GTR+G+I: General Time Reversible + Gamma distribution + Invariable Sites

A visualização das árvores foi realizada de acordo com os programas utilizados na geração das mesmas.

3.3. Análise das sequências E6 com base no BPV14

3.3.1. Alinhamento das proteínas E6 dos *Bos-Deltapapillomavirus*

A identificação e a obtenção das sequências E6 dos *Bos-Delta*-PVS homólogas ao BPV14 E6 (GenBank ID: AKB94037) foram realizadas pelo algoritmo BLASTp (ALTSCHUL et al., 1990). As sequências proteicas obtidas foram alinhadas usando o algoritmo MAFFT (KATO, 2013) no software AliView (LARSSON, 2014).

3.3.2. Obtenção e alinhamento global de sequências de E6 de *Deltapapillomavirus*

A fim de compreender a história evolutiva da família proteica de E6 de papilomavírus, foi realizada uma busca no banco de dados Pfam (FINN et al., 2014). Todas as sequências de E6 de papilomavírus depositadas até 09 de junho de 2015 foram obtidas e alinhadas pelo software Clustal Omega (SIEVERS et al., 2011), com base no perfil HMM de E6 obtido no Pfam. Um rigoroso processo de inspeção visual e correção manual do alinhamento foi realizado para exclusão das sequências incompletas ou muito curtas.

3.3.3. Análise Filogenética da proteína E6 dos Papilomavírus

A árvore filogenética da família E6 de papilomavírus foi obtida através do programa MEGA6 (TAMURA et al., 2013), usando o algoritmo Neighbor-Joining, a matriz p-distance e a opção "pairwise deletion" como tratamento para os *gaps* (SAITOU; NEI, 1987). Além disso, uma árvore filogenética contendo as sequências do gênero *Alphapapillomavirus* foi gerada usando o programa MEGA6 com o algoritmo Neighbor-Joining (NJ) e p-distance como modelo evolutivo. Ambas as análises foram realizadas com 1.000 replicatas de *bootstrap* e os ramos com valores acima ou igual a 70% foram considerados.

3.4. Diagnóstico Molecular das lesões de carneiros

3.4.1. Obtenção das amostras de lesões de carneiros

Três ovinos machos (*Ovis aries*, carneiros), das raças White Dorper (Figura 3A) e Dorper (Figura 3B) tiveram lesões excisadas, sendo eles:

- O 142, raça Dorper, 8-10 meses de idade;
- O 269, raça White Dorper, 8-10 meses de idade;
- O 240, raça Dorper, 10-15 meses de idade.

Figura 3 - Ovinos (*Ovis aries*) dos quais foram retiradas as lesões cutâneas.

A: raça White Dorper; B: raça Dorper.

As lesões foram coletadas pelo veterinário de uma fazenda criadora de ovinos, localizada no estado de São Paulo (propriedade particular) com uso de bisturi e gancho

cirúrgico (Figuras 4A e 4B) e foram colocadas em recipientes próprios para coleta. As amostras foram armazenadas a -20 °C e encaminhadas ao Instituto Butantan.

Figura 4 - Retiradas as lesões cutâneas dos ovinos (*Ovis aries*).

A: uso de bisturi; B: uso de gancho cirúrgico.

3.4.2. Extração do DNA

As amostras tiveram o DNA extraído com uso do kit ilustra tissue & cells genomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare), segundo as instruções do fabricante. O DNA extraído foi quantificado com uso de espectrofotômetro e sua integridade foi avaliada em gel de agarose 1%, corado com GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium).

3.4.3. Diagnóstico por PCR

3.4.3.1. AMPLIFICAÇÃO COM OS PRIMERS GENÉRICOS (*DELTA-EPSILON*)

Foram realizadas reações utilizando iniciadores desenhados para a região L1 dos gêneros *Delta* e *Epsilonpapillomavirus* (MAEDA et al., 2007), sendo de 430 pb o tamanho do produto esperado. Os iniciadores senso e antissenso são:

(DE-F) 5' – CCAGAYTAYYTMAAAATGGC – 3';

(DE-R) 5' – ATAAMKGCTAGCTTATATTC – 3'.

As reações de amplificação foram preparadas em volume total de 25 µL, sendo 12,5 µL de Kit PCR Master Mix (Promega), 1,0 µL de cada iniciador (10 µM) e 200 ng/µL, em média, de DNA. Para o controle negativo das reações, foi adicionada água ao

invés de DNA. Além disso, para cada reação, foi amplificado um controle positivo correspondente, sendo utilizado como DNA o genoma completo dos tipos BPV1 e BPV2, previamente clonados em plasmídeo pAT (CAMPO; COGGINS, 1982).

As amplificações foram realizadas de acordo com os seguintes parâmetros: inicialização por 3 minutos a 94 °C; 40 ciclos para desnaturação por 1 minuto a 94 °C, anelamento por 1 minuto a 53 °C, extensão por 1 minuto a 72 °C; e extensão final por 5 minutos a 72 °C. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% corado com GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium).

3.4.3.2. AMPLIFICAÇÃO COM OS PRIMERS ESPECÍFICOS

Foram realizadas reações utilizando iniciadores específicos (DE CARVALHO et al., 2003) para detecção do vírus BPV2, de acordo com o resultado do sequenciamento usando os primers genéricos. O produto esperado é resultante da amplificação do gene L2 e tem tamanho aproximado de 164 pb. Os iniciadores senso e antissenso são:

(BPV2-F) 5'– GTTATACCACCCAAAGAAGACCCT – 3';

(BPV2-R) 5'– CTGGTTGCAAÇAGCTCTCTTTCTC – 3'.

As reações de amplificação foram preparadas em volume total de 25 µL, sendo 12,5 µL de Kit PCR Master Mix (Promega), 1,0 µL de cada iniciador (10 µM) e 200 ng/µL, em média, de DNA. Para o controle negativo das reações, foi adicionada água ao invés de DNA. Além disso, para cada reação, foi amplificado um controle positivo correspondente, sendo utilizado como DNA o genoma completo do BPV2, previamente clonado em plasmídeo pAT.

As amplificações foram realizadas de acordo com os seguintes parâmetros: inicialização por 3 minutos a 94 °C; 40 ciclos para desnaturação por 40 segundos a 94 °C, anelamento por 1 minuto a 60 °C, extensão por 1 minuto a 72 °C; e extensão final por 5 minutos a 72 °C. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% corado com GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium).

3.4.3.3. AMPLIFICAÇÃO COM OS PRIMERS PARA E6

Os iniciadores foram desenhados (MAZZUCHELLI-DE-SOUZA et al., 2013) a partir da sequência genômica completa do BPV2, depositadas no GenBank (*accession number* M20219). O tamanho esperado do produto é de aproximadamente 450 pb sendo, os iniciadores senso e antissenso:

(E6-2F) 5' – GAAAACCTGTATTTTCAGGGCATGGACCTGCAAAGTTTTTC – 3';

(E6-2R) 5' – GGCCTCGAGGAATCATCCAAGTTTCTA – 3'.

O DNA genômico do BPV2, previamente clonado no vetor pAT153 (CAMPO; COGGINS, 1982), foi usado como controle positivo da reação.

As reações de amplificação foram preparadas para um volume total de 25 µL, sendo 12,5 µL de Kit PCR Master Mix (Promega), 1 µL de cada iniciador (10 µM), 200 ng/µL da amostra de DNA e 9 µL, em média, de água (Nuclease Free-water), disponibilizada no kit “Master Mix”. A amplificação foi realizada a 95°C por 4 min; 30 ciclos a 95°C por 1 min, 50 °C por 30 s e 72 °C por 1 min; alongamento final a 72 °C por 5 min para completar a reação.

3.4.3.4. PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% corado com GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium). As bandas correspondentes ao produto amplificado foram cortadas do gel com auxílio de bisturi e purificadas com o kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) ou ilustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare). Os produtos da purificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2% corado com GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium).

3.4.3.5. SEQUENCIAMENTO DOS PRODUTOS DE PCR

Os produtos de amplificação foram sequenciados no Centro de Estudos do Genoma Humano (CEGH – USP). A análise das sequências obtidas foi realizada no Laboratório de Genética do Instituto Butantan, através do programa BioEdit e da ferramenta Blast do NCBI.

4. RESULTADOS

4.1. Modelagem molecular comparativa

4.1.1. Identificação de sequências de E6 de Deltapapillomavirus

Adicionalmente às sequências de E6 dos *Deltapapillomavirus* disponíveis no GenBank, as sequências aminoacídicas da E6 do *Ovis aries papillomavirus* tipos 1 e 2 (OaPV1 e OaPV2) foram determinadas a partir dos respectivos genomas completos. O BLASTx mostrou que, dentre algumas famílias de proteínas, ambos os genomas foram alinhados às sequências das proteínas correspondentes à superfamília E6 (pfam00518), sendo: (i) OaPV1, a partir do terceiro nucleotídeo como matriz de leitura (“Read frame” ou RF) possível (RF +3), pelo alinhamento da região 132-440 (Figura 5A); (ii) OaPV2, a a partir do primeiro nucleotídeo como matriz de leitura possível (RF +1), pertence à família E6 (pfam00518), pelo alinhamento da região 130-438 (Figura 5B).

Figura 5 - Genoma completo de OaPV1 e 2, traduzido em aminoácidos pelo programa BLASTx e alinhado ao banco de dados.

A: *Ovis aries papillomavirus* 1 (OaPV1); B: *Ovis aries papillomavirus* 2 (OaPV2).

O início e fim de ambos alinhamentos foram reconhecidos pelas cisteínas das regiões conservadas C-x-x-C (Figuras 6A e 6B). Com isso, foi possível, de volta ao genoma completo de cada um dos tipos, identificar o códon responsável pela tradução da metionina (M) inicial e o códon de parada, levando à identificação das supostas proteínas E6 de OaPV1 e OaPV2, ambas compostas por 123 aminoácidos.

Figura 6 - Alinhamento do genoma completo dos tipos virais OaPV1 e OaPV2 às proteínas pertencentes à família pfam00518 (E6), pelo programa BLASTx.

A: *Ovis aries papillomavirus* 1 (OaPV1); B: *Ovis aries papillomavirus* 2 (OaPV2).

Apesar de uma tentativa recente de determinar todas as ORFs do OaPV1 (NC_001789.1), a E6 não foi identificada, somente as ORFs E1, E2, E5 e L2. Além disso, foi observado que a anotação gênica da ORF E2 estava incorreta. Portanto, foi enviado um e-mail ao NCBI, com uma análise da E2 do OaPV1 e questionando as informações disponíveis no banco de dados. Como resposta, o “vírus group” concordou com a análise encaminhada e informou que será realizada uma atualização dessa sequência.

As proteínas tiveram as regiões antes, entre e depois dos domínios conservados (___C-x-x-C___C-x-x-C___) comparadas a todas as outras E6 de *Deltapapillomavirus* (Tabela 5).

O peso molecular e ponto isoelétrico (pI) de cada uma das proteínas estão apresentados na tabela 6.

Tabela 5 - Comparação do tamanho das sequências de aminoácidos antes, entre e depois das regiões C-x-x-C conservadas.

	Abreviatura do tipo viral	aa antes	CXXC---CXXC__CXXC---CXXC				aa depois	E6 (aa)*
1	AaPV1	10	29	–	35	–	29	135
	RtPV1	10	29	–	35	–	29	135
2	OvPV1	10	29	–	35	–	29	135
	OaPV1	10	29	–	29	–	29	123**
3	OaPV2	10	29	–	29	–	29	123**
	OaPV4	10	29	–	29	–	29	123
4	BPV1	16	29	–	36	–	30	137
	BPV2	16	29	–	36	–	30	137
	BPV13	16	29	–	36	–	30	137
	BPV14	39	29	–	36	–	30	164
	BgPV1	16	29	–	36	–	30	137
5	CcaPV1	10	29	–	35	–	29	134
	RalPV1	10	29	–	35	–	29	134
6	CdPV1	13	29	–	32	–	29	128
U	CdPV2	13	29	–	35	–	29	132

aa: aminoácidos; C: cisteína; X: aminoácido indeterminado.

1 a 6: Espécies de *Deltapapillomavirus*; U: não classificado.

* Total = Números apresentados na tabela + 16 aa (CXXC).

** Comprimento determinado no presente trabalho.

Tabela 6 -Determinação do peso molecular e do ponto isoelétrico (pI) das proteínas E6 de cada tipo viral pertencente ao gênero Deltapapilomavírus, pelo programa ProtParam.

	Abreviatura do tipo viral	Número de acesso no NCBI	E6 (aa)	Peso Molecular (Da)	pI teórico
1	AaPV1	AAA66849	135	15.869,5	8,72
	RtPV1	AAN09915	135	15.925,4	9,12
2	OvPV1	AAA66841	135	15.624,1	8,68
3	OaPV1	Indeterminado	123*	14.023,4	9,05
	OaPV2	Indeterminado	123*	14.058,4	9,05
	OaPV4	ASC60394	123	14.059,3	8,96
4	BPV1	CAB46509	137	15.850,4	8,75
	BPV2	AAA66831	137	15.809,2	8,88
	BPV13	AFR76812	137	15.660,2	8,92
	BPV14	AKB94037	164	19.166,9	9,16
	BgPV1	AFQ90262.1	137	15.930,6	9,22
5	CcaPV1	ABV27560	134	15.394,7	8,67
	RalPV1	ALO50069	134	15.266,5	8,36
6	CdPV1	YP_004306465	128	14.712,0	8,58
U	CdPV2	YP_004306472	132	15.250,7	9,41

aa: aminoácidos; C: cisteína; X: aminoácido indeterminado.

Da: daltons.

1 a 6: Espécies de *Deltapapillomavirus*; U: não classificado.

* Entre parênteses: primeira abreviatura usada.

** Comprimento determinado no presente trabalho.

4.1.2. Identificação da proteína molde

Os alinhamentos individuais apontaram como molde a proteína PDB 3PY7, a qual corresponde à E6 de BPV1 (ZANIER et al., 2013). Todas as proteínas apresentaram, no mínimo, 41% de identidade em relação ao molde (Tabela 7).

Tabela 7 - Dados obtidos após o alinhamento individual das proteínas E6 dos tipos virais pertencentes ao gênero *Deltapapillomavirus*.

	Abreviatura do tipo viral	E6 (aa)	Escore Total %	Cobertura %	E-value	Identidade %
1	AaPV1	135	88.6	91	3e-21	41
	RtPV1	135	98.2	91	3e-24	45
2	OvPV1	135	90.9	87	5e-22	42
3	OaPV1	123	119	98	1e-32	46
	OaPV2	123	117	98	1e-31	43
4	BPV1	137	320	100	9e-108	100
	BPV2	137	278	100	2e-91	84
	BPV13	137	281	100	5e-94	86
	BPV14	164	165	80	5e-49	56
	BgPV1	137	277	100	1e-92	85
5	CcaPV1	134	120	93	6e-33	46
	RalPV1	134	99.4	88	5e-25	43
6	CdPV1	128	95.5	97	9e-24	39
U	CdPV2	132	114	97	1e-30	46

aa: aminoácidos; C: cisteína; X: aminoácido indeterminado.

1 a 6: Espécies de *Deltapapillomavirus*; U: não classificado.

Alinhamentos contra o banco de dados pelo programa BLASTp. Todos os valores apresentados são em comparação ao PDB 3PY7, modelo apontado como resultado do alinhamento.

4.1.3. Construção dos modelos de E6 de *Deltapapillomavirus*

Foram gerados 10 modelos para cada uma das 13 proteínas de E6 (excluindo o BPV1, o qual serviu de modelo, e o OaPV4 que foi o último *Delta*-PV descrito), totalizando 130 modelos, por meio do "software" MODELLER versão 9.17.

4.1.4. Validação dos modelos de E6 de *Deltapapillomavirus*

Todos os 130 modelos gerados por meio da modelagem molecular comparativa por homologia foram analisados para a seleção do modelo mais adequado, levando em consideração o número de resíduos que se encontravam em configurações desfavoráveis do gráfico de Ramachandran (Apêndice).

Foram analisados os resíduos de aminoácidos que se apresentaram em regiões com combinações dos ângulos Φ e Ψ mais favoráveis (A, B e L, vermelho), nas regiões adicionalmente favoráveis (a, b, l e p, amarelo escuro), nas regiões generosamente favoráveis ($\sim$ a, $\sim$ b, $\sim$ l, e $\sim$ p, amarelo claro) e nas regiões desfavoráveis (região em branco). Porém, por convenção, os aminoácidos glicina e prolina foram desconsiderados, por possuírem padrões estereoquímicos diferentes dos outros resíduos (LASKOWSKI et al., 1993). As estatísticas do gráfico de Ramachandran, as distorções encontradas para cada estrutura (Tamanho das ligações, Planaridade e Distorções angulares) e os valores dos G-Factors (Overall) para cada modelo de E6 de cada um dos tipos virais foram representadas em tabelas (Anexos).

O modelo de proteína E6 escolhido para cada tipo viral está apresentado no Quadro 2.

Quadro 2 - Modelo de E6 escolhido para cada tipo viral.

Tipo viral	Modelo escolhido
AaPV1	6
BgPV1	1
BPV2	10
BPV13	5
BPV14	10
CcaPV1	8
CdPV1	6
CdPV2	8
OaPV1	3
OaPV2	9
OvPv1	10
RalPV1	1
RtPV1	4

4.1.5. Estrutura 3D de cada proteína E6 de Deltapapillomavirus modelada, topologia e estrutura bidimensional

O molde (3PY7) foi visualizado, sendo colocado de tal forma que a porção N-terminal ficasse à esquerda e a porção C-terminal à direita (Figura 7). Para cada proteína E6, tanto a estrutura dos modelos (Figura 8A' a 8L') quanto a sobreposição em relação à estrutura do molde (3PY7) (Figura 8A'' a 8L'') foram visualizadas por meio do programa PyMOL. A sobreposição gerou os valores de RMS ("Root Mean Square"). Além disso, foram gerados o diagrama da topologia (Figura 8A* 8L*) e a estrutura secundária (Figura 8A** a 8L**) de cada modelo.

Figura 7 - Visualização da estrutura tridimensional da proteína E6 de BPV1.

BPV1 PDB ID: 3PY7, usada como molde. Pontos em rosa: região C-terminal.

Figura 8 - Visualização das estruturas tridimensionais das proteínas E6.

A': Estrutura 3D de cada modelo escolhido para AaPV1; A'': Sobreposição da estrutura 3D de AaPV1 e a proteína molde (E6 de BPV1, PDB code 3PY7); A*: Topologia da E6 de AaPV1, onde os cilindros vermelhos representam alfa-hélices e as setas rosas as folhas-beta; A**: Estrutura secundária de E6 de AaPV1, onde cada espiral roxa representa uma alfa-hélice, cada seta lilás uma folha-beta e as linhas dobradas em vermelho as estruturas do tipo "hairpin". Todas as representações começam na região N-terminal e, consequentemente, terminam na região C-terminal.

B': Estrutura 3D de cada modelo escolhido para BgPV1; B'': Sobreposição da estrutura 3D de BgPV1 e a proteína molde (E6 de BPV1, PDB code 3PY7); B*: Topologia da E6 de BgPV1, onde os cilindros vermelhos representam alfa-hélices e as setas rosas as folhas-beta; B**: Estrutura secundária de E6 de BgPV1, onde cada espiral roxa representa uma alfa-hélice, cada seta lilás uma folha-beta e as linhas dobradas em vermelho as estruturas do tipo "hairpin". Todas as representações começam na região N-terminal e, consequentemente, terminam na região C-terminal.

C': Estrutura 3D de cada modelo escolhido para BPV2; C'': Sobreposição da estrutura 3D de BPV2 e a proteína molde (E6 de BPV1, PDB code 3PY7); C*: Topologia da E6 de BPV2, onde os cilindros vermelhos representam alfa-hélices e as setas rosas as folhas-beta; C**: Estrutura secundária de E6 de BPV2, onde cada espiral roxa representa uma alfa-hélice, cada seta lilás uma folha-beta e as linhas dobradas em vermelho as estruturas do tipo "hairpin". Todas as representações começam na região N-terminal e, consequentemente, terminam na região C-terminal.

D': Estrutura 3D de cada modelo escolhido para BPV13; D'': Sobreposição da estrutura 3D de BPV13 e a proteína molde (E6 de BPV1, PDB code 3PY7); D*: Topologia da E6 de BPV13, onde os cilindros vermelhos representam alfa-hélices e as setas rosas as folhas-beta; D**: Estrutura secundária de E6 de BPV13, onde cada espiral roxa representa uma alfa-hélice, cada seta lilás uma folha-beta e as linhas dobradas em vermelho as estruturas do tipo "hairpin". Todas as representações começam na região N-terminal e, consequentemente, terminam na região C-terminal.

E': Estrutura 3D de cada modelo escolhido para BPV14; E'': Sobreposição da estrutura 3D de BPV14 e a proteína molde (E6 de BPV1, PDB code 3PY7); E*: Topologia da E6 de BPV14, onde os cilindros vermelhos representam alfa-hélices e as setas rosas as folhas-beta; E**: Estrutura secundária de E6 de BPV14, onde cada espiral roxa representa uma alfa-hélice, cada seta lilás uma folha-beta e as linhas dobradas em vermelho as estruturas do tipo "hairpin". Todas as representações começam na região N-terminal e, consequentemente, terminam na região C-terminal.

F': Estrutura 3D de cada modelo escolhido para CcaPV1; F'': Sobreposição da estrutura 3D de CcaPV1 e a proteína molde (E6 de BPV1, PDB code 3PY7); F*: Topologia da E6 de CcaPV1, onde os cilindros vermelhos representam alfa-hélices e as setas rosas as folhas-beta; F**: Estrutura secundária de E6 de CcaPV1 onde cada espiral roxa representa uma alfa-hélice, cada seta lilás uma folha-beta e as linhas dobradas em vermelho as estruturas do tipo "hairpin". Todas as representações começam na região N-terminal e, consequentemente, terminam na região C-terminal.

G': Estrutura 3D de cada modelo escolhido para CdPV1; G'': Sobreposição da estrutura 3D de CdPV1 e a proteína molde (E6 de BPV1, PDB code 3PY7); G*: Topologia da E6 de CdPV1, onde os cilindros vermelhos representam alfa-hélices e as setas rosas as folhas-beta; G**: Estrutura secundária de E6 de CdPV1 onde cada espiral roxa representa uma alfa-hélice, cada seta lilás uma folha-beta e as linhas dobradas em vermelho as estruturas do tipo "hairpin". Todas as representações começam na região N-terminal e, consequentemente, terminam na região C-terminal.

H': Estrutura 3D de cada modelo escolhido para CdPV2; H'': Sobreposição da estrutura 3D de CdPV2 e a proteína molde (E6 de BPV1, PDB code 3PY7); H*: Topologia da E6 de CdPV2, onde os cilindros vermelhos representam alfa-hélices e as setas rosas as folhas-beta; H**: Estrutura secundária de E6 de CdPV2 onde cada espiral roxa representa uma alfa-hélice, cada seta lilás uma folha-beta e as linhas dobradas em vermelho as estruturas do tipo "hairpin". Todas as representações começam na região N-terminal e, consequentemente, terminam na região C-terminal.

K': Estrutura 3D de cada modelo escolhido para OvPV1; K'': Sobreposição da estrutura 3D de OvPV1 e a proteína molde (E6 de BPV1, PDB code 3PY7); K*: Topologia da E6 de OvPV1, onde os cilindros vermelhos representam alfa-hélices e as setas rosas as folhas-beta; K**: Estrutura secundária de E6 de OvPV1 onde cada espiral roxa representa uma alfa-hélice, cada seta lilás uma folha-beta e as linhas dobradas em vermelho as estruturas do tipo "hairpin". Todas as representações começam na região N-terminal e, consequentemente, terminam na região C-terminal.

L': Estrutura 3D de cada modelo escolhido para RtPV1; L'': Sobreposição da estrutura 3D de RtPV1 e a proteína molde (E6 de BPV1, PDB code 3PY7); L*: Topologia da E6 de RtPV1, onde os cilindros vermelhos representam alfa-hélices e as setas rosas as folhas-beta; L**: Estrutura secundária de E6 de RtPV1 onde cada espiral roxa representa uma alfa-hélice, cada seta lilás uma folha-beta e as linhas dobradas em vermelho as estruturas do tipo "hairpin". Todas as representações começam na região N-terminal e, consequentemente, terminam na região C-terminal.

M': Estrutura 3D de cada modelo escolhido para RalPV1; M'': Sobreposição da estrutura 3D de RalPV1 e a proteína molde (E6 de BPV1, PDB code 3PY7); M*: Topologia da E6 de RalPV1, onde os cilindros vermelhos representam alfa-hélices e as setas rosas as folhas-beta; M**: Estrutura secundária de E6 de RalPV1 onde cada espiral roxa representa uma alfa-hélice, cada seta lilás uma folha-beta e as linhas dobradas em vermelho as estruturas do tipo “hairpin”. Todas as representações começam na região N-terminal e, consequentemente, terminam na região C-terminal.

4.2. Análise filogenética das proteínas E6 dos *Deltapapillomavirus*

Todas as árvores geradas encontram-se abaixo representadas, de acordo com os parâmetros utilizados. As figuras 9, 10 e 11 apresentam as filogenias geradas pelo programa MEGA6.06, com o algoritmo Neighbor-Joining (NJ) e cada um de seus modelos evolutivos: (i) p-distance; (ii) Poisson e (iii) Jones-Taylor-Thornton (JTT), respectivamente. Em cada uma delas, são observados os ramos com valores de *bootstrap* acima ou igual a 80%.

A figura 12 também apresenta a filogenia gerada pelo programa Mega6.06, usando o método de Máxima Verossimilhança e com o modelo de substituição GTR+G+I.

Figura 9 - Árvore filogenética das proteínas E6 de *Deltapapillomavirus* por NJ e p-distance.

Árvore filogenética das proteínas E6 de *Deltapapillomavirus*, obtida pelo método de distância, usando o algoritmo de Neighbor-Joining (NJ) e a matriz p-distance. Valores de bootstrap para 1.000 réplicas acima de 80% são representados. Grupo externo representado por sequências de E6 de HPV18, HPV16, HPV11 e HPV6. Programa MEGA6.06.

Figura 10 - Árvore filogenética das proteínas E6 de *Deltapapillomavirus*, por NJ e Poisson.

Árvore filogenética das proteínas E6 de *Deltapapillomavirus*, obtida pelo método de distância, usando o algoritmo de Neighbor-Joining e a matriz de Poisson. Valores de bootstrap para 1.000 réplicas acima de 80% são representados. Grupo externo representado por sequências de E6 de HPV18, HPV16, HPV11 e HPV6. Programa MEGA6.06.

Figura 11 - Árvore filogenética das proteínas E6 de *Deltapapillomavirus*, por NJ e JTT.

Árvore filogenética das proteínas E6 de *Deltapapillomavirus*, obtida pelo método de distância, usando o algoritmo de Neighbor-Joining e a matriz de substituição JTT. Valores de bootstrap para 1.000 réplicas acima de 80% são representados. Grupo externo representado por sequências de E6 de HPV18, HPV16, HPV11 e HPV6. Programa MEGA6.06.

Figura 12 - Árvore filogenética das proteínas E6 de *Deltapapillomavirus* por Máxima Verossimilhança.

Árvore filogenética das proteínas E6 de *Deltapapillomavirus*, obtida através do método de Máxima Verossimilhança. Valores de bootstrap para 1.000 réplicas acima de 80% são representados. Modelo evolutivo GTR+G+I. Grupo externo representado por sequências de E6 de HPV18, HPV16, HPV11 e HPV6. Programa MEGA6.06.

4.3. Análises das proteínas E6 com base no BPV14

4.3.1. Alinhamento múltiplo das proteínas E6 dos *Bos-Deltapapillomavirus*

As proteínas que apresentaram maior identidade à sequência da E6 do BPV14 foram: *Bos grunniens papillomavirus* 1 (BgPV1, GenBank ID: AFQ90262), *Bos taurus papillomavirus* 1 (BPV1, PDB ID: 3PY7), *Bos taurus papillomavirus* 2 (BPV2, GenBank ID: AHY28935) e *Bos taurus papillomavirus* 13 (GenBank ID: AIN81124). Os valores de identidade estão apresentados na tabela 8.

Tabela 8 - Sequências homólogas à E6 de BPV14 proposta e seus valores de identidade com base nas sequências de aminoácidos.

E6 papillomavirus	Host species	Classification	E6 identity (%)
<i>Bos grunniens</i> papillomavirus 1 (AFQ90262)	Yak	<i>Deltapapillomavirus</i> 4	57%
<i>Bos taurus</i> papillomavirus 1 (3PY7)	Domestic cow	<i>Deltapapillomavirus</i> 4	56%
<i>Bos taurus</i> papillomavirus 13 (AIN81124)	Domestic cow	<i>Deltapapillomavirus</i> 4	56%
<i>Bos taurus</i> papillomavirus 2 (AHY28935)	Domestic cow	<i>Deltapapillomavirus</i> 4	54%

O alinhamento múltiplo mostrou a ausência dos primeiros dezoito aminoácidos (incluindo a primeira metionina do BPV14) nas sequências homólogas (BPV1, 2, 13 e BgPV1), caracterizando um evento de inserção/deleção (indel). Além disso, considerando a segunda metionina (M19) como o primeiro aminoácido, a E6 do BPV14 apresentou uma inserção de cinco (QQIYA) e quatro (KESR) aminoácidos no início e no final da sua sequência, respectivamente, totalizando uma proteína com 146 aminoácidos (Figura 13).

Figura 13 - Alinhamento múltiplo das proteínas E6 dos *Bos-Deltapapillomavirus*.

E6_Bovine_papillomavirus_14	MGISGYKSRTVIGPHNVQMDAQQIYAQLFENDNPFVGVCCCLFCRNRLSSVDVHRAKEKEL
E6_Bovine_papillomavirus_1	-----MDL-----KPFARTNPFSGLDCLWCREPLTEVDAFRCMVKDF
E6_Bos_grunniens_papillomavirus_1	-----MDL-----KKFHRQNPFEGLACLWCRNTLTEVDAFRCLVKDF
E6_Bovine_papillomavirus_13	-----MDL-----QSF SRGNPFSGLACLWCKEPLTELD AFRCMIKDF
transforming_protein_Bovine_papillomavirus_2	-----MDL-----QSF SRGNPFSGLACVWCREPLTEVDAFRCMIKDF
E6_Bovine_papillomavirus_14	NVVRREGYKFGACTDCLEECLEARERRLYKGTAVTGTEVEAQFSRKLCKIIIRCYCGTKL
E6_Bovine_papillomavirus_1	HVVI REGCRYGACTICLENCLATERRLWQGVPTGEEAELLHGKTLDRLCIRCCYCGGKL
E6_Bos_grunniens_papillomavirus_1	HVVYRDGTFKFGACTLCLEGLAKERRLWKGVPVTGEEIQLLHGKSIDRLCIRCCYCGGKL
E6_Bovine_papillomavirus_13	HVVYRNGCTFGACTPCLEGLAKERRLWKGVPVTGEEAELLHGKSLDKLCIRCCYCGGKL
transforming_protein_Bovine_papillomavirus_2	HVVYRDGVKFGACTTCLENCLDKERRLWKGVPVTGEEAQLLHGKSLDRLCIRCCYCGGKL
E6_Bovine_papillomavirus_14	SNDEKTRHELFMPEFFKTRNNIVRGRCYDCYRDGTRTRYPKESR
E6_Bovine_papillomavirus_1	TKNEKRRHVLFNPEPFCKTRANIIRGRCDCCRHGSRSKYP----
E6_Bos_grunniens_papillomavirus_1	TKNEKRRHVLFNPEPFCKTRANIIRGRCDCCRHGSRSKYP----
E6_Bovine_papillomavirus_13	TKNEKRRHVLFNPEPFCKTRANIIRGRCDCCRHGSRSKYP----
transforming_protein_Bovine_papillomavirus_2	TKNEKRRHVLFNPEPFCKTRANIIRGRCDCCRHGSRSNYP----

Analisando a região inicial das proteínas E6 dos *Delta* BPVs, foi observada a sequência F₆XRXPFSGLXC₁₇ que se inicia em uma fenilalanina (F), sendo muito similar no BgPV1 (F₆ARTNPFSGLDC₁₇). No BPV14, foi identificada a fenilalanina homóloga, porém indicando o início dessa sequência no aminoácido 29 (F₂₉ENDNPFVGVCC₄₀) e não no aminoácido 6, como nos outros tipos virais citados.

Em relação à região final dessas proteínas, os BPVs 1, 2 e 13 conservam a sequência SXYP, enquanto o BPV14 apresenta a sequência XXYP seguida de quatro aminoácidos adicionais já citados (KESR).

4.3.2. Obtenção e alinhamento global de sequências de E6 de *Deltapapillomavirus*

A busca realizada a partir da sequência da E6 do BPV14 no Pfam mostrou que a mesma pertence à superfamília E6 (Pfam ID: PF00518, “Early Protein”) sendo obtidas, inicialmente, 1.357 sequências. Após a análise e deleção das sequências muito curtas, incompletas ou alinhadas de forma muito irregular, restaram 686 sequências.

O alinhamento das 686 sequências mostrou que apenas 14% (98/686) delas apresentaram algum evento de inserção na região N-terminal, sendo que em 82% (80/98) essa inserção corresponde a sete resíduos ou menos. A única sequência que apresentou uma inserção com dezoito aminoácidos foi a proteína E6 de BPV14.

Logo, pelo alinhamento global, foi observado que outras sequências E6 de papilomavírus apresentam quatro aminoácidos correspondentes àqueles encontrados na região C-terminal da E6 de BPV14. Entretanto, a inserção na região N-terminal (QQIYA) foi encontrada somente na E6 de BPV14. Por fim, a região mais conservada observada nessa proteína foi C₄₀XXC_{43-29aa}-C₇₃XXC_{76-36aa}-C₁₁₃XXC_{116-30aa}-C₁₄₇XXC₁₅₀, similar às proteínas E6 dos *Delta*-BPVs.

4.3.3. Análise filogenética das sequências da proteína E6 dos diferentes PVs

Apesar da significativa diferença encontrada no início da sequência E6 de BPV14, a análise filogenética mostrou que a mesma forma um grupo monofilético com todos os *Delta*-PVs 4 (Figura 2). Os gêneros *Delta*-, *Tau*-, *Pi*-, *Lambda*-, *Mu*-, *Chi*- e *Betapapillomavirus* formaram grupos estatisticamente bem suportados (Figura 14).

Figura 14 - Árvore filogenética da superfamília E6 gerada por NJ.

** Clusters com várias sequências que foram agrupadas em um só ramo.

● Papilomavírus não classificado.

■ Omegapapillomavirus.

Árvore filogenética da superfamília E6 gerada a partir do método de distância, usando o algoritmo Neighbor-Joining (NJ). Valores de bootstrap para 1.000 réplicas acima de 70% são representados. Programa MEGA6.

4.3.4. Análise filogenética dos *Alphapapillomavirus*

Em relação à análise filogenética dos *Alphapapillomavirus*, todas as sequências desse gênero e uma sequência de *Omegapapillomavirus* (*Ursus maritimus* PV tipo 1, UmPV1) formaram um grupo monofilético (Figura 15).

Figura 15 - Árvore filogenética das sequências de E6 de do gênero *Alphapapillomavirus* por NJ.

** Clusters com várias sequências que foram agrupadas em um só ramo.

● Pigmy chimpanzee *Alphapapillomavirus*; ■ Common chimpanzee *Alphapapillomavirus*; ▲ *Colobus guereza*. Árvore filogenética das sequências de E6 de do gênero *Alphapapillomavirus* gerada a partir do método de distância usando o NJ. Valores de bootstrap para 1.000 réplicas acima de 70% são representados. Programa MEGA6.

As sequências de HPV58 ficaram agrupadas, constituindo um cluster, sendo esse tipo viral filogeneticamente mais próximo dos HPVs tipo 33, 67, 52, 31, 35 e 16, todos pertencentes ao *Alphapapillomavirus* 9 (Figura 15). Já o HPV 45 é mais próximo do HPV18 e ambos formam um grupo monofilético com os HPVs 97, 85, 70, 39 e 68, todos classificados como *Alphapapillomavirus* 7 (Figura 15).

As sequências dos HPVs 66, 56 e 53 foram agrupadas e constituem um grupo monofilético juntamente com o HPV30, formando o grupo correspondente às espécies classificadas como *Alphapapillomavirus* 6 (Figura 15). As espécies virais correspondentes aos outros grupos monofiléticos de *Alphapapillomavirus* (8, 1, 2, 4, 15, e 3) também estão indicadas na figura 3.

As árvores filogenéticas da família E6 de papilomavírus e do gênero *Alphapapillomavirus* encontram-se em melhor resolução e possíveis de ampliação, online, em doi:10.1016/j.vetmic.2015.09.022, link correspondente ao artigo publicado: *Bos taurus papillomavirus* (BPV) E6 protein: Sequence analysis and molecular evolution.

4.4. Diagnóstico Molecular das lesões de carneiros

4.4.1. Primers genéricos

A eletroforese do DNA genômico total mostrou sinais de degradação do material (dados não apresentados). Porém, a amplificação com uso dos primers genéricos (*Delta-Epsilon*) foi realizada, dando um direcionamento quanto às próximas etapas.

Os produtos de PCR apresentaram tamanho esperado (aproximadamente 430 pb), de acordo com os controles positivos (BPV1 e BPV2) e uma banda em menor intensidade, com aproximadamente 300 pb. As bandas foram recortadas do gel e purificadas separadamente. Todos os produtos de amplificação (430 e 300 pb) foram sequenciados. Após a análise e correções manuais das sequências (com base no cromatograma), as mesmas foram submetidas ao alinhamento (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). As três amostras analisadas (O142, O269 e O240) mostraram que as bandas maiores, ou seja, com 430 pb, correspondiam à uma parte da ORF L1 do BPV2. Já as bandas menores (300 pb) eram resultado de amplificação inespecífica, onde o sequenciamento mostrou similaridade com o genoma de *Ovis aries*, ou seja, do hospedeiro (carneiro).

O segundo sequenciamento mostrou que as três sequências consenso obtidas (forward + reverso) eram idênticas e, após correções manuais, todas apresentaram 390

nucleotídeos. O alinhamento contra o banco de dados mostrou 99% de identidade entre as sequências analisadas e o *Bos taurus papillomavirus* type 2 (BPV2) (GenBank ID MF045490) (Figura 16 A).

Foram observados três nucleotídeos diferentes (G762A; G827C; G967A) entre a sequência referência, i.e. L1 de BPV2 (MF045490) e as sequências obtidas pelo sequenciamento. Quando traduzidas em aminoácidos, uma mutação (G762A) foi silenciosa, ou seja, não gerou mudança (254R). Outras duas mutações (G827C e G967A) geraram diferentes aminoácidos (G276A e D323N) (Tabela 9).

4.4.2. *Primers específicos para BPV2*

De acordo com o resultado do sequenciamento dos produtos obtidos pela amplificação com os primers genéricos, as amostras foram submetidas à PCR usando os primers específicos para BPV2. Os produtos apresentaram aproximadamente 170 pb, conforme o esperado e o controle positivo (BPV2). Após a purificação dos produtos a partir do gel de agarose, as amostras foram sequenciadas. As sequências foram corrigidas manualmente quando necessário e a consenso (forward + reverso) se mostrou idêntica, com 128 nucleotídeos.

As sequências foram então submetidas ao alinhamento e os resultados mostraram que as três amostras analisadas (O142, O269 e O240) correspondiam à ORF L2 do BPV2 (MF045490) (Figura 16 A), com 99% de identidade. Analisando os nucleotídeos, foi observada somente uma diferença (T1329C) entre as sequências de BPV2 e as amostras. Entretanto, essa diferença se mostrou silenciosa (443F) quando a sequência de DNA foi traduzida em aminoácidos (Tabela 9).

4.4.3. *Primers específicos para a região E6 de BPV2*

Considerando a proposta da ORF E6 como um possível marcador molecular, as amostras foram submetidas à PCR usando os primers específicos para E6 de BPV2. Os produtos apresentaram aproximadamente 450 pb, de acordo com o controle positivo (BPV2). Os produtos da amplificação foram purificados a partir do gel de agarose e as amostras foram sequenciadas.

O sequenciamento, após correções manuais, mostraram que as sequências consenso eram idênticas, com 372 nucleotídeos cada e, após o alinhamentos, as mesmas

apresentaram 98% de identidade com o gene E6 de BPV2 (MF045490) (Figura 16 B). Foram identificadas seis diferenças entre as sequências de nucleotídeos (G66A; G135A; A137G; C261T; C276T; T349G), sendo que duas delas apresentaram mutações quando traduzidas em aminoácidos (K46R e S117A) (Tabela 9). Logo, foram observadas quatro mutações silenciosas (E22; L45; C87; Y92) (Tabela 9).

Figura 16 - Sequência dos genes L1 e E6 BPV2 (GenBank ID MF045490) indicando as regiões amplificadas e obtidas pelo sequenciamento de DNA.

A: Sequência completa do gene L1 de BPV2 (GenBank ID MF045490). Cinza claro: amplificação pelos primers *Delta-Epsilon*; cinza escuro: amplificação pelos primers específicos para BPV2; preto: polimorfismos. **B:** Sequência completa do gene E6 de BPV2 (GenBank ID MF045490). Cinza claro: amplificação pelos primers E6 de BPV2; preto: polimorfismos.

Tabela 9: Análise das sequências obtidas.

Primers <i>Delta-Epsilon</i>							
Nucleotídeo				Aminoácido			
Posição	Ref ₁		Amostras ₁	Ref ₂		Amostras ₁	Posição
762	G	→	A	R	=	R	254
827	G	→	C	G	≠	A	276
967	G	→	A	D	≠	N	323
Primers específicos para BPV2							
Nucleotídeo				Aminoácidos			
Posição	Ref ₁		Amostras ₂	Ref ₂		Amostras ₂	Posição
1329	T	→	C	F	=	F	443
BPV2 E6 sequencing							
Nucleotídeo				Aminoácido			
Posição	Ref ₁		Amostra ₃	Ref ₃		Amostras ₃	Posição
66	G	→	A	E	=	E	22
165	G	→	A	L	=	L	45
167	A	→	G	K	≠	R	46
261	C	→	T	C	=	C	87
276	C	→	T	Y	=	Y	92
349	T	→	G	S	≠	A	117

Ref₁: Sequência referência NCBI ID MF045490 (BPV2); Ref₂: Sequência referência NCBI ID ASA69644 (proteínas L1 de BPV2); Ref₃: Sequência referência NCBI ID ASA69637 (proteína E6 de BPV2); Amostras₁: Sequências obtidas a partir de lesões cutâneas de três ovinos diferentes (*Ovis aries*) usando os primers *Delta-Epsilon* e, posteriormente, então traduzidas; Amostras₂: Sequências obtidas a partir de lesões cutâneas de três ovinos diferentes (*Ovis aries*) usando os primers específicos para BPV2 e então traduzidas; Amostras₃: Sequências obtidas a partir de lesões cutâneas de três ovinos diferentes (*Ovis aries*) usando os primers para o gene E6 de BPV2 e, posteriormente, traduzidas.

5. DISCUSSÃO

Determinar a estrutura de uma proteína é crucial para a elucidação da sua função, possibilitando aplicações nas áreas de engenharia de proteínas, anotação genômica e desenho racional de fármacos (CHENG et al., 2012). O número de sequências proteicas depositadas nos bancos de dados tem crescido exponencialmente desde que o sequenciamento se tornou rotineiro na ciência. Entretanto, somente cerca de 1% dessas proteínas têm suas estruturas terciárias determinadas por técnicas experimentais (CHENG et al., 2012; STOLTE et al., 2015). Dos mais de 200 tipos de papilomavírus descritos (RECTOR; VAN RANST, 2013), somente dois (HPV16 e BPV1) possuem a estrutura da sua proteína E6 descrita (ZANIER et al., 2013). Assim, a modelagem molecular computacional se tornou uma ferramenta importante na tentativa de preencher a lacuna existente entre o número de sequências primárias disponíveis em bancos de dados e número de estruturas proteicas determinadas.

A sequência de aminoácidos que compõe uma proteína está diretamente relacionada à determinação de sua estrutura terciária (ALBERTS et al., 2004). Logo, a definição da sequência primária é necessária para a realização da modelagem estrutural. Dentre as quatorze espécies de *Deltapapillomavirus* descritas, duas delas (OaPV1 e OaPV2) não tinham a sequência da E6 definida no GenBank e uma (BPV14) teve sua estrutura primária analisada na presente Tese em razão da sua discrepância em relação às demais E6 descritas na literatura. Além disso, como o *Rusa alfredi papillomavirus* (RalPV) foi descrito em 2016, sua sequência de E6 foi inserida nas análises. Foi observado, posteriormente à determinação da E6 dos OaPVs 1 e 2 no presente trabalho, que ambas tinham a mesma sequência apresentada por Lunardi et al. (2013b) na análise realizada em relação às regiões conservadas dessas proteínas e do novo tipo viral descrito (BPV13). Porém, o trabalho não cita a metodologia usada na determinação da sequência dessas proteínas E6.

Os aminoácidos que compõem uma proteína têm efeito direto nas suas propriedades físicas e químicas (VOET; VOET; PRATT, 2002). Um aspecto importante em relação ao enovelamento de qualquer proteína é como seus aminoácidos polares e apolares encontram-se distribuídos, pois as moléculas hidrofóbicas tendem a se organizar de forma a minimizar o efeito de uma possível desorganização na presença de moléculas de água e as suas ligações (ALBERTS et al., 2004). Aminoácidos como fenilalanina, leucina, valina e triptofano, com características hidrofóbicas (possuem cadeia lateral apolar), tendem a evitar o contato com a água, agrupando-se no interior da molécula (ALBERTS et al., 2004). Determinar quais aminoácidos estão envolvidos na formação

de cada estrutura secundária é algo que vem sendo estudado há anos, por meio de diferentes algoritmos e testes experimentais (CHOU; FASMAN, 1978). As proteínas E6 dos *Delta*-PVs apresentam todos os 20 aminoácidos, com exceção dos tipos virais OvPV1, BPV14 e CdPV, os quais não possuem triptofano (W). Dos 20 aminoácidos padrão, o triptofano é considerado o aminoácido que aparece em menor quantidade na composição das proteínas, em média 1,4% (VOET; VOET; PRATT, 2002). Os tipos OaPV1, OaPV2, OaPV4 e CdPV1 possuem a leucina (L) como aminoácido predominante. Além destes, o BPV13 apresentou a leucina juntamente à cisteína (C) como os mais abundantes, o RalPV apresentou leucina e arginina em maior quantidade, e o BgPV1 possui os aminoácidos leucina, cisteína e arginina (R) em maior quantidade. Apesar da leucina ser considerada o aminoácido mais abundante na maioria das proteínas (VOET; VOET; PRATT, 2002), as proteínas E6 dos *Delta*-PVs apresentaram a arginina como um dos aminoácidos predominantes. A arginina é, segundo as características da sua cadeia lateral (grupo R), um aminoácido polar básico, ou seja, hidrofílico e carregado positivamente, com suas cadeias laterais totalmente protonadas em pH neutro, sendo o aminoácido mais básico ($pK_a > 13$) (BAYNES; DOMINICZAK, 2015). A arginina auxilia na interação proteína-DNA, pela capacidade de ligação à base nitrogenada guanina (LUSCOMBE; GREENBAUM; GERSTEIN, 2001). Todas as proteínas analisadas apresentaram uma elevada quantidade de cisteínas. Um dos problemas para obtenção da proteína E6 purificada e em quantidades suficientes para estudos estruturais é a alta quantidade de cisteínas porque dificulta sua solubilidade (LIU; BALEJA, 2008).

O pH no qual uma proteína apresenta suas cadeias laterais ácidas e básicas em equilíbrio, ou seja, carga neutra, é chamado ponto isoelétrico (pI); as proteínas tornam-se mais carregadas positivamente quando em pH ácido (perdendo elétrons para o meio carregado positivamente, H^+), e mais negativamente carregadas quando em pH básico (recebendo elétrons do meio carregado negativamente, OH^-) (BAYNES; DOMINICZAK, 2015). Todas as proteínas E6 de *Deltapapillomavirus* apresentaram o valor de pI básico, sendo o menor deles (pI 8,36) encontrado para o RalPV1 e o maior (pI 9,41) para o CdPV2. Logo, se a proteína E6 apresenta valores de pI altos, em meio celular neutro (caminhando para o meio ácido), ela tende a ficar positivamente carregada, adquirindo um caráter básico. A proteína E6 dos papilomavírus é uma proteína básica (MYERS; ANDROPHY, 1995), carregada positivamente (MAZZUCHELLI-DE-SOUZA et al.,

2013; NOMINÉ et al., 2006) como é esperado para proteínas com domínios para ligação aos ácidos nucleicos (NOMINÉ et al., 2006).

Em sua maioria, as proteínas E6 apresentam dois domínios “zinc finger” separados, geralmente, por 36 aminoácidos, compostos, cada um, por duas repetições C-x-x-C (BARBOSA; LOWY; SCHILLER, 1989; CHEN; HONG; ANDROPHY, 1997). Pela análise do tamanho das sequências de aminoácidos em relação às regiões conservadas C-x-x-C, é interessante notar que somente os tipos virais classificados como *Delta* 4 apresentaram 36 aminoácidos entre os domínios, corroborando com o valor determinado por Chen et al. (1997). Provavelmente, esse valor foi estabelecido exatamente porque o BPV1 e o BPV2 foram uns dos primeiros tipos a serem determinados, servindo de referência para os próximos vírus descritos. O menor comprimento de sequência entre os domínios foi observado nos tipos *Delta* 3 (OaPV1 e OaPV2), ambos apresentando 29 aminoácidos. Espécies virais pertencentes ao mesmo grupo *Delta*-PV apresentaram o mesmo comprimento de sequência entre os domínios “zinc finger”, como AaPV1 e RtPV1, ambos *Delta* 1, com sequências contendo 35 aminoácidos. Os vírus CdPV1 e CdPV2, embora classificados como pertencentes ao *Delta* 6 por alguns autores, no GenBank está documentado que somente o CdPV1 pertence a esse grupo, enquanto que o CdPV2 permanece não classificado. Pela análise das sequências conservadas, esses dois tipos foram os únicos que, apesar da possibilidade de serem classificados no mesmo grupo, apresentaram discrepância em relação a essa sequência, tendo 32 e 35 aminoácidos, respectivamente.

As repetições conservadas contam a história evolutiva dessas proteínas, onde o domínio N-terminal provavelmente emergiu de uma duplicação de um domínio ancestral e, subsequentemente, divergiu deste (VAN DOORSLAER et al., 2009). Proteínas E6 de tipos PVs que infectam aves apresentam somente um domínio “zinc finger”, o qual corresponde àqueles encontrados na região C-terminal dos PVs que infectam mamíferos (VAN DOORSLAER et al., 2009). Todas as proteínas apresentaram o mesmo comprimento entre as duas primeiras repetições (N-terminal), com 29 aminoácidos compondo esse espaçamento (C-x-x-x-C-29aa-C-x-x-C). Entre as duas repetições do segundo domínio (C-terminal), somente as proteínas *Delta* 4 (BgPV1, BPV1, BPV2, BPV13 e BPV14) apresentaram 30 aminoácidos de comprimento (C-x-x-x-C-30aa-C-x-x-C). Todas as outras proteínas E6 analisadas apresentaram 29 aminoácidos. Apesar da exceção da E6 de BPV14, a mais discrepante das proteínas dos *Delta*-PVs (discutida mais detalhadamente a seguir) e da incongruência entre CdPV1 e CdPV2, é observado um

padrão no tamanho das sequências antes e depois dos domínios conservados. Por exemplo, AaPV1 e RtPV1, ambos *Delta* 1, apresentam 10 aminoácidos antes da primeira repetição e 16 aminoácidos depois da última. Os tipos virais OaPV1, OaPV2 e OaPV4 apresentam a proteína E6 mais simétrica de todas, com 10 aminoácidos iniciais e finais, e 29 aminoácidos entre cada uma de cada repetição C-x-x-C (10aa-C-x-x-C-29aa-C-x-x-C-29aa-C-x-x-C-29aa-C-x-x-C-10aa). Logo, apesar de ser estabelecido que a L1 é a proteína mais conservada sendo, por esse motivo, utilizada na classificação dos PVs (BERNARD et al., 2010; CHAN et al., 1995; DE VILLIERS et al., 2004; FAUQUET et al., 2005), é observado um padrão de conservação entre as proteína E6 dos *Deltapillomavirus*, especificamente na subdivisão desse gênero.

De todas as proteínas depositadas nos bancos de dados, incluindo as duas proteínas E6 determinadas até o momento, a E6 do BPV1 (PDB ID: 3PY7) foi aquela que apresentou maior identidade e cobertura para ser utilizada como molde na modelagem de todos os tipos virais pertencentes aos *Delta*-PVs. Como o mínimo de identidade encontrada foi de 39% (CdPV1 X 3PY7), a E6 do BPV1 foi usada como molde para todas as outras proteínas E6, por apresentar o mínimo necessário (25%) de identidade que permite a utilização do método de Modelagem Molecular Comparativa por Homologia (ALTSCHUL et al, 1990; HILBERT; BÖHM; JAENICKE, 1993; MOONEY et al, 2011; KOLINSKI et al., 1999). O RalPV teve sua E6 modelada nessa Tese. No entanto, todos os novos tipos virais que surgiram posteriormente na literatura não foram inseridos, já que isso implicaria a necessidade de alteração do alinhamento global e das demais análises. Logo, as proteínas E6 do OaPV e dos supostos novos tipos pertencentes ao gênero *Delta*-PV não foram modeladas.

O processo de modelagem, além da obtenção da sequência proteica, da identificação do molde e da construção de diferentes possíveis estruturas tridimensionais, necessita da validação dos modelos para a escolha do melhor e único modelo final (MARTÍ-RENOM et al., 2000). É necessário avaliar quais resíduos se encontram em regiões consideradas “permitidas” e “não permitidas”, devido ao fato de que alguns valores obtidos para os ângulos formados entre os átomos não são possíveis (BRANDEN; TOOZE, 1998; LASKOWSKI et al., 1993). Para tal, o PROCHECK é o programa mais utilizado na avaliação dos parâmetros estereoquímicos (LASKOWSKI et al., 1993). Um bom modelo, de acordo com o gráfico de Ramachandran gerado pelo PROCHECK, apresenta mais de 90% dos seus resíduos na região “mais favorável”, e o mínimo de resíduos na região “desfavorável” (RAMACHANDRAN; RAMAKRISHNAN;

SASISEKHARAN, 1963; LASKOWSKI et al., 1993). Os resíduos de glicina, os quais são encontrados muitas vezes nas regiões desfavoráveis, são desconsiderados, por possuírem apenas um átomo de hidrogênio como cadeia lateral, o que amplia muito o seu raio de giro e leva a padrões padrões estereoquímicos muito diferentes dos demais aminoácidos; outro caso especial se refere à prolina, por se tratar do único aminoácido capaz de fazer ligações cis e trans (HOVMÖLLER, ZHOU, OHLSON, 2002; LASKOWSKI et al., 1993). Além disso, outros fatores devem ser também analisados para a escolha do melhor modelo, entre eles o tamanho das ligações entre os resíduos e outras distorções angulares (SALI; BLUNDELL, 1993). Com isso, conforme apresentado nos resultados, cada tipo viral teve sua proteína E6 modelada e o melhor modelo foi escolhido com base nos critérios acima discutidos.

Uma proteína é formada por uma longa cadeia de aminoácidos, sendo eles de 20 tipos diferentes de acordo com suas características químicas, existindo milhares de proteínas diferentes, cada uma com sua sequência polipeptídica específica, formando uma cadeia principal (ALBERTS et al., 2004). Apesar da conformação final de cada proteína ser única, existem padrões frequentemente encontrados na formação dessas estruturas, são as chamadas α -hélices e folhas β (ALBERTS et al., 2004). Em relação às estruturas secundárias presentes na porção N-terminal, dez proteínas E6 (AaPV1, BgPV1, BPV2, BPV13, BPV14, CcaPV1, OaPV1, OaPV2, OvPV1 e RtPV1) apresentaram um padrão composto por β_1 - α_1 - β_2 - β_3 - α_2 ; o CdPV1 não apresentou a primeira folha β , sendo suas estruturas secundárias α_1 - β_1 - β_2 - α_1 ; e o CdPV2 foi a espécie viral que apresentou menor número dessas estruturas, sendo α_1 - β_1 - β_2 (Figura 17).

A porção C-terminal das proteínas E6 modeladas, em relação às estruturas secundárias α -hélice e folha β , apresentou maior variação entre as espécies virais do que a porção N-terminal. Os tipos virais modelados classificados como *Deltapapillomavirus* 4 (BgPV1, BPV2, BPV13 e BPV14) mostraram um padrão estrutural na porção C-terminal, sendo composto por β_4 - α_3 - β_5 - α_4 - β_6 - α_5 - β_7 . A terceira α desse padrão, ou seja, a quinta α -hélice da estrutura total (α_5), é a menor hélice de todas essas proteínas e encontra-se entre uma estrutura “beta hairpin” formada pelas folhas β_6 e β_7 (Figura 17). Os tipos OaPV1 e OaPV2, ambos *Delta* 3, apresentaram β_4 - β_5 - α_3 - β_6 - β_7 , sendo que o CdPV1 (*Delta* 6) também apresentou essas estruturas (Figura 17). Os tipos AaPV1 e RtPV1, classificados como *Delta* 1, possuem β_4 - α_3 - α_4 - β_5 , porém o CcaPV1, classificado como *Delta* 5, mostrou essas mesmas estruturas secundárias na sua porção C-terminal (Figura 17). O OvPV1, único PV classificado como *Delta* 2 e o RalPV1, mais novo membro dos

Delta-5, mostraram uma região C-terminal diferente de todos os outros tipos virais, terminada em uma α -hélice, composta por β_4 - α_3 - α_4 - β_5 - α_5 (Figura 17).

A α -hélice é a estrutura secundária mais encontrada em proteínas e provavelmente tem um papel importante nos primeiros estágios de dobramento e formação da estrutura terciária (STICKLE et al., 1992). Porém, dentre as 12 estruturas de E6 modeladas, somente o CdPV2 e o OvPV1 apresentaram o mesmo número de α -hélices e folhas β , (4 e 5, respectivamente) (Figura 17). Todas as outras proteínas E6 apresentaram um número de folhas β maior do que α -hélices.

Figura 17 – Análise das estruturas secundárias das proteínas E6 dos *Deltapapillomavirus*. Estruturas secundárias

Espécie	Tipo	N-terminal	C-terminal
1	AaPV1	β_1 - α_1 - β_2 - β_3 - α_2	β_4 - α_3 - α_4 - β_5
	RtPV1	β_1 - α_1 - β_2 - β_3 - α_2	β_4 - α_3 - α_4 - β_5
2	OvPV1	β_1 - α_1 - β_2 - β_3 - α_2	β_4 - α_3 - α_4 - β_5 - α_5
3	OaPV1	β_1 - α_1 - β_2 - β_3 - α_2	β_4 - β_5 - α_3 - β_6 - β_7
	OaPV2	β_1 - α_1 - β_2 - β_3 - α_2	β_4 - β_5 - α_3 - β_6 - β_7
4	BPV2	β_1 - α_1 - β_2 - β_3 - α_2	β_4 - α_3 - β_5 - α_4 - β_6 - α_5 - β_7
	BPV13	β_1 - α_1 - β_2 - β_3 - α_2	β_4 - α_3 - β_5 - α_4 - β_6 - α_5 - β_7
	BPV14	β_1 - α_1 - β_2 - β_3 - α_2	β_4 - α_3 - β_5 - α_4 - β_6 - α_5 - β_7
	BgPV1	β_1 - α_1 - β_2 - β_3 - α_2	β_4 - α_3 - β_5 - α_4 - β_6 - α_5 - β_7
5	CcaPV1	β_1 - α_1 - β_2 - β_3 - α_2	β_4 - α_3 - α_4 - β_5
	RaIPV1	β_1 - α_1 - β_2 - β_3 - α_2	β_4 - α_3 - α_4 - β_5 - α_5
6	CdPV1	α_1 - β_1 - β_2 - α_2	β_4 - β_5 - α_3 - β_6 - β_7
Unclassified	CdPV2	α_1 - β_1 - β_2	α_2 - β_3 - α_3 - α_4 - β_4

α : alfa hélices; β : folhas beta. Unclassif: não classificado quanto à espécie.

Pela análise filogenética com base na sequência das proteínas E6 dos *Deltapapillomavirus*, as árvores geradas usando o algoritmo Neighbor-Joining (NJ) mostraram-se idênticas quando aplicados os modelos de substituição p-distance e Poisson, com pouca variação em relação ao número suporte estatístico (*bootstraps*) (Figura 18).

Figura 18 - Comparação entre as árvores filogenéticas geradas por Neighbor-Joining + p-distance e Neighbor-Joining + Poisson, com base nas sequências das proteínas E6.

Os números na vertical indicam as espécies de *Deltapapillomavirus*, determinados com base nas sequências das ORFs L1, ou seja, *Delta-PVs* 1 a 6.

Os tipos BPV2 e BPV13 formaram um grupo monofilético em todas as árvores apresentadas (Figuras 18 e 19), em concordância à análise realizada por Lunardi et al. (2013a, 2013b) baseada na sequência de nucleotídeos de L1. Somente na árvore gerada por Máxima Verossimilhança esse clado não foi suportado (*bootstrap* < 80%) (Figura 20). As mesmas árvores apresentaram algumas modificações no que diz respeito ao suporte de grupos monofiléticos.

Figura 19 - Comparação entre as árvores filogenéticas geradas por Neighbor-Joining + p-distance e Neighbor-Joining + JTT, com base nas sequências das proteínas E6.

Os números na vertical indicam as espécies de *Deltapapillomavirus*, determinados com base nas sequências das ORFs L1, ou seja, *Delta*-PVs 1 a 6. Círculos contínuos em preto: diferenças encontradas; círculos pontilhados em cinza: semelhanças encontradas.

Figura 20 - Comparação entre as árvores filogenéticas geradas por Neighbor-Joining + p-distance e Máxima Verossimilhança, com base nas sequências das proteínas E6.

Os números na vertical indicam as espécies de *Deltapapillomavirus*, determinados com base nas sequências das ORFs L1, ou seja, *Delta*-PVs 1 a 6. Círculos contínuos em preto: diferenças encontradas; círculos pontilhados em cinza: semelhanças encontradas.

Todas árvores filogenéticas apresentaram o BPV1 como grupo irmão ao clado formado pelos tipos BgPV1[BPV2,BPV13], com alto suporte estatístico (*bootstrap* = 100%). Lunardi et al. (2013a) descreveram o BPV13 e Zhu et al. (2013) descreveram o BgPV1 e, pela análise da sequência de nucleotídeos da ORF L1, os autores mostraram que o BPV1 e o BPV2 formavam um grupo monofilético. No entanto, o primeiro trabalho não inseriu o tipo viral descrito pelo segundo e vice e versa, possivelmente em razão dos dois trabalhos terem sido publicados em datas próximas (Figuras 21 e 22).

Figura 21 - Comparação entre as árvores filogenéticas geradas por Máxima Verossimilhança, com base nas sequências da ORF L1 por Lunardi e colaboradores e das proteínas E6 dos *Deltapapillomavirus*.

Os números na vertical indicam as espécies de *Deltapapillomavirus*, determinados com base nas sequências das ORFs L1, ou seja, *Delta*-PVs 1 a 6. Círculos pontilhados em preto: *Delta*-PVs 4.

Figura 22 - Comparação entre as árvores filogenéticas geradas por Máxima Verossimilhança, com base nas sequências da ORF L1 por Zhu e colaboradores e das proteínas E6 dos *Deltapapillomavirus*.

Os números na vertical indicam as espécies de *Deltapapillomavirus*, determinados com base nas sequências das ORFs L1, ou seja, *Delta*-PVs 1 a 6. Círculos pontilhados em preto: *Delta*-PVs 4.

Erdélyi et al. (2008) geraram uma árvore usando o algoritmo Neighbor-Joining (NJ) com base nas ORFs E1, E2, L2 e L1 concatenadas e também mostraram um grupo monofilético formado pelos BPV1 e 2, onde não foram incluídos o BPV13 e o BPV1, ainda não descritos (Figura 23). No presente trabalho, com base nas sequências da proteína E6, nós mostramos um grupo monofilético formado por todos esses tipos acima citados (Figura 23).

Figura 23 - Comparação entre as árvores filogenéticas geradas por Neighbor-Joining, com base nas sequências da ORF L1 por Érdelyi e colaboradores e das proteínas E6 dos *Deltapapillomavirus*.

Os números na vertical indicam as espécies de *Deltapapillomavirus*, determinados com base nas sequências das ORFs L1, ou seja, *Delta*-PVs 1 a 6. Círculos pontilhados em preto: *Delta*-PVs 4.

O BPV14, pela análise filogenética da sequência de aminoácidos da E6, sempre formou um grupo irmão com aquele formado pelos tipos virais BPV1[BgPV1[BPV2,BPV13]], altamente suportado, com valores de bootstrap entre 91-97%. Este grupo monofilético está em concordância com a classificação destes cinco *Bos*-PVs, pertencentes ao *Deltapapillomavirus* 4 (BERNARD et al., 2010, LUNARDI et al., 2013a; ZHU et al., 2103; MUNDAY et al., 2015b).

O OaPV1 e o OaPV1 formaram um grupo monofilético em todas as análises filogenéticas, com valor de *bootstrap* igual a 100%. O mesmo resultado foi observado em outros trabalhos, usando a sequência da ORF L1, com suporte de 99-100% de *bootstrap*, sendo ambos classificados como *Delta* 3 (LUNARDI et al., 2013a; ZHU et al., 2103). Narechania et al. (2004) obtiveram o mesmo resultado em uma árvore gerada por Máxima Parcimônia, usando as ORFs E6, E7, E1, E2, L2 e L1 concatenadas. Além disso, nas análises aqui apresentadas, os OaPVs 1 e 2 formaram um grupo irmão (não suportado) ao grupo monofilético dos *Delta* 4, com exceção da árvore gerada por Máxima Verossimilhança.

O AaPV1 e o RtPV1 (*Delta 1*) formaram, em todas as árvores aqui analisadas, um grupo monofilético suportado (*bootstrap* entre 94-98%) e, ambos formaram um grupo monofilético com o único representando dos *Delta 2*, o OvPV1 (*bootstrap* entre 87-99%). Os dados corroboram a análise realizada por outros autores que utilizaram ORFs desses mesmos tipo virais (LUNARDI et al., 2013a; NARECHANIA et al., 2004; ZHU et al., 2103). O grupo formado por estes três tipos virais citados formaram um grupo junto ao CcaPV1 (*Delta 5*), suportado somente na árvore gerada pelo algoritmo Neighbor-Joining com JTT como modelo de substituição (*bootstrap* = 84%), sendo que o mesmo resultado foi obtido usando a ORF L1 e o método de Máxima Verossimilhança (LUNARDI et al., 2013a, b; ZHU et al., 2013), bem como as ORFs E1, E2, L2 e L1 concatenadas e o algoritmo Neighbor-Joining (ERDÉLYI et al., 2008).

Com exceção da árvore NJ com JTT como modelo de substituição, o CdPV1 sempre formou um grupo junto àquele anteriormente citado, formado pelos tipos CcaPV1[OvPV1[AaPV1,RtPV1]] e o CdPV2 sempre se mostrou externo a todos os outros *Delta*-PVs. Esta foi a principal diferença encontrada em relação a outros estudos, nos quais o CdPV1 e o CdPV2 formaram um grupo monofilético bem suportado, sendo classificados como *Delta 6*, formando ainda um grupo irmão a todos os outros *Delta*-PVs (LUNARDI et al., 2013a, b; ZHU et al., 2013).

van Doorslaer (2013) enfatiza a incongruência constantemente encontrada quando comparadas árvores geradas para sequências tardias (L) e precoces (E). Porém, as análises mostraram que a sequência de aminoácidos de diferentes E6 agrupou os tipos virais classificados como pertencentes ao mesmo gênero, sendo observadas pequenas alterações. Dessa forma, a E6 pode ser considerada um bom marcador molecular e auxiliar na classificação dos PVs. Garcia-Vallvé e colaboradores sugerem que os membros de alguns gêneros, como *Alpha*, *Beta*, *Gamma*, *Delta*, *Kappa*, *Lambda* e *Mupapillomavirus* sempre agrupam, independentemente de qual região do genoma é analisada (GARCIA-VALLVÉ; ALONSO; BRAVO, 2005). Resultados semelhantes foram encontrados utilizando a sequência de aminoácidos de diferentes E6 (MAZZUCHELLI-DE-SOUZA et al., 2015).

Estudos mostram que as proteínas dos PVs, tais como E1, E2, E6, E7, L1 e L2 evoluíram de forma ligeiramente diferente (GARCIA-VALLVÉ; ALONSO; BRAVO, 2005; Van DOORSLAER; BURK, 2010), sugerindo que análises evolutivas baseadas em ORFs concatenadas devem ser interpretadas com cuidado e que árvores geradas baseadas em um único gene são mais propensas a contar a história evolutiva desse gene, e não dos

papilomavírus como um todo (VAN DOORSLAER, 2013). Por outro lado, como na teoria, um vírus deve possuir pelo menos o aparato (LCR, E1, E2, L2 e L1) para desempenhar funções básicas como replicação, transcrição e montagem viral, a expansão desse arsenal viral pela obtenção das proteínas E6 e E7, a partir de uma protoproteína, adaptadas a diferentes funções, tornou os PVs especializados, permitindo seu alcance a diferentes nichos (DAF; JENA; KUMAR, 2010; VAN DOORSLAER, 2013; GOTTSCHLING et al., 2007; GARCIA-VALLVE; ALONSO; BRAVO, 2005). Logo, a evolução das ORFs e consequentemente de suas proteínas está diretamente relacionada à evolução viral. Nem todo *Gamma* PV contém E6; nenhuma das espécies de *Xipapillomavirus* apresentam essa ORF; no gênero *Upsilonpapillomavirus*, todos os seus representantes possuem a ORF E6, mas nenhum deles possui as ORFs E5 e E7; e nos gêneros *Deltapapillomavirus* e *Kappapapillomavirus*, todos os tipos virais expressam as três oncoproteínas E5, E6 e E7 (VAN DOORSLAER, 2013).

van Ranst et al. (1992b) geraram uma árvore filogenética por Máxima Parcimônia com base nas sequências nucleotídicas de E6, a fim de avaliar a classificação dos papilomavírus humanos (*Alpha*-PVs) associada à sua capacidade de infectar diferentes tecidos, tendo como grupo externo a ORF E6 de BPV1 (*Delta*-PV). O contrário foi realizado nas árvores aqui geradas, onde os *Alpha*-PVs serviram como grupo externo, sendo: (i) HPVs tipo 6 e 11, classificados como de baixo risco, os quais sempre formam um grupo monofilético; (ii) os HPV tipo 16 e 18, de alto risco, que também formaram um grupo bem suportado estatisticamente em todas as árvores. Os dois grupos formados pelos *Alpha*-PVs sempre ficaram externos a todos os *Delta*-PVs analisados.

A proteína E6 apresentou um elevado grau de conservação tanto em relação à sua sequência de aminoácidos, quanto à sua estrutura secundária e evolução, principalmente, para os tipos de PVs pertencentes às subdivisões dos *Deltapapillomavirus*, podendo essas características serem exploradas para outros gêneros.

Os alinhamentos múltiplos das E6 de *Delta*-BPV E6 levam à conclusão de que há uma sequência consensual característica nesses gêneros: MDX(QQIYA)XXFXRXNPFSGLXC-116-XXYP, onde QQIYA representa um evento de “indel” na proteína E6 do BPV14. Apesar das diferenças encontradas entre as sequências, a análise filogenética agrupou o BPV14 aos outros *Delta*-BPVs, corroborando os resultados encontrados por Munday e colaboradores (MUNDAY et al., 2015).

Alguns estudos já demonstraram que os 20 aminoácidos iniciais da sequência de HPV16 (N-terminal) estão envolvidos com a degradação da proteína supressora de tumor p53 e variações nessa região são capazes de modificar essa função (FOSTER et al., 1994; CROOK et al., 1991). A região C-terminal se mostrou menos importante mas também relacionada à degradação da p53 (FOSTER et al., 1994). Os últimos 20 aminoácidos da proteína E6 (C-terminal) estão envolvidos com a ativação da resposta imune humana às infecções por HPV, constituindo um mecanismo pelo qual as células de tumor conseguem driblar o sistema imune (ELLIS et al., 1995; BARTHOLOMEW et al., 1994; MÜLLER et al., 1990). Além disso, é importante lembrar que os *Delta*-PVs são capazes de ultrapassar a barreira espécie-específica, causando o sarcóide equino, sendo que essa habilidade parece contribuir para a evolução dos PVs (GOTTSCHLING et al., 2007; RECTOR et al., 2005; MYERS et al., 1996). Consequentemente, variações na sequência da proteína E6, como aquelas encontradas na proteína do BPV14 descrita por Munday et al. (2015b), podem ter um impacto significativo na sua função.

Mais de 100 tipos de HPVs já foram descritos e mais de 100 tipos virais não humanos estão disponíveis GenBank (RECTOR; VAN RANST, 2013). As análises aqui apresentadas evidenciam a evolução molecular dos HPVs bem como de outros tipos, com base nas sequências de E6 analisadas. Conforme esperado para um bom marcador molecular, os resultados gerais concordam com aqueles baseados na sequência de L1 (GARCÍA-PÉREZ et al., 2013; NARECHANIA et al., 2005), tradicionalmente usadas para a classificação dos papilomavírus. Os resultados também vão ao encontro de estudos usando as ORFs E2, E1 e L2 concatenadas (GARCÍA-PÉREZ et al., 2014; GOTTSCHLING et al., 2007; HERBST et al., 2009) ou com seis ORFs concatenadas (E6–E7–E1–E2–L2–L1) (NARECHANIA et al., 2005).

Pela análise filogenética, todas as sequências de *Alphapapillomavirus* formaram um grupo monofilético, o qual incluiu o UmPV1 (*Ursus maritimus* PV1) pertencente ao gênero *Omegapapillomavirus*. Stevens et al. (2008) mostraram um padrão similar usando a sequência de L1 como marcador molecular. Logo, todos esses resultados indicam que o UmPV1 definitivamente não se agrupa aos PVs de outros carnívoros.

Os dados filogenéticos apresentados para os *Alphapapillomavirus* corroboram os resultados usando a sequência de L1 (NARECHANIA et al., 2005). Especificamente em relação aos *Alphapapillomavirus* 9, as análises concordam com àquelas realizadas por Chen et al. (2011), um dos responsáveis pela elaboração dos critérios de classificação e nomenclatura dos PVs.

O critério de classificação tradicional dos papilomavírus é, por convenção, baseado nas sequências de L1 (DE VILLIERS et al., 2004). Entretanto, recentemente, a sequência do genoma completo dos PVs ou de suas ORFs vêm sendo usadas (CHEN et al., 2013, 2011; SCHIFFMAN et al., 2005), principalmente em relação à determinação de linhagens e sublinhagens. Estudos comparativos usando E6, L1 ou a combinação das ORFs E6–E7–L1 já apresentaram árvores filogenéticas com relações similares ou idênticas às aquelas baseadas somente em L1 (CHAN et al., 1995; VAN RANST et al., 1992a, 1992b). É interessante que o padrão evolutivo aqui apresentado, com base em uma sequência de aminoácidos, usando a proteína E6 de PVs, é compatível com esses resultados já apresentados, o que significa que a E6 pode, de fato, ser um marcador molecular bastante útil.

Dentre as diferentes possibilidades de vacinação contra os papilomavírus, incluindo no campo veterinário, encontram-se: vacina autógena, vacina a partir do extrato de verrugas maceradas, vacinas utilizando vírus purificados, proteínas recombinantes expressas, por exemplo, em sistema bacteriano e vacinas baseadas em VLPs (revisado por NICHOLLS; STANLEY; 2000). As VLPs (“virus like particles”) de L1 constituem uma alternativa para a produção de vacinas profiláticas (LIU et al., 1998). A última geração de vacinas contra o papilomavírus humano (Gardasil 9®, Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, New Jersey) é baseada na produção de VLPs em células eucariotas (leveduras) e visa a proteção contra os HPV tipo 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58 (Merck Vaccines). Em relação às vacinas terapêuticas, onde principalmente as oncoproteínas E6 e E7 são alvos para esse tipo de abordagem vacinal, nenhum produto foi aprovado até o momento. Analisando os resultados obtidos pela análise das sequências das proteínas E6 e a árvore filogenética gerada, especificamente no que diz respeito ao HPV, como dito anteriormente, foi possível observar que os tipos virais formaram grupos monofiléticos, classificando-os de acordo com o que se espera quando analisadas as sequências de L1. Com isso, concluir que a E6 é um bom marcador molecular, sugere sua utilização na produção de vacinas terapêuticas, uma vez que a cobertura por ela conferida (Figura 24 B) seria a mesma apresentada pela vacina contra o HPV (Figura 24 A).

Figura 24 – Comparação entre os tipos virais da vacina Gardasil 9® e aqueles analisados de acordo com a sequência da proteína E6.

A: Representação das VLPs dos tipos virais contra os quais a vacina Gardasil 9® é produzida, mostrando a relação filogenética entre eles, o que confere sua cobertura monovalente. Figura modificada a partir da divulgação da Merck. B: Fragmentos da árvore filogenética gerada no presente trabalho, com base nas sequências da proteína E6 dos diferentes tipos de HPV. *Tipos de HPV classificados como *Alphapapillomavirus* 9; *Tipos de HPV classificados como *Alphapapillomavirus* 10; *Tipos de HPV classificados como *Alphapapillomavirus* 7. A classificação é feita de acordo com as sequências de L1. Gardasil 9® é fabricada pela Merck Sharp & Dohme Corp., uma subsidiária da Merck & Co., Inc., com sede em Whitehouse Station, New Jersey.

Especificamente em relação à proteína E6 do BPV14, considerando as análises comparativas aqui apresentadas e seu potencial para produção de vacinas terapêuticas, é fundamental que sejam realizados estudos adicionais. Adicionalmente, seria interessante avaliar o impacto dos eventos de inserção/deleção indicados nessa Tese, principalmente no que diz respeito ao impacto na estrutura tridimensional de E6. Logo, análises evolutivas e estruturais de proteínas E6 podem auxiliar na compreensão e elaboração de novas estratégias para a concepção de medicamentos. Esse trabalho corresponde à maior análise filogenética das proteínas E6 de papilomavírus (até a data de sua publicação) já realizada, considerando o número de sequências (686) analisadas.

A descrição de novos tipos de vírus é de fundamental importância para o desenvolvimento de novos estudos. Várias oncoproteínas, tais como E6 e E7, são alvos para novas vacinas terapêuticas devido ao seu papel nos processos de proliferação e de transformação celular. Portanto, é essencial que suas sequências primárias sejam bem

determinadas e validadas, auxiliando na compreensão da função das proteínas, bem como no impacto causado por qualquer variação na sequência.

Desde 2005, o Brasil introduziu as raças de ovinos Dorper e White Dorper em seu rebanho (ASPACO). A raça Dorper é considerada uma "raça nova", desenvolvida em 1942, na África do Sul, pelo cruzamento entre Dorset × Persian; e a White Dorper é resultado do cruzamento entre Dorset × Persian e Dorset Horn × Van Rooy (MILNE, 2000). Foram observadas lesões cutâneas em animais dessas duas raças, Dorper e White Dorper, pertencentes ao rebanho de uma fazenda localizada no estado de São Paulo. Após o diagnóstico molecular, foram identificadas pela primeira vez sequências de DNA de BPV em ovinos.

Quando as sequências de aminoácidos foram analisadas, algumas mutações mostraram-se silenciosas. Foi observado que, no genoma dos papilomavírus, as mutações são fixadas numa taxa muito baixa e que as proteínas essenciais ao ciclo viral (L1, L2, E1, E2) não fixam facilmente as mutações (VAN DOORSLAER, 2013b). A proteína E6 é considerada uma proteína adaptativa, bem como a E5 e a E7, e os *Delta*-PVs foram um dos únicos gêneros que "ganharam" essas ORFs e consequentemente traduzem estas oncoproteínas, conferindo uma característica evolutiva diferencial a eles (VAN DOORSLAER, 2013b). Essas observações mostram a importância de amplificar e analisar proteínas tanto estruturais (L1) quanto não estruturais (E6) e suas ORFs.

O BPV2 é amplamente estudado por ser o agente causador de câncer de bexiga em bovinos (FREITAS et al., 2003; WOSIACKI et al., 2005), o que comumente leva à hematúria enzoótica crônica (MAXIE; NEWMAN, 2007). Neste trabalho, nós mostramos o BPV2 como agente causal de lesões em bovinos. Em adição, essa é a primeira vez que o DNA de lesões a partir das raças Dorper e White Dorper são analisadas por sequenciamento. Com uma crescente produção anual, a carne de ovinos é uma das mais consumidas no mundo, juntamente com a bovina, de porco e de frango (AHDB Beef & Lamb). Aqui são apontados dois fatores emergentes: a presença de papilomatose em carneiros - o que não é comum, e o BPV2 infectando esses animais.

É sabido que os *Deltapapillomavirus* BPVs (BPV1, 2, 13 e 14) têm a capacidade de infectar outros animais que não seu hospedeiro natural (bovinos), tais como cavalos (LUNARDI et al., 2013a), antas (KIDNEY; BERROCAL, 2008), zebras, girafas, antílopes (VAN DYK et al., 2011), búfalos (PANGTY et al., 2010), iaques (BAM et al., 2013) e até mesmo gatos (MUNDAY et al., 2015). Nesta tese, documentamos o *Bos taurus papillomavirus* tipo 2 (BPV2) como causador de papilomas em ovinos.

6 CONCLUSÃO

- O trabalho aqui apresentado documenta historicamente os Delta-PVs, suprimindo, em partes, a falta de trabalhos englobem todos os *Deltapapillomavírus*.

- A análise das sequências da E6 dos diferentes tipos virais e sua determinação estrutural por meio da modelagem molecular comparativa são resultados que ampliam os estudos voltados para os papilomavírus e, conseqüentemente, o entendimento da sua biologia.

- O diagnóstico realizado a partir de lesões cutâneas de carneiros mostrou mais uma vez a importância veterinária do gênero *Deltapapillomavirus*. Apesar do hospedeiro em questão ser um ovino (*Ovis aries*), foi diagnosticado, pela primeira vez no mundo, como infectado por BPV2, um vírus bovino (*Bos taurus*).

- As análises filogenéticas com base na proteína E6 dos diferentes papilomavírus, motivadas pela discrepância observada em relação à E6 do BPV14 foram publicadas na Revista *Veterinary Microbiology* (Anexo 27).

- A colaboração durante os estudos geraram artigos, destacando as análises *in vitro* da proteína recombinante E6 de BPV1 (Anexo 28), uma revisão sobre os papilomavírus, que foi publicada na edição comemorativa do periódico *Genetics and Molecular Biology* (Anexo 29), e produção de VLPs para a produção de vacinas contra o BPV na revista *Vaccine* (Anexo 30).

- Os resultados obtidos no diagnóstico das lesões de carneiros foram publicados (First detection of bovine papillomavirus type 2 in cutaneous wart lesions from ovines) na revista *Transboundary and Emerging Diseases* (Anexo 31).

- Parte dos resultados aqui documentados foram apresentados no *Vaccinology Course* promovido pelo Instituto Pasteur (Paris, França) (Anexo 32), para o qual foi concedida uma bolsa para participação, e parte no 3rd (Anexo 33) ICEGB *Workshop on Human papillomavirus* (São Paulo, Brazil)

- Por fim, o gene e a proteína E6 dos papilomavírus mostraram ser bons marcadores moleculares, podendo ser utilizados como critério adicional na classificação de novos tipos virais descritos e, até mesmo, no diagnóstico de lesões.

7 REFERÊNCIAS

ICTV, **International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)**. Disponível em: <<https://talk.ictvonline.org/>>. Acesso em: 2 ago. 2017.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Cellular and molecular immunology**. 4. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 553 p. 2000.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

AHMED, M.; TOLLEFSBOL, T. Telomeres and telomerase: basic science implications for aging. **Radiation research**, v. 49, p. 1105–1109, 2001.

AHOLA, H. et al. Organization and expression of the transforming region from the European elk papillomavirus (EEPV). **Gene**, v. 50, n. 1–3, p. 195–205, 1986.

ALBERTI, A. et al. Ovis aries Papillomavirus 3: A prototype of a novel genus in the family Papillomaviridae associated with ovine squamous cell carcinoma. **Virology**, v. 407, n. 2, p. 352–359, 2010.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. ArtMed, 1463p., 2004.

ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 5 ed. Porto Alegre: ArtMed, 1054 p., 2010.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, v. 215, p. 403–410, 1990.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J. Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST - a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.**, v. 25, p. 3389–3402, 1997.

AMORIM, D.S. Fundamentos de sistemática filogenética. Holos Editora, Ribeirão Preto, 136p., 2002.

AMTMANN, E.; MÜLLER, H.; SAUER, G. Equine connective tissue tumors contain unintegrated bovine papilloma virus DNA. **Journal of virology**, v. 35, n. 3, p. 962–964, 1980.

ANDROPHY, E. J. et al. Identification of the HPV-16 E6 protein from transformed mouse cells and human cervical carcinoma cell lines. **The EMBO journal**, v. 6, n. 4, p. 989–992, 1987.

ARALDI, R. P. et al. Bovine papillomavirus clastogenic effect analyzed in comet assay. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

ARALDI, R. P. et al. Mutagenic potential of Bos taurus Papillomavirus type 1 E6 recombinant protein: first description. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–16, 2015.

BAKER, C. C.; HOWLEY, P. M. Differential promoter utilization by the bovine papillomavirus in transformed cells and productively infected wart tissues. **The EMBO journal**, v. 6, n. 4, p. 1027–1035, 1987.

BAKER, W.; VAN DEN BROEK, A.; CAMON, E.; HINGAMP, P.; STERK, P.; STOESSER, G.; TULLI, M. A. The EMBL nucleotide sequence database. **Nucleic Acids Res.**, v. 28, n. 1, p. 19-23, 2000.

BAM, J. et al. Spontaneous cutaneous papillomatosis in yaks and detection and quantification of bovine papillomavirus-1 and -2. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 60, n. 5, p. 475–480, 2013.

BANKS, L. et al. Identification of human papillomavirus type 18 E6 polypeptide in cells derived from human cervical carcinomas. **The Journal of General Virology**, v. 68 (Pt 5), p. 1351–9, maio 1987.

BARBOSA, M. S. et al. In vitro biological activities of the E6 and E7 genes vary among human papillomaviruses of different oncogenic potential. **Journal of virology**, v. 65, n. 1, p. 292–8, 1991.

BARBOSA, M. S.; LOWY, D. R.; SCHILLER, J. T. Papillomavirus polypeptides E6 and E7 are zinc-binding proteins. **Journal of virology**, v. 63, n. 3, p. 1404–7, 1989.

BARTHOLOMEW, J. S.; STACEY, S. N.; COLES, B.; BURT, S. J.; ARRAND, J. R.; STERN, P. L. Identification of a naturally processed HLA A0201-restricted viral peptide from cells expressing human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. **Eur. J. Immunol.**, v. 24, p. 3175–3179, 1994.

BAUERMANN, F. V. et al. A novel bovine papillomavirus type in the genus Dyokappapapillomavirus. **Archives of Virology**, v. 162, n. 10, p. 3225–3228, 2017.

- BAYNES, J. W.; DOMINICZAK, M. H. **Bioquímica Médica**, 3. ed. **Mosby** Elsevier Inc., 2015.
- BENSON, D. A.; KARSCH-MIZRACHI, I.; LIPMAN, D. J.; OSTELL, J.; RAPP, B. A.; WHEELER, D. L. GenBank. **Nucleic Acids Res.**, v. 28, n. 1, p. 15-18, 2000.
- BERG, J. M. Potential Metal-Binding Domains in Nucleic Acid Binding Proteins. **Science**, v. 232, p. 6–8, 1986a.
- BERG, J. M. Potential Metal-Binding Domains in Nucleic Acid Binding Proteins JEREMY. **Science**, v. 232, p. 485-4876–8, 1986b.
- BERMAN, H.; WESTBROOK, J.; FENG, Z.; et al. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Res.**, v. 28, p. 235–242, 2000.
- BERNARD, H. U. et al. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. **Virology**, v. 401, n. 1, p. 70–79, 2010.
- BOCANETI, F. et al. Bovine Papillomavirus: New Insights into an Old Disease. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 63, n. 1, p. 14–23, 2016.
- BOHL, J. et al. Competitive binding to a charged leucine motif represses transformation by a papillomavirus E6 oncoprotein. **Virology**, v. 271, n. 1, p. 163–170, 2000.
- BORZACCHIELLO, G. et al. Bovine papillomavirus type 4 in oesophageal papillomas of cattle from the south of Italy. **Journal of Comparative Pathology**, v. 128, n. 2–3, p. 203–206, 2003.
- BORZACCHIELLO, G. Bovine Papillomavirus. In: SCHWAB, M. (Ed.). . **Encyclopedia of Cancer**. [s.l: s.n.]. p. 3235.
- BORZACCHIELLO, G. et al. Human papillomavirus research: Do we still need animal models? **International Journal of Cancer**, v. 125, n. 3, p. 739–740, 2009.
- BORZACCHIELLO, G.; ROPERTO, F. Bovine papillomaviruses , papillomas and cancer in cattle To cite this version: Review article Bovine papillomaviruses , papillomas and cancer in cattle. **Veterinary Research**, v. 39, n. 5, p. 1–19, 2008.
- BOSHART, M. et al. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. **The EMBO journal**, v. 3, n. 5, p. 1151–1157, 1984.
- BOUVARD, V. et al. The human papillomavirus type 16 E5 gene cooperates with the E7

gene to stimulate proliferation of primary cells and increases viral gene expression. **Virology**, v. 203, p. 73–80, 1994.

BOWIE, J. U.; LÜTHY, R.; EISENBERG, D. A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. **Science**, v. 12, n. 5016, p. 164–170, 1991.

BOXUS, M. et al. The HTLV-1 Tax interactome. **Retrovirology**, v. 5, p. 16–18, 2008.

BRANDEN, C.; TOOZE, J. **Introduction to protein structure**. 2nd ed. New York, USA: Garland Publishing, 1998.

BRAVO, I. G.; CRUSIUS, K.; ALONSO, A. The E5 protein of the human papillomavirus type 16 modulates composition and dynamics of membrane lipids in keratinocytes. **Archives of Virology**, v. 150, n. 2, p. 231–246, 2005.

BRIMER, N. et al. Cutaneous papillomavirus E6 oncoproteins associate with MAML1 to repress transactivation and NOTCH signaling. **Oncogene**, v. 31, n. 43, p. 4639–4646, 2012.

BURKHARDT, A.; DIMAIO, D.; SCHLEGEL, R. Genetic and biochemical definition of the bovine papillomavirus E5 transforming protein. **The EMBO journal**, v. 6, n. 8, p. 2381–2385, 1987.

CAMPO, M. S. et al. Molecular heterogeneity and lesion site specificity of cutaneous bovine papillomaviruses. **Virology**, v. 113, n. 1, p. 323–335, 1981.

CAMPO, M. S. Animal models of papillomavirus pathogenesis. **Virus Research**, v. 89, n. 2, p. 249–261, 2002.

CAMPO, M. S.; COGGINS, L. W. Molecular cloning of bovine papillomavirus genomes and comparison of their sequence homologies by heteroduplex mapping. **Journal of General Virology**, v. 63, n. 2, p. 255–264, 1982.

CAMPOS, S. R. C. et al. Can established cultured papilloma cells harbor bovine papillomavirus? **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n. 4, p. 1119–1126, 2008.

CARR, J.; GYORF, T. Human papillomavirus. Epidemiology, transmission, and pathogenesis. **CliniClinics in Laboratory Medicine**, v. 20, n. 2, p. 235–255, 2000.

CHAMBERS, G. et al. Association of bovine papillomavirus with the equine sarcoid. **Journal of General Virology**, v. 84, n. 5, p. 1055–1062, 2003.

CHAN, S.-Y. et al. Analysis of Genomic Sequences of 95 Papillomavirus Types: Uniting Typing, Phylogeny, and Taxonomy. **Journal of Virology**, v. 69, n. 5, p. 3074–3083, 1995.

CHAN, S. Y. et al. Phylogenetic analysis of 48 papillomavirus types and 28 subtypes and variants: a showcase for the molecular evolution of DNA viruses. **Journal of virology**, v. 66, n. 10, p. 5714–5725, 1992.

CHEN, E. Y. et al. The primary structure and genetic organization of the bovine papillomavirus type 1 genome. **Nature**, v. 299, n. 7, p. 529–534, 1982.

CHEN, J.; HONG, Y.; ANDROPHY, E. Mutational analysis of transcriptional activation by the bovine papillomavirus type 1 E6. **Virology**, v. 236, n. 1, p. 30–36, 1997.

CHEN, Z.; SCHIFFMAN, M.; HERRERO, R.; DESALLE, R.; ANASTOS, K.; SEGONDY, M.; SAHASRABUDDHE, V. V.; GRAVITT, P. E.; HSING, A.W.; BURK, R.D. Evolution and taxonomic classification of human papillomavirus 16 (HPV16)-related variant genomes: HPV31, HPV33, HPV35, HPV52, HPV58 and HPV67. **PLoS One**, v. 6, p. e20183, 2011.

CHEN, Z.; SCHIFFMAN, M.; HERRERO, R.; DESALLE, R.; ANASTOS, K.; SEGONDY, M.; SAHASRABUDDHE, V. V.; GRAVITT, P. E.; HSING, A. W.; BURK, R. D. Evolution and taxonomic classification of Alphapapillomavirus 7 complete genomes: HPV18, HPV39, HPV45, HPV59, HPV68, and HPV70. **PLoS One**, v. 8, p. e72565, 2013.

CHENG, J. et al. The MULTICOM toolbox for protein structure prediction. **BMC Bioinformatics**, v. 13, n. 1, 2012.

CHOTHIA, C. Proteins. One thousand families for the molecular biologist. **Nature**, v. 357, n. 6379, p. 543–544, 1992.

CHOU, P. Y.; FASMAN, G. D. Empirical predictions of protein conformation. **Annual review of biochemistry**, v. 47, p. 251–276, 1978.

CHOW, L. T.; BROKER, T. R. Papillomavirus DNA replication. **Intervirology**, v. 37, p. 150–158, 1994.

COGGIN, J. R.; ZUR HAUSEN, H. Workshop on papillomaviruses and cancer. **Cancer Res.**, v. 39, p. 545– 546, 1979.

COLARES, T. **Animais transgênicos - princípios & métodos**. São Carlos: Suprema, 2005.

COLE, S. T.; DANOS, O. Nucleotide sequence and comparative analysis of the human papillomavirus type 18 genome. Phylogeny of papillomaviruses and repeated structure of the E6 and E7 gene products. **Journal of Molecular Biology**, v. 193, n. 4, p. 599–608, 1987.

COOK, R. H.; OLSON, C. Experimental transmission of cutaneous papilloma. **American Journal of Pathology**, v. 27, n. 6, p. 1087–1097, 1951.

CROOK, T.; TIDY, J. A.; VOUSDEN, K. H. Degradation of p53 can be targeted by HPV E6 sequences distinct from those required for p53 binding and trans-activation. **Cell**, v. 67, p. 547–556, 1991.

DA SILVA, M. A. R. et al. Co-infection of Bovine Papillomavirus and Feline-Associated Papillomavirus in bovine cutaneous warts. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 59, n. 6, p. 539–543, 2012.

DAF, S.; JENA, L.; KUMAR, S. Comparative phylogenetic analysis of E6 and E7 proteins of different 42 Strains of HPV. **JK Science**, v. 12, n. 1, 2010.

DALAL, S. et al. Mutational analysis of human papillomavirus type 16 E6 demonstrates that p53 degradation is necessary for immortalization of mammary epithelial cells. **Journal of Virology**, v. 70, n. 2, p. 683–688, 1996.

DANIELS, P. et al. Molecular analysis of the interaction between HPV type 16 E6 and human E6-associated protein. **FEBS Letters**, v. 416, n. 1, p. 6–10, 1997.

DANOS, O. et al. Comparative analysis of the human type 1a and bovine type 1 papillomavirus genomes. **Journal of virology**, v. 46, n. 2, p. 557–566, 1983.

DANOS, O. et al. Fine structure of the cottontail rabbit papillomavirus mRNAs expressed in the transplantable VX2 carcinoma. **Journal of virology**, v. 53, n. 3, p. 735–41, 1985.

DANOS, O.; KATINKA, M.; YANIV, M. Molecular cloning, refined physical map and heterogeneity of methylation sites of Papilloma virus type 1a DNA. **European Journal of Biochemistry**, v. 109, n. 2, p. 457–461, 1980.

DANOS, O.; KATINKA, M.; YANIV, M. Human papillomavirus 1a complete DNA sequence: a novel type of genome organization among papovaviridae. **The EMBO**

journal, v. 1, n. 2, p. 231–236, 1982.

DAS, K.; BOHL, J.; VANDE POL, S. B. Identification of a second transforming function in bovine papillomavirus type 1 E6 and the role of E6 interactions with paxillin, E6BP, and E6AP. **Journal of virology**, v. 74, n. 2, p. 812–816, 2000.

DAUDT, C. et al. How many papillomavirus species can go undetected in papilloma lesions? **Scientific Reports**, v. 6, n. November, p. 1–7, 2016.

DE CARVALHO, C. et al. Bovine papillomavirus type 2 in reproductive tract and gametes of slaughtered bovine females. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. SUPPL. 1, p. 82–84, 2003.

DE VILLIERS, E. M. et al. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, n. 1, p. 17–27, 2004.

DE VILLIERS, E. M. Cross-roads in the classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 445, n. 1–2, p. 2–10, 2013.

DINIZ, N. et al. Simultaneous presence of bovine papillomavirus in blood and in short-term lymphocyte cultures from dairy cattle in Pernambuco, Brazil. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 8, n. 4, p. 1474–1480, 2009.

DOORBAR, J. et al. **Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network.** *Nature*, 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1715519>>

DOORBAR, J. The papillomavirus life cycle. **Journal of Clinical Virology**, v. 32, p. 7–15, 2005.

DOORBAR, J. The E4 protein; structure, function and patterns of expression. **Virology**, v. 445, n. 1–2, p. 80–98, 2013.

DUENSING, S. et al. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome uplication from the cell division cycle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 18, p. 10002–7, ago. 2000.

DUENSING, S.; MÜNGER, K. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins independently induce numerical and structural chromosome instability. **Cancer Research**, v. 62, p. 7075–7082, 2002.

DÜRST, M. et al. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 80, n. 12, p. 3812–3815, 1983.

ELBEL, M. et al. A comparative analysis of the interactions of the E6 proteins from cutaneous and genital papillomaviruses with p53 and E6AP in correlation to their transforming potential. **Virology**, v. 239, n. 1, p. 132–149, 1997.

ELLIS, J. R. M.; KEATING, P. J.; BAIRD, J.; HOUNSELL, E. F.; RENOUF, D. V.; ROWE, M.; HOPKINS, D.; DUGGAN-KEEN, M. F.; BARTHOLOMEW, J. S.; YOUNG, L. S.; STERN, P. L. The association of an HPV16 oncogene variant with HLA-B7 has implications for vaccine design in cervical cancer. **Nat. Med.**, v. 1, p. 464–470, 1995.

ENGH, R. A.; HUBER, R. Accurate bond and angle parameters for X-ray protein structure refinement. **Acta Cryst.**, v. 47, p. 392–400, 1991.

ERDÉLYI, K. et al. Characterisation of the first complete genome sequence of the roe deer (*Capreolus capreolus*) papillomavirus. **Virus research**, v. 135, n. 2, p. 307–311, 2008.

ERIKSSON, A. et al. The genomes of the animal papillomaviruses European elk papillomavirus, deer papillomavirus, and reindeer papillomavirus contain a novel transforming gene (E9) near the early polyadenylation site. **Journal of virology**, v. 68, n. 12, p. 8365–8373, 1994.

FAUQUET, C. M. et al. **Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.** [s.l: s.n.].

FAVRE, M. Structural polypeptides of rabbit, bovine, and human papillomaviruses. **Journal of virology**, v. 15, n. 5, p. 1239–1247, 1975.

FENNER, F. The Classification and Nomenclature of Viruses. **J. gen. Viral.**, v. 31, p. 463–470, 1976.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, p. 783–791, 1985.

FINN, R. D.; BATEMAN, A.; CLEMENTS, J.; COGGILL, P.; EBERHARDT, R.Y.; EDDY, S. R.; HEGER, A.; HETHERINGTON, K.; HOLM, L.; MISTRY, J.;

SONNHAMMER, E. L. L.; TATE, J.; PUNTA, M. The Pfam protein families database. **Nucleic Acids Res.**, v. 42, p. 222–230, 2014.

FORSLUND, O. et al. A broad range of human papillomavirus types detected with a general PCR method suitable for analysis of cutaneous tumours and normal skin. **Journal of General Virology**, v. 80, n. 9, p. 2437–2443, 1999.

FOSTER, S. A.; DEMERS, G. W.; ETSCHIED, B. G.; GALLOWAY, D. A. The ability of human papillomavirus E6 proteins to target p53, for degradation in vivo correlates with their ability to abrogate actinomycin D-induced growth arrest. **J. Virol.**, v. 68, p. 5698–5705, 1994.

FREITAS, A. C. et al. Viral DNA sequences in peripheral blood and vertical transmission of the virus: A discussion about BPV-1. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 76–78, 2003.

FREITAS, A. C. et al. Papillomavirus DNA detection in non epithelial tissues : a discussion about bovine papillomavirus. **Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology**, p. 697–704, 2007.

FUX, R. et al. Rusa alfredi papillomavirus 1 – A novel deltapapillomavirus inducing endemic papillomatosis in the endangered Visayan spotted deer. **Journal of General Virology**, v. 97, n. 1, p. 128–133, 2016.

GARCÍA-VALLVÉ, S.; ALONSO, Á.; BRAVO, I. G. Papillomaviruses: Different genes have different histories. **Trends in Microbiology**, v. 13, n. 11, p. 514–521, 2005.

GARDINER, D. W. et al. Fibropapilloma of the glans penis in a horse. **Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc**, v. 20, n. 6, p. 816–819, 2008.

GASTEIGER, E.; HOOGLAND, C.; GATTIKER, A.; DUVAUD, S.; WILKINS, M. R.; APPEL, R. D.; BAIROCH A. *Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server*; (In) John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press, p. 571-607, 2005.

GEWIN, L. et al. Identification of a novel telomerase repressor that interacts with the human papillomavirus type-16 E6/E6-AP complex. **Genes & Development**, v. 18, n. 18, p. 2269–82, set. 2004.

GHARIZADEH, B. et al. Multiple-primer DNA sequencing method. **Electrophoresis**, v.

24, n. 7–8, p. 1145–51, 2003.

GINALSKI, K. Comparative modeling for protein structure prediction. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 6, n. 2, p. 172–177, 2006.

GISSMANN, L.; PFISTER, H.; ZUR HAUSEN, H. Human papilloma viruses (HPV): Characterization of four different isolates. **Virology**, v. 76, n. 2, p. 569–580, 1977.

GISSMANN, L.; ZUR HAUSEN, H. Human papilloma virus DNA: physical mapping and genetic heterogeneity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 73, n. 4, p. 1310–1313, 1976.

GORMAN, N. T. Equine sarcoid — Time for optimism. **Equine Veterinary Journal**, v. 17, n. 6, p. 412–414, 1985.

GOTTSCHLING, M. et al. Multiple evolutionary mechanisms drive papillomavirus diversification. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n. 5, p. 1242–1258, 2007.

GROFF, D. E.; LANCASTER, W. D. Molecular cloning and nucleotide sequence of deer papillomavirus. **Journal of Virology**, v. 56, n. 1, p. 85–91, 1985.

GUINDON, S.; GASCUEL, O. A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. **Syst. Biol.**, v. 52, p. 696–704, 2003.

HALL, T. A. BioEdit - a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser.**, v. 41, p. 95–98, 1999.

HAM, J. et al. Several different upstream promoter elements can potentiate transactivation by the BPV-1 E2 protein. **The EMBO Journal**, v. 10, n. 10, p. 2931–2940, 1991.

HARTWELL, L. Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells. **Cell**, v. 71, n. 4, p. 543–546, 1992.

HATAMA, S. et al. Detection of a novel bovine papillomavirus type 11 (BPV-11) using xipapillomavirus consensus polymerase chain reaction primers. **Archives of Virology**, v. 156, n. 7, p. 1281–1285, 2011.

HEBNER, C. M.; LAIMINS, L. A. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. **Rev. Med. Virol.**, v. 16, n. 1052–9276 (Print), p. 83–97, 2006.

HEGDE, R. S. The papillomavirus E2 proteins: structure, function, and biology. **Annu**

Rev Biophys Biomol Struct, v. 31, p. 343–360, 2002.

HEILMAN, C. A et al. Cloning of human papilloma virus genomic DNAs and analysis of homologous polynucleotide sequences. **Journal of virology**, v. 36, n. 2, p. 395–407, 1980.

HERBST, L. H.; LENZ, J.; VAN DOORSLAER, K.; CHEN, Z.; STACY, B. A.; WELLEHAN, J. F. JR; MANIRE, C. A.; BURK, R. D. Genomic characterization of two novel reptilian papillomaviruses, *Chelonia mydas* papillomavirus 1 and *Caretta caretta* papillomavirus 1. **Virology**, v. 383, p. 131–135, 2009.

HERWIG, S.; STRAUSS, M. The retinoblastoma protein: a master regulator of cell cycle, differentiation and apoptosis. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 246, n. 3, p. 581–601, 1997.

HILBERT, M.; BÖHM, G.; JAENICKE, R. Structural relationships of homologous proteins as a fundamental principle in homology modeling. **Proteins**, v. 17, n. 2, p. 138–151, 1993.

HOVMÖLLER, S.; ZHOU T.; OHLSON, T. Conformations of amino acids in proteins. In: **Acta Cryst.**, v. 58, p. 768–776, 2002.

HUIBREGTSE, J. M.; SCHEFFNER, M.; HOWLEY, P. M. Cloning and expression of the cDNA for E6-AP, a protein that mediates the interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53. **Molecular and cellular biology**, v. 13, n. 2, p. 775–784, 1993a.

HUIBREGTSE, J. M.; SCHEFFNER, M.; HOWLEY, P. M. Localization of the E6-AP regions that direct human papillomavirus E6 binding, association with p53, and ubiquitination of associated proteins. **Molecular and Cellular Biology**, v. 13, n. 8, p. 4918–4927, 1993b.

HUIBREGTSE, J.; SCHEFFNER, M.; HOWLEY, P. A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. **The EMBO Journal**, v. 10, n. 13, p. 4129–4135, 1991.

IFTNER, T. et al. Interference of papillomavirus E6 protein with single-strand break repair by interaction with XRCC1. **EMBO Journal**, v. 21, n. 17, p. 4741–4748, 2002.

IMAI, Y. et al. Purification and DNA-binding properties of human papillomavirus type 16 E6 protein expressed in *Escherichia coli*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 164, n. 3, p. 1402–1410, 1989.

- JACKSON, M. E.; CAMPO, M. S. Positive and negative E2-independent regulatory elements in the long control region of bovine papillomavirus type 4. **J Gen Virol**, v. 72 (Pt 4), n. 1991, p. 877–883, 1991.
- JACKSON, S.; STOREY, A. E6 proteins from diverse cutaneous HPV types inhibit apoptosis in response to UV damage. **Oncogene**, v. 19, n. 4, p. 592–8, jan. 2000.
- JARRETT, W. F. H. et al. A novel bovine papillomavirus (BPV-6) causing true epithelial papillomas of the mammary gland skin: A member of a proposed new BPV subgroup. **Virology**, v. 136, n. 2, p. 255–264, 1984.
- JARRETT, W. F. H. et al. Studies on vaccination against papillomaviruses: Prophylactic and therapeutic vaccination with recombinant structural proteins. **Virology**, v. 184, n. 1, p. 33–42, 1991.
- JELÍNEK, F.; TACHEZY, R. Cutaneous papillomatosis in cattle. **J. Comp. Path.**, v. 132, p. 70–81, 2005.
- JONES, D. L.; MÜNGER, K. Interactions of the human papillomavirus E7 protein with cell cycle regulators. **Seminars in Cancer Biology**, v. 7, p. 327–337, 1996.
- KAO, W. et al. Human papillomavirus type 16 E6 induces self-ubiquitination of the E6AP ubiquitin-protein ligase. **Journal of Virology**, v. 74, n. 14, p. 6408–6417, 2000.
- KATOH, S. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Mol. Biol. Evol.**, v. 30, p. 772–780, 2013.
- KEHMEIER, E. et al. Cellular steady-state levels of “high risk” but not “low risk” human papillomavirus (HPV) E6 proteins are increased by inhibition of proteasome-dependent degradation independent of their p53- and E6AP-binding capabilities. **Virology**, v. 299, n. 1, p. 72–87, 2002.
- KENNEDY, M. B. Origin of PDZ (DHR, GLGF) domains. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 20, n. 9, p. 350, 1995.
- KIDNEY, B. A.; BERROCAL, A. Sarcoids in two captive tapirs (*Tapirus bairdii*): Clinical, pathological and molecular study. **Veterinary Dermatology**, v. 19, n. 6, p. 380–384, 2008.
- KISSELJOV, F. Virus-associated human tumors: cervical carcinomas and papilloma viruses. **Biochemistry (Moscow)**, v. 65, n. 1, p. 68–77, 2000.

- KLINGELHUTZ, A.; FOSTER, S.; MCDUGALL, J. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. **Nature**, v. 380, n. 6569, p. 79–82, 1996.
- KOLINSKI, A.; ROTKIEWICZ, P.; ILKOWSKI, B.; SKOLNICK, J. A method for the improvement of threading-based protein models. **Proteins**, v. 37, n. 4, p. 592–610, 1999.
- KOLLER, L.; OLSON, C. **Attempted transmission of warts from man, cattle, and horses and of deer fibroma, to selected hosts**The **Journal of Investigative Dermatology**, 1972.
- KUMAR, S.; JENA, L.; BHOMALE, V. W.; DAF, S. *In silico* structural prediction of E6 and E7 proteins of Human Papillomavirus strains by comparative modeling. **Int. J. Bioautomation**, v. 16, n. 2, p. 101–110, 2012.
- LANCASTER, W. D.; OLSON, C. Demonstration of two distinct classes of bovine papilloma virus. **Virology**, v. 89, n. 2, p. 372–379, 1978.
- LANCASTER, W. D.; SUNDBERG, J. P. Characterization of papillomaviruses isolated from cutaneous fibromas of white-tailed deer and mule deer. **Virology**, v. 123, n. 1, p. 212–216, 1982.
- LANCASTER, W. D.; THEILEN, G. H.; OLSON, C. Hybridization of bovine papilloma virus type 1 and type 2 DNA to DNA from virus-induced hamster tumors and naturally occurring equine tumors. **Intervirology**, v. 11, n. 4, p. 227–233, 1979.
- LANGE, C. E. et al. Sequence and classification of FdPV2, a papillomavirus isolated from feline Bowenoid in situ carcinomas. **Veterinary Microbiology**, v. 137, n. 1–2, p. 60–65, 2009.
- LARSSON, A. AliView: A fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. **Bioinformatics**, v. 30, n. 22, p. 3276–3278, 2014.
- LASKOWSKI, R. A. et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, n. 2, p. 283–291, 1993.
- LASKOWSKI, R. A. PDBsum new things. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. SUPPL. 1, p. 355–359, 2009.
- LEAL, A. et al. Quercetin induces structural chromosomal aberrations and uncommon rearrangements in bovine cells transformed by the E7 protein of bovine papillomavirus type 4. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 1, n. 1, p. 15–21, 2003.

- LEECHANACHAI, P. et al. Leechanachai, P. **Oncogene**, v. 7, n. 1, p. 19–25, 1992.
- LEPTAK, C. et al. Tumorigenic transformation of murine keratinocytes by the E5 genes of bovine papillomavirus type 1 and human papillomavirus type 16. **Journal of virology**, v. 65, n. 12, p. 7078–7083, 1991.
- LINDERSTROM-LANG, K. U. Lane Medical Lectures-Proteins and Enzymes, p. 58. Stanford, California: **Stanford Univ. Press**, 115 pp. 1952.
- LINDSEY, C. J. et al. Bovine papillomavirus DNA in milk, blood, urine, semen, and spermatozoa of bovine papillomavirus-infected animals. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 1, p. 310–318, 2009.
- LINNAEUS, C. Systema Naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis. Editio decima reformata. Laurentius Salvius: Holmiae. ii, 824 pp., 1758.
- LINNAEUS, C. Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis. Tomus I. Editio duodecima, reformata. Holmiae. (Laurentii Salvii). p. 1-532, 1766.
- LIU, W. J. et al. Sequence close to the N-terminus of L2 protein is displayed on the surface of bovine papillomavirus type 1 virions. **Virology**, v. 227, n. 2, p. 474–483, 1997.
- LIU, Y.; BALEJA, J. D. Structure and function of the papillomavirus E6 protein and its interacting proteins. **Frontiers in Bioscience**, v. 13, p. 121–134, 2008.
- LOYTYNOJA, A.; GOLDMAN, N. From The Cover: An algorithm for progressive multiple alignment of sequences with insertions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 30, p. 10557–10562, 2005.
- LUNARDI, M. et al. Bovine papillomavirus type 13 DNA in equine sarcoids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 7, p. 2167–2171, 2013a.
- LUNARDI, M. et al. Genetic characterization of a novel bovine papillomavirus member of the Deltapapillomavirus genus. **Veterinary Microbiology**, v. 162, n. 1, p. 207–213, 2013b.
- LUSCOMBE, N. M.; GREENBAUM, D.; GERSTEIN, M. What is bioinformatics? An introduction and overview. **Yearbook of Medical Informatics**, p. 83-100, 2001.
- LUSKY, M. et al. Bovine papilloma virus contains an activator of gene expression at the

distal end of the early transcription unit. **Molecular and Cellular Biology**, v. 3, n. 6, p. 1108–1122, 1983.

LÜTHY, R.; BOWIE, J. U.; EISENBERG, D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Nature**, v. 356, p. 83–85, 1992.

MAEDA, Y. et al. An outbreak of teat papillomatosis in cattle caused by bovine papilloma virus (BPV) type 6 and unclassified BPVs. **Veterinary Microbiology**, v. 121, n. 3–4, p. 242–248, 2007.

MANTOVANI, F.; BANKS, L. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. **Oncogene**, v. 20, n. 54, p. 7874–87, nov. 2001.

MARTÍ-RENOM, M. A.; STUART, A. C.; FISER, A.; SÁNCHEZ, R.; MELO, F.; SALI, A. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. **Annu. Ver. Biophys. Biomol. Struct.**, v. 29; p. 291–325, 2000.

MAXIE, M. G.; NEWMAN, S. J. The urinary system. In: MAXIE, M. G. (Ed.). . **Jubb, Kennedy, Palmer's Pathology of Domestic Animals**. 5. ed. [s.l: s.n.]. p. 518–520.

MAZZUCHELLI-DE-SOUZA, J. et al. Expression and in silico analysis of the recombinant bovine papillomavirus e6 protein as a model for viral oncoproteins studies. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–10, 2013.

MAZZUCHELLI-DE-SOUZA, J.; STOCCO, R. DE C.; THOMPSON, C. E. Bos taurus papillomavirus (BPV) E6 protein: Sequence analysis and molecular evolution. **Veterinary Microbiology**, v. 181, n. 3–4, p. 328–333, 2015.

MCLAUGHLIN-DRUBIN, M. E.; MÜNGER, K. The Human papillomavirus E7 oncoprotein. **Virology**, v. 384, n. 2, p. 335–344, 2009.

MILNE, C. The history of the Dorper sheep. **Small Rumin Res.**, v. 36, n. 2, p. 99–102, 2000.

MOAR, M. H.; JARRET, W. F. A cutaneous fibropapilloma from a red deer (*Cervus elaphus*) associated with a papillomavirus. **Intervirology**, v. 24, n. 2, p. 108–118, 1985.

MOONEY, C.; DAVEY, N.; MARTIN, A. J. M.; WALSH, I.; SHIELDS, D. C.; POLLASTRI, G. *In silico* protein motif discovery and structural analysis. In - **in silico tools for gene discovery series - Methods in Molecular Biology**, v. 760, p 341–353, 2011.

MORENO-LOPEZ, J. et al. Reindeer papillomavirus transforming properties correlate with a highly conserved E5 region. **Journal of virology**, v. 61, n. 11, p. 3394–3400, 1987.

MORENO-LÓPEZ, J.; MÖRNER, T.; PETTERSSON, U. Papillomavirus DNA associated with pulmonary fibromatosis in European elks. **Journal of virology**, v. 57, n. 3, p. 1173–1176, 1986.

MÜLLER, M.; GAUSEPOHL, H.; DE MARTYNOFF, G.; FRANK, R.; BRASSEUR, R.; GISSMANN, L. Identification of seroreactive regions of the human papillomavirus type 16 protein E4, E6, E7 and L1. **J. Gen. Virol.**, v. 71, p. 2709–2717, 1990.

MUNDAY, J. S. et al. Genomic characterization of *Felis catus* papillomavirus-3: A novel papillomavirus detected in a feline Bowenoid in situ carcinoma. **Veterinary Microbiology**, v. 165, n. 3–4, p. 319–325, 2013.

MUNDAY, J. S. et al. Genomic characterisation of the feline sarcoid-associated papillomavirus and proposed classification as *Bos taurus* papillomavirus type 14. **Veterinary Microbiology**, v. 177, n. 3–4, p. 289–295, 2015.

MUNDAY, J. S.; FAIRLEY, R.; ATKINSON, K. The detection of *Felis catus* papillomavirus 3 DNA in a feline bowenoid in situ carcinoma with novel histologic features and benign clinical behavior. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 28, n. 5, p. 612–615, 2016.

MUNDAY, J. S.; KNIGHT, C. G. Amplification of feline sarcoid-associated papillomavirus DNA sequences from bovine skin. **Veterinary Dermatology**, v. 21, n. 4, p. 341–344, 2010.

MUNDAY, J. S.; KNIGHT, C. G.; HOWE, L. The same papillomavirus is present in feline sarcoids from North America and New Zealand but not in any non-sarcoid feline samples. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, v. 22, n. 1, p. 97–100, 2010.

MÜNGER, K.; HOWLEY, P. M. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. **Virus Research**, v. 89, n. 2, p. 213–228, 2002.

MUNZ, E. et al. Camel Papillomatosis in Somalia. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v. 37, n. 1–10, p. 191–196, 1990.

MYERS G, BERNARD H-U, DELIUS H, FAVRE M, ICENOGEL J, VAN RANST M, WHEELER C, EDITORS. Human papillomaviruses a compilation and analysis of nucleic

acid and amino acid sequences. 1 ed. Los Alamos, USA: Theoretical Biology and biophysics group T-10, Los Alamos National Laboratory, 1994.

MYERS, G.; ANDROPHY, E. The E6 protein, (In) G. Myers (ed.): Human papillomavirus compendium. Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, N.Mex. p. III47-III57, 1995.

MYERS, G.; LU, H.; CALEF, C.; LEITNER, T. Heterogeneity of papillomaviruses. **Semin. Cancer Biol.**, v. 7, p. 349–358, 1996.

NARECHANIA, A. et al. Lack of the canonical pRB-binding domain in the E7 ORF of artiodactyl papillomaviruses is associated with the development of fibropapillomas. **Journal of General Virology**, v. 85, n. 5, p. 1243–1250, 2004.

NARECHANIA, A., CHEN, Z., DESALLE, R., BURK, R.D. Phylogenetic incongruence among oncogenic genital alpha human papillomaviruses. **J. Virol.**, v. 79, p. 15503–15510, 2005.

NASIR, L. et al. Identification and functional analysis of sequence variants in the long control region and the E2 open reading frame of bovine papillomavirus type 1 isolated from equine sarcoids. **Virology**, v. 364, n. 2, p. 355–361, 2007.

NASIR, L.; CAMPO, M. S. Bovine papillomaviruses: Their role in the aetiology of cutaneous tumours of bovids and equids. **Veterinary Dermatology**, v. 19, n. 5, p. 243–254, 2008.

NASIR, L.; REID, S. W. J. Bovine papillomaviral gene expression in equine sarcoid tumours. **Virus Research**, v. 61, n. 2, p. 171–175, 1999.

NASSERI, M.; WETTSTEIN, F. O. Differences exist between viral transcripts in cottontail rabbit papillomavirus-induced benign and malignant tumors as well as non-virus-producing and virus-producing tumors. **Journal of virology**, v. 51, n. 3, p. 706–12, 1984.

NGUYEN, M. L. et al. The PDZ Ligand Domain of the Human Papillomavirus Type 16 E6 Protein Is Required for E6 ' s Induction of Epithelial Hyperplasia In Vivo. v. 77, n. 12, p. 6957–6964, 2003.

NICHOLLS, P. K.; STANLEY, M. A. The immunology of animal papillomavirus. **Veterinary Immunology and Immunotherapy**, v. 73, n. 2000, p. 101-127, 2000.

NOMINÉ, Y. et al. Structural and functional analysis of E6 oncoprotein: Insights in the molecular pathways of human papillomavirus-mediated pathogenesis. **Molecular Cell**, v. 21, n. 5, p. 665–678, 2006.

NORONHA, V. et al. Papilomavírus humano associado a lesões de cérvix uterina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 3, p. 235–240, 1999.

OH, S.; KYO, S.; LAIMINS, L. Telomerase Activation by Human Papillomavirus Type 16 E6 Protein : Induction of Human Telomerase Reverse Transcriptase Expression through Myc and Telomerase Activation by Human Papillomavirus Type 16 E6 Protein : Induction of Human Telomerase Reverse Tran. **Journal of Virology**, v. 75, n. 12, p. 5559, 2001.

OKAYAMA T, TAMURA T, GOJOBORI T, TATENO Y, IKEO K, MIYAZAKI S, FUKAMI-KOBAYASHI, K.; SUGAWARA, H. Formal design and implementation of an improved DDBJ DNA database with a new schema and object-oriented library. **Bioinformatics**, v. 14, n.6, p. 472-478, 1998.

OLSON, C. Jr.; COOK, R. H. Cutaneous sarcoma-like lesions of the horse caused by the agent of bovine papilloma. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 77, n. 2; p. 281–284, 1951.

OLSON, C. et al. A urinary bladder tumor induced by a bovine cutaneous papilloma agent. **Cancer Research**, v. 19, n. 7, p. 779–784, 1959.

ORBELL, G. M. B.; YOUNG, S.; MUNDAY, J. S. Cutaneous sarcoids in captive african lions associated with Feline Sarcoid-Associated Papillomavirus infection. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 6, p. 1176–1179, 2011.

ORENGO, C. A.; JONES, D. T.; THORNTON, J. M. Protein superfamilies and domain superfolds. **Nature**, v. 372, n. 6507, p. 631-634, 1994.

ORTH, G. et al. Characterization of two types of human papillomaviruses in lesions of epidermodysplasia verruciformis. **P Natl Acad Sci USA**, v. 75, n. 3, p. 1537–1541, 1978.

PANGTY, K. et al. Detection of BPV-1 and -2 and quantification of BPV-1 by real-time PCR in cutaneous warts in cattle and buffaloes. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 57, n. 3, p. 185–196, 2010.

PASCOE, R. R.; SUMMERS, P. M. Clinical survey of tumours and tumour-like lesions in south east Queensland. **Equine Veterinary Journal**, v. 13, n. 4, p. 235–239, 1981.

- PATEL, K. R.; SMITH, K. T.; CAMPO, M. S. The nucleotide sequence and genome organization of bovine papillomavirus type 4. **The Journal of General virology**, v. 68, p. 2117–2128, 1987.
- PENNIE, W. D. et al. Analysis of the transforming functions of bovine papillomavirus type 4. **Virology**, v. 193, n. 2, p. 614–620, 1993.
- PEREIRA, R.; HITZEROTH, I. I.; RYBICKI, E. P. Insights into the role and function of L2, the minor capsid protein of papillomaviruses. **Archives of Virology**, v. 154, n. 2, p. 187–197, 2009.
- POL, S.; BROWN, M.; TURNER, C. Association of bovine papillomavirus type 1 E6 oncoprotein with the focal adhesion protein paxillin through a conserved protein interaction motif. **Oncogene**, v. 16, n. 1, p. 43–52, 1998.
- PONTING, C. P. Evidence for PDZ domains in bacteria, yeast, and plants. **Protein Science**, v. 6, n. 2, p. 464–468, 2008.
- RAFINESQUE, C. S. Précis des découvertes et travaux somiologiques. Entre 1800 et 1814. Ou choix raisonné de ses principaux découvertes en Zoologie et en Botanique, pour servir d'introduction à ses ouvrages futurs. Royale Typographie Militaire, Palerme. 1814.
- RAMACHANDRAN, G. N.; RAMAKRISHNAN, C.; SASISEKHARAN, V. Stereochemistry of polypeptide chain conformations. **Journal of Molecular Biology**, v. 7, p. 95-99, 1963.
- RANGANATHAN, R.; ROSS, E. M. PDZ domain proteins: scaffolds for signaling complexes. **Curr Biol**, v. 7, n. 12, p. R770-3, 1997.
- RANST, M. VAN; KAPLANLT, J. B.; BURK, R. D. Phylogenetic classification of human papillomaviruses : correlation with clinical manifestations. **Journal of General Virology**, v. 73, p. 2653–2660, 1992.
- RECTOR, A.; VAN RANST, M. Animal Papillomaviruses. **Virology**, v. 445, n. 1–2, p. 213–223, 2013.
- RELCHHARDT, T. It's sink or swim as a tidal wave of data approaches. **Nature**, v. 399, n. 6736, p. 517–520, 1999.
- RIVOIRE, W. A. et al. Bases biomoleculares da oncogenese cervical. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47, n. 2, p. 179–184, 2001.

- ROBERTS, S. et al. Mutational analysis of the human papillomavirus type 16 E1--E4 protein shows that the C terminus is dispensable for keratin cytoskeleton association but is involved in inducing disruption of the keratin filaments. **Journal of virology**, v. 71, n. 5, p. 3554–3562, 1997.
- RONCO, L. V. et al. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. **Genes & Development**, v. 12, n. 13, p. 2061–2072, jul. 1998.
- ROPERTO, S. et al. A review of bovine urothelial tumours and tumour-like lesions of the urinary bladder. **Journal of Comparative Pathology**, v. 142, n. 2–3, p. 95–108, 2010.
- SAITOU, N., AND M. NEI. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol. Biol. Evol.**, v. 4, p. 406–425, 1987.
- SALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. **J. Mol. Biol.**, v. 234, p. 779–815, 1993.
- SALUNKE, D. M.; CASPAR, D. L. D.; GARCEA, R. L. Self-assembly of purified polyomavirus capsid protein VP1. **Cell**, v. 46, n. 6, p. 895–904, 1986.
- SARVER, N. et al. Localization and analysis of Bovine papillomavirus type 1 transforming functions. **Journal of Virology**, v. 52, n. 2, p. 377–388, 1984.
- SCAGLIARINI, A. et al. Cervus elaphus papillomavirus (CePV1): New insights on viral evolution in deer. **Veterinary Microbiology**, v. 165, n. 3–4, p. 252–259, 2013.
- SCHEFFNER, M. et al. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. **Cell**, v. 63, n. 6, p. 1129–1136, 1990a.
- SCHEFFNER, M. et al. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. **Cell**, v. 63, n. 6, p. 1129–1136, 1990b.
- SCHEFFNER, M. et al. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. **Cell**, v. 75, n. 3, p. 495–505, nov. 1993.
- SCHILLER, J. T. et al. E5 open reading frame of bovine papillomavirus type 1 encodes a transforming gene. **Journal of virology**, v. 57, n. 1, p. 1–6, 1986.
- SCHILLER, J. T.; VASS, W. C.; LOWY, D. R. Identification of a second transforming region in bovine papillomavirus DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 24, p. 7880–7884, 1984.

- SCHLEGEL, R. et al. The E5 transforming gene of bovine papillomavirus encodes a small, hydrophobic polypeptide. **Science (New York, N.Y.)**, v. 233, n. 4762, p. 464–7, 1986.
- SCHÜRCH, A. C. et al. Metagenomic survey for viruses in Western Arctic caribou, Alaska, through iterative assembly of taxonomic units. **PloS one**, v. 9, n. 8, p. e105227, 2014.
- SCLATER, P. L. Note on the Systematic Position of Indicator. v. 12, n. 2, p. 176–180, 1870.
- SCULLY, C. Oral squamous cell carcinoma; from an hypothesis about a virus, to concern about possible sexual transmission. **Oral Oncology**, v. 38, n. 3, p. 227–234, 2002.
- SHAMANIN, V.; DELIUS, H.; DE VILLIERS, E. M. Development of a broad spectrum PCR assay for papillomaviruses and its application in screening lung cancer biopsies. **Journal of General Virology**, v. 75, n. 5, p. 1149–1156, 1994.
- SHOPE, R. E. Immunization of Rabbits To Infectious Papillomatosis. **The Journal of experimental medicine**, v. 65, n. 2, p. 219–31, 1937.
- SIEVERS, F.; WILM, A.; DINEEN, D. G.; GIBSON, T. J.; KARPLUS, K.; LI, W.; LOPEZ, R.; MCWILLIAM, H.; REMMERT, M.; SÖDING, J.; THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Mol. Syst. Biol.**, v. 7, p. 539, 2011.
- SMITS, S. L. et al. Identification and characterization of two novel viruses in ocular infections in reindeer. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. 3–9, 2013.
- SONG, S.; PITOT, H.; LAMBERT, P. The human papillomavirus type 16 E6 gene alone is sufficient to induce carcinomas in transgenic animals. **Journal of Virology**, v. 73, n. 7, p. 5887–5893, 1999.
- STANLEY, M. A.; PETT, M. R.; COLEMAN, N. HPV: from infection to cancer. **Biochemical Society transactions**, v. 35, n. 6, p. 1456–1460, 2007.
- STENLUND, A. et al. European elk papillomavirus: characterization of the genome, induction of tumors in animals, and transformation in vitro. **Journal of Virology**, v. 48, n. 2, p. 370–376, 1983.
- STEVENS, H. et al. Novel papillomavirus isolated from the oral mucosa of a polar bear

does not cluster with other papillomaviruses of carnivores. **Veterinary Microbiology**, v. 129, n. 1–2, p. 108–116, 2008a.

STEVENS, H. et al. Isolation and cloning of two variant papillomaviruses from domestic pigs: *Sus scrofa* papillomaviruses type 1 variants a and b. **Journal of General Virology**, v. 89, n. 10, p. 2475–2481, 2008b.

STICKLE, D. F.; PRESTA, L. G.; DILL, K. A.; ROSE, G. D. Hydrogen bonding in globular proteins. **J. Mol. Biol.**, v. 226, p. 1143–1159, 1992.

STOCCO DOS SANTOS, R. C. et al. Bovine papillomavirus transmission and chromosomal aberrations: An experimental model. **Journal of General Virology**, v. 79, n. 9, p. 2127–2135, 1998.

STOLTE, C. et al. Integrated visual analysis of protein structures, sequences, and feature data. **BMC Bioinformatics**, v. 16, n. 11, p. S7, 2015.

STOREY, A.; OSBORN, K.; CRAWFORD, L. Co-transformation by human papillomavirus types 6 and 11. **Journal of General Virology**, v. 71, n. 1, p. 165–171, 1990.

STORRS, C. H.; SILVERSTEIN, S. J. PATJ, a Tight Junction-Associated PDZ Protein, Is a Novel Degradation Target of High-Risk Human Papillomavirus E6 and the Alternatively Spliced Isoform 18 E6. **Journal of Virology**, v. 81, n. 8, p. 4080–4090, 2007.

STUBENRAUCH, F.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. **Seminars in cancer biology**, v. 9, n. 6, p. 379–386, 1999.

SUNDBERG, J. P. et al. Detection of papillomaviruses in cutaneous fibromas of white-tailed and mule deer. **American Journal of Veterinary Research**, v. 46, n. 5, p. 1145–1149, 1985.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Mol. Biol. Evol.**, v. 30, p. 2725–2729, 2013.

TATENO, Y.; IMANISHI, T.; MIYAZAKI, S.; FUKAMI-KOBAYASHI, K.; SAITOU, N.; SUGAWARA, H.; GOJOBORI, T. The DNA Data Bank of Japan (DDBJ) for genome scale research in life sciences. **Nucleic Acid Research**, v. 30, n. 1, p. 27–30, 2002.

TAVARÉ, S. Some Probabilistic and Statistical Problems in the Analysis of DNA Sequences. Lectures on Mathematics in the Life Sciences (American Mathematical Society), v. 17, p. 57–86, 1986.

TEIFKE, J. P. et al. Detection of papillomavirus-DNA in mesenchymal tumour cells and not in the hyperplastic epithelium of feline sarcoids. **Veterinary Dermatology**, v. 14, n. 1, p. 47–56, 2003.

TERAI, M.; DESALLE, R.; BURK, R. D. Lack of Canonical E6 and E7 Open Reading Frames in Bird Papillomaviruses: *Fringilla coelebs* Papillomavirus and *Psittacus erithacus timneh* Papillomavirus. **Journal of Virology**, v. 76, n. 19, p. 10020–10023, 2002.

THOMAS, M. et al. Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the MAGI-2 and MAGI-3 proteins for degradation. **Oncogene**, v. 21, n. 33, p. 5088–5096, 2002.

THOMAS, M.; BANKS, L. Human papillomavirus (HPV) E6 interactions with Bak are conserved amongst E6 proteins from high and low risk HPV types. **Journal of General Virology**, v. 80, n. 6, p. 1513–1517, 1999.

THOMAS, M. C.; CHIANG, C.-M. E6 oncoprotein represses p53-dependent gene activation via inhibition of protein acetylation independently of inducing p53 degradation. **Molecular Cell**, v. 17, n. 2, p. 251–64, jan. 2005.

THOMPSON, D. A et al. The human papillomavirus-16 E6 oncoprotein decreases the vigilance of mitotic checkpoints. **Oncogene**, v. 15, n. 25, p. 3025–35, dez. 1997.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTALW - improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.**, v. 22, p. 4673–4680, 1994.

TOMITA, Y. et al. Genus specific features of bovine papillomavirus E6, E7, E5 and E8 proteins. **Virus Research**, v. 124, n. 1–2, p. 231–236, 2007.

TONG, X. et al. The bovine papillomavirus E6 protein binds to the LD motif repeats of paxillin and blocks its interaction with vinculin and the focal adhesion kinase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 52, p. 33373–33376, 1997.

TONG, X. et al. Interaction of the bovine papillomavirus E6 protein with the clathrin adaptor complex AP-1. **Journal of Virology**, v. 72, n. 1, p. 476, 1998.

TONG, X.; HOWLEY, P. The bovine papillomavirus E6 oncoprotein interacts with paxillin and disrupts the actin cytoskeleton. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 9, p. 4412–7, abr. 1997.

TORRE, G. et al. Host cell tropism, genome characterization, and evolutionary features of OaPV4, a novel Deltapapillomavirus identified in sheep fibropapilloma. **Veterinary Microbiology**, v. 204, n. April, p. 151–158, 2017.

TRUS, B. L. et al. Novel structural features of bovine papillomavirus capsid revealed by a three-dimensional reconstruction to 9 Å resolution. **Nature structural biology**, v. 4, n. 5, p. 413–420, 1997.

TUMBARELLO, D. A.; BROWN, M. C.; TURNER, C. E. The paxillin LD motifs. **FEBS Letters**, v. 513, n. 1, p. 114–118, 2002.

ULLMAN, C. et al. Predicted alpha-helix/beta-sheet secondary structures for the zinc-binding motifs of human papillomavirus E7 and E6 proteins by consensus prediction averaging and spectroscopic studies of E7. **The Biochemical Journal**, v. 319, p. 229–239, 1996.

URE, A. E. et al. Characterization of the complete genomes of *Camelus dromedarius* papillomavirus types 1 and 2. **The Journal of general virology**, v. 92, n. 8, p. 1769–1777, 2011.

VAN BRESSEM, M. F. et al. Genital warts in Burmeister's porpoises: Characterization of *Phocoena spinipinnis* papillomavirus type 1 (PsPV-1) and evidence for a second, distantly related PsPV. **Journal of General Virology**, v. 88, n. 7, p. 1928–1933, 2007.

VAN DOORSLAER, K. et al. Identification of Unusual E6 and E7 Proteins within Avian Papillomaviruses: Cellular Localization, Biophysical Characterization, and Phylogenetic Analysis. **Journal of Virology**, v. 83, n. 17, p. 8759–8770, 2009.

VAN DOORSLAER, K. Evolution of the Papillomaviridae. **Virology**, v. 445, n. 1–2, p. 11–20, 2013.

VAN DYK, E. et al. Detection and characterisation of papillomavirus in skin lesions of giraffe and sable antelope in South Africa. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 82, n. 2, p. 80–85, 2011.

VAN REGENMORTEL, M. H. V. Introduction to the species concept in virus taxonomy. (In) Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. p. 3–16, Academic Press, 2000.

VAN REGENMORTEL, M. H. V. ; BISHOP, D. H. L.; FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A. S.; MANILOFF, J.; CALISHER, C. M. Guidelines to the demarcation of virus species. **Arch. Virol.**, v. 142, p. 1506–1517, 1997.

VANDE POL, S. B.; KLINGELHUTZ, A. J. Papillomavirus E6 oncoproteins. **Virology**, v. 445, n. 0, p. 115–137, 2013.

VANMECHELEN, B. et al. Identification of a novel species of papillomavirus in giraffe lesions using nanopore sequencing. **Veterinary Microbiology**, v. 201, p. 26–31, 2017.

VILLA, L. L. et al. Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, n. 5, p. 271–278, 2005.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentals of Biochemistry**. 2. ed. New York. Wiley. 2002.

VOUSDEN, K. Interactions of human with the products papilomavirus transforming of tumor suppressor genes proteins. **The FASEB Journal**, v. 7, n. 10, p. 872–879, 1993.

WADE, R.; BRIMER, N.; POL, S. Transformation by bovine papillomavirus type 1 E6 requires paxillin. **Journal of Virology**, v. 82, n. 12, p. 5962–5966, 2008.

WAIN-HOBSON, S. et al. Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV. **Cell**, v. 40, n. 1, p. 9–17, 1985.

WANG, J. W.; RODEN, R. B. S. Virus-like particles for the prevention of human papillomavirus-associated malignancies. **Expert Rev Vaccines**, v. 12, n. 2, p. 1–22, 2014.

WAZER, D. E. et al. immortalization of distinct human mammary epithelial cell types by human papilloma virus 16 E6 or E7. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 9, p. 3687–3691, 1995.

WHEELER, D. L. ; CHURCH, D. M.; LASH, A. E.; LEIPE, D. D.; MADDEN, T. L.; PONTIUS, J. U.; SCHULER, G. D.; LYNN M. SCHRIML, L. M.; TATUSOVA, T. A.; WAGNER, L.; RAPP, B. A. Database resources of the National Center for

Biotechnology information: 2002 update. **Nucleic Acid Reserch**, v. 30, n. 1, p. 13-16, 2002.

WOSIACKI, S. R. et al. Semi-nested PCR for detection and typing of bovine Papillomavirus type 2 in urinary bladder and whole blood from cattle with enzootic haematuria. **Journal of Virological Methods**, v. 126, n. 1–2, p. 215–219, 2005.

XIANG, Z. Advances in Homology Protein Structure Modeling. **Curr. Protein Pept. Sci.**, v. 7, n. 3, p. 217–227, 2006.

YANG, Y.; OKAYAMA, H.; HOWLEY, P. Bovine papillomavirus contains multiple transforming genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, n. 4, p. 1030–1034, 1985.

YASUMOTO, S. et al. Human papillomavirus type 16 DNA-induced malignant transformation of NIH 3T3 cells. **Journal of Virology**, v. 57, n. 2, p. 572–577, 1986.

YOU, J. et al. Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes. **Cell**, v. 117, n. 3, p. 349–360, 2004.

YUAN, Z. et al. Equine sarcoid fibroblasts over-express matrix metalloproteinases and are invasive. **Virology**, v. 396, n. 1, p. 143–151, 2010.

YUAN, Z. et al. Different contribution of bovine papillomavirus type 1 oncoproteins to the transformation of equine fibroblasts. **Journal of General Virology**, v. 92, n. 4, p. 773–783, 2011.

ZANIER, K. et al. Structural Basis for Hijacking of Cellular LxxLL Motifs by Papillomavirus E6 Oncoproteins. **Science**, v. 339, n. 6120, p. 694–698, 2013.

ZHU, W. et al. Bos grunniens papillomavirus type 1: A novel deltapapillomavirus associated with fibropapilloma in yak. **Journal of General Virology**, v. 94, p. 159–165, 2013.

ZIMMERMANN, H. et al. The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein can down-regulate p53 activity by targeting the transcriptional coactivator CBP/p300. **Journal of Virology**, v. 73, n. 8, p. 6209, 1999.

ZIMMERMANN, H. et al. Interaction with CBP/p300 enables the bovine papillomavirus type 1 E6 oncoprotein to downregulate CBP/p300-mediated transactivation by p53. **Journal of General Virology**, v. 81, n. 11, p. 2617–2623, 2000.

ZUR HAUSEN, H. Papillomavirus infections — a major cause of human cancers. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1288, n. 2, p. F55–F78, 1996.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 92, n. 9, p. 690–698, 2000.

BLOG METTZER. **Pagar para fazer trabalho acadêmico é ilegal**. Disponível em: <<https://blog.mettzer.com/fraude-academica-e-ilegal/>> Acesso em: 23 de junho de 2017

National Center for Biotechnology Information (NCBI)[Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; (1988). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>> Acesso em: 12 de janeiro de 2018.

Nobelprize.org. Disponível em: <<https://www.nobelprize.org/>> Acesso em 23 julho 2016.

Papillomavirus Episteme (PaVE). Disponível em: <<https://pave.niaid.nih.gov/>>. Acesso em 18 de janeiro de 2018.

MerckVaccines.com. Disponível em: <<https://www.merckvaccines.com/Products/Gardasil9/hpv-types>>. Acesso em 15 de janeiro de 2018.

AHDB Beef & Lamb, Agriculture & Horticulture Development Board. Disponível em: <<http://beefandlamb.ahdb.org.uk>>. Acesso em 17 de agosto de 2017.

The Free Dictionary by FARLEX. Disponível em: <<https://www.thefreedictionary.com>>. Acesso em 23 de novembro de 2017).

ASPACO, Associação Paulista de Criadores de Ovinos. Disponível em: <<http://www.aspaco.org.br>> Acesso em 15 de agosto de 2017.

APÊNDICES

Apêndice 1 - Resultados do gráfico de Ramachandran, gerado pelo programa PROCHECK para o AaPV1.

AaPV1										
Modelo										
AA	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10
Ala	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Arg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Asn	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0
Asp	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
Cys	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gln	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Glu	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gly	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0
His	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Ile	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leu	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lys	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1
Met	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Phe	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Pro	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
Ser	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Thr	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Trp	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tyr	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Val	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
TOTAL	4	6	5	5	6	4	7	5	4	6

Resultados do gráfico de Ramachandran, gerado pelo programa PROCHECK, para cada resíduo de aminoácido para cada modelo gerado para o tipo viral AaPV1. O número de resíduos que se encontra em regiões desfavoráveis está indicado para cada tipo de aminoácido.

Apêndice 2 - Resultados do gráfico de Ramachandran, gerado pelo programa PROCHECK para o BgPV1.

BgPV1										
Modelo										
AA	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10
Ala	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Arg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Asn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Asp	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cys	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1
Gln	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glu	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gly	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
His	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ile	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leu	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lys	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Met	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Phe	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pro	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ser	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Thr	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Trp	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tyr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Val	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	1	1	2	2	1	2	1	1	1	2

Resultados do gráfico de Ramachandran, gerado pelo programa PROCHECK, para cada resíduo de aminoácido para cada modelo gerado para o tipo viral BgPV1. O número de resíduos que se encontra em regiões desfavoráveis está indicado para cada tipo de aminoácido.

Apêndice 3 - Resultados do gráfico de Ramachandran, gerado pelo programa PROCHECK para o BPV2.

BPV2										
Modelo										
AA	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10
Ala	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Arg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Asn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Asp	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cys	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Gln	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Glu	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gly	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
His	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Ile	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Leu	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lys	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Met	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Phe	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pro	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ser	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
Thr	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Trp	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tyr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Val	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	1	1	1	2	1	3	3	2	1	1

Resultados do gráfico de Ramachandran, gerado pelo programa PROCHECK, para cada resíduo de aminoácido para cada modelo gerado para o tipo viral BPV2. O número de resíduos que se encontra em regiões desfavoráveis está indicado para cada tipo de aminoácido.

Apêndice 4 - Resultados do gráfico de Ramachandran, gerado pelo programa PROCHECK para o BPV13.

BPV13										
Modelo										
AA	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10
Ala	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0
Arg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Asn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Asp	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cys	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Gln	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Glu	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gly	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
His	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ile	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leu	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lys	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Met	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Phe	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pro	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Ser	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Thr	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Trp	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tyr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Val	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	3	3	1	1	2	2	2	2	2	1

Resultados do gráfico de Ramachandran, gerado pelo programa PROCHECK, para cada resíduo de aminoácido para cada modelo gerado para o tipo viral BPV13. O número de resíduos que se encontra em regiões desfavoráveis está indicado para cada tipo de aminoácido.

Apêndice 5 - Resultados do gráfico de Ramachandran, gerado pelo programa PROCHECK para o BPV14.

BPV14										
Modelo										
AA	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10
Ala	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Arg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Asn	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Asp	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Cys	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gln	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glu	1	1	2	0	0	1	1	1	1	1
Gly	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
His	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ile	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leu	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lys	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Met	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Phe	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pro	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ser	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Thr	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
Trp	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tyr	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Val	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	2	2	3	1	3	2	2	3	2	2

Resultados do gráfico de Ramachandran, gerado pelo programa PROCHECK, para cada resíduo de aminoácido para cada modelo gerado para o tipo viral BPV14. O número de resíduos que se encontra em regiões desfavoráveis está indicado para cada tipo de aminoácido.

Apêndice 6 - Resultados do gráfico de Ramachandran, gerado pelo programa PROCHECK para o CcaPV1.

CcaPV1										
Modelo										
AA	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10
Ala	2	1	1	1	1	2	1	1	2	1
Arg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Asn	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Asp	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Cys	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0
Gln	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Glu	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
Gly	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
His	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Ile	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leu	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lys	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Met	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Phe	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1
Pro	0	1	2	1	2	0	1	2	2	1
Ser	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Thr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Trp	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tyr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Val	0	1	2	1	1	2	0	0	1	0
TOTAL	3	7	6	4	7	7	3	7	6	3

Resultados do gráfico de Ramachandran, gerado pelo programa PROCHECK, para cada resíduo de aminoácido para cada modelo gerado para o tipo viral CcaPV1. O número de resíduos que se encontra em regiões desfavoráveis está indicado para cada tipo de aminoácido.

Apêndice 7 - Resultados do gráfico de Ramachandran, gerado pelo programa PROCHECK para o CdPV1.

CdPV1										
Modelo										
AA	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10
Ala	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Arg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Asn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Asp	1	1	0	0	0	0	2	0	0	0
Cys	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gln	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glu	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gly	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
His	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0
Ile	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leu	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
Lys	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1
Met	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Phe	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pro	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Ser	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Thr	0	1	1	1	0	0	0	0	2	0
Trp	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tyr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Val	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	3	4	2	3	3	3	4	4	5	2

Resultados do gráfico de Ramachandran, gerado pelo programa PROCHECK, para cada resíduo de aminoácido para cada modelo gerado para o tipo viral CdPV1. O número de resíduos que se encontra em regiões desfavoráveis está indicado para cada tipo de aminoácido.

Apêndice 8 - Resultados do gráfico de Ramachandran, gerado pelo programa PROCHECK para o CdPV2.

CdPV2										
Modelo										
AA	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10
Ala	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Arg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Asn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Asp	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cys	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gln	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glu	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gly	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
His	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0
Ile	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leu	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Lys	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1
Met	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Phe	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Pro	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Ser	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Thr	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
Trp	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tyr	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Val	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	3	4	5	3	4	5	4	3	4	3

Resultados do gráfico de Ramachandran, gerado pelo programa PROCHECK, para cada resíduo de aminoácido para cada modelo gerado para o tipo viral CdPV2. O número de resíduos que se encontra em regiões desfavoráveis está indicado para cada tipo de aminoácido.

Apêndice 9 - Resultados do gráfico de Ramachandran, gerado pelo programa PROCHECK para o OaPV1.

OaPV1										
Modelo										
AA	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10
Ala	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
Arg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Asn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Asp	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cys	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
Gln	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glu	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gly	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
His	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ile	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leu	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lys	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Met	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Phe	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pro	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ser	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Thr	1	0	1	2	0	2	1	1	1	0
Trp	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tyr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Val	2	1	0	1	0	1	1	1	1	1
TOTAL	3	1	1	4	2	3	3	3	2	1

Resultados do gráfico de Ramachandran, gerado pelo programa PROCHECK, para cada resíduo de aminoácido para cada modelo gerado para o tipo viral OaPV1. O número de resíduos que se encontra em regiões desfavoráveis está indicado para cada tipo de aminoácido.

Apêndice 10 - Resultados do gráfico de Ramachandran, gerado pelo programa PROCHECK para o OaPV2.

OaPV2										
Modelo										
AA	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10
Ala	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1
Arg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Asn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Asp	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cys	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gln	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glu	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Gly	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
His	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ile	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leu	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lys	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0
Met	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Phe	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pro	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ser	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Thr	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0
Trp	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tyr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Val	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0
TOTAL	4	2	3	1	2	3	1	2	2	1

Resultados do gráfico de Ramachandran, gerado pelo programa PROCHECK, para cada resíduo de aminoácido para cada modelo gerado para o tipo viral OaPV2. O número de resíduos que se encontra em regiões desfavoráveis está indicado para cada tipo de aminoácido.

Apêndice 11 - Resultados do gráfico de Ramachandran, gerado pelo programa PROCHECK para o OvPV1.

OvPV1										
Modelo										
AA	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10
Ala	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Arg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Asn	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Asp	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Cys	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gln	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0
Glu	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
Gly	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
His	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Ile	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leu	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Lys	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
Met	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Phe	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Pro	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ser	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Thr	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0
Trp	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tyr	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Val	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	5	4	6	7	5	6	6	7	5	5

Resultados do gráfico de Ramachandran, gerado pelo programa PROCHECK, para cada resíduo de aminoácido para cada modelo gerado para o tipo viral OvPV1. O número de resíduos que se encontra em regiões desfavoráveis está indicado para cada tipo de aminoácido.

Apêndice 12 - Resultados do gráfico de Ramachandran, gerado pelo programa PROCHECK para o RalPV1.

RalPV1										
Modelo										
AA	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10
Ala	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Arg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Asn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Asp	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1
Cys	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gln	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glu	1	0	2	1	1	1	1	0	1	1
Gly	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
His	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ile	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leu	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lys	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Met	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Phe	0	1	1	1	2	1	1	1	1	1
Pro	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ser	0	0	0	0	2	0	0	0	1	1
Thr	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Trp	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tyr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Val	0	0	1	2	0	0	1	0	2	1
TOTAL	4	5	7	7	8	6	6	4	8	7

Resultados do gráfico de Ramachandran, gerado pelo programa PROCHECK, para cada resíduo de aminoácido para cada modelo gerado para o tipo viral RalPV1. O número de resíduos que se encontra em regiões desfavoráveis está indicado para cada tipo de aminoácido.

Apêndice 13 - Resultados do gráfico de Ramachandran, gerado pelo programa PROCHECK para o RtPV1.

RtPV1										
Modelo										
AA	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10
Ala	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Arg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Asn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Asp	1	1	2	1	1	0	0	1	1	1
Cys	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gln	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
Glu	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1
Gly	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1
His	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
Ile	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Leu	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lys	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Met	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Phe	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Pro	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1
Ser	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Thr	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Trp	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tyr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Val	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1
TOTAL	6	4	6	4	4	3	4	6	5	8

Resultados do gráfico de Ramachandran, gerado pelo programa PROCHECK, para cada resíduo de aminoácido para cada modelo gerado para o tipo viral RtPV1. O número de resíduos que se encontra em regiões desfavoráveis está indicado para cada tipo de aminoácido.

Apêndice 14 - Análise dos modelos gerados para a proteína E6 do AaPV1 pelo PROCHECK.

AaPV1								
Mod	Ramachandran			D	Distorções			G-factors
	F	AF	GF		TL	Plan	DA	
1	87,8	11,3	0,9	0	2	0	2	-0,09
2	87,8	9,6	2,6	0	7	0	1	-0,05
3	88,7	9,6	1,7	0	2	0	2	-0,02
4	91,3	8,7	0	0	6	0	2	0,02
5	91,3	7,8	0,9	0	3	0	1	-0,01
6	90,7	9,3	0	0	0	0	0	-0,1
7	87,8	10,4	1,7	0	6	0	3	-0,07
8	86,1	12,2	1,7	0	2	0	3	-0,05
9	89,6	8,7	1,7	0	6	0	1	-0,03
10	85,6	13,6	0,8	0	4	0	2	-0,05

Mod: Modelo.

F: região favorável.

AF: região adicionalmente favorável.

GF: região generosamente favorável.

D: região desfavorável.

TL: Tamanho das Ligações.

Plan: Planaridade.

DA: Distorções Angulares.

Análise dos modelos gerados para a proteína E6 do tipo viral AaPV1: Estatísticas do gráfico de Ramachandram, planaridade de ligações, distorções angulares e Fator-G (Overall).

Dados gerados pelo programa PROCHECK.

Apêndice 15 - Análise dos modelos gerados para a proteína E6 do BgPV1 pelo PROCHECK.

BgPV1								
Mod	Ramachandran			D	Distorções			G-factors
	F	AF	GF		TL	Plan	DA	
1	95	5	0	0	0	0	0	0,12
2	93,4	6,6	0	0	0	0	0	0,12
3	93,4	6,6	0	0	0	0	1	0,02
4	93,4	6,6	0	0	0	0	1	0,02
5	92,6	7,4	0	0	0	0	0	0,1
6	91,7	7,4	0,8	0	0	0	1	0,1
7	92,7	7,4	0	0	0	0	0	0,07
8	93,4	6,6	0	0	0	0	0	0,07
9	93,4	6,6	0	0	0	0	0	0,13
10	94,2	5,8	0	0	0	0	0	0,14

Mod: Modelo.

F: região favorável.

AF: região adicionalmente favorável.

GF: região generosamente favorável.

D: região desfavorável.

TL: Tamanho das Ligações.

Plan: Planaridade.

DA: Distorções Angulares.

Análise dos modelos gerados para a proteína E6 do tipo viral BgPV1: Estatísticas do gráfico de Ramachandram, planaridade de ligações, distorções angulares e Fator-G (Overall).

Dados gerados pelo programa PROCHECK.

Apêndice 16 - Análise dos modelos gerados para a proteína E6 do BPV2 pelo PROCHECK.

BPV2								
Mod	Ramachandran			D	Distorções			G-factors
	F	AF	GF		TL	Plan	DA	
1	93,3	6,7	0	0	0	0	0	0,14
2	91,7	8,3	0	0	0	0	0	0,11
3	92,5	6,7	0,8	0	0	0	1	0,1
4	91,7	8,3	0	0	0	0	0	0,05
5	91,7	8,3	0	0	0	0	0	0,1
6	93,3	5,8	0,9	0	0	0	1	0,12
7	93,3	5,8	0	0,8	0	0	0	0,09
8	91,7	7,5	0,8	0	1	0	1	0,1
9	90	10		0	0	0	0	0,1
10	95	5	0	0	0	0	0	0,14

Mod: Modelo.

F: região favorável.

AF: região adicionalmente favorável.

GF: região generosamente favorável.

D: região desfavorável.

TL: Tamanho das Ligações.

Plan: Planaridade.

DA: Distorções Angulares.

Análise dos modelos gerados para a proteína E6 do tipo viral BPV2: Estatísticas do gráfico de Ramachandram, planaridade de ligações, distorções angulares e Fator-G (Overall).

Dados gerados pelo programa PROCHECK.

Apêndice 17 - Análise dos modelos gerados para a proteína E6 do BPV13 pelo PROCHECK.

BPV13								
Mod	Ramachandran			D	Distorções			G-factors
	F	AF	GF		TL	Plan	DA	
1	92,4	7,6	0	0	0	0	0	0,07
2	90,7	8,5	0,8	0	0	0	1	0,12
3	92,4	7,6	0	0	0	0	0	0,12
4	92,4	7,6	0	0	0	0	1	0,11
5	93,2	6,8	0	0	0	0	0	0,06
6	91,5	7,6	0,9	0	0	0	1	0,06
7	92,4	6,8	0,8	0	0	0	1	0,12
8	92,4	6,8	0,8	0	1	0	3	0,07
9	93,2	6,8	0	0	0	0	0	0,09
10	92,4	7,6	0	0	0	0	0	0,06

Mod: Modelo.

F: região favorável.

AF: região adicionalmente favorável.

GF: região generosamente favorável.

D: região desfavorável.

TL: Tamanho das Ligações.

Plan: Planaridade.

DA: Distorções Angulares.

Análise dos modelos gerados para a proteína E6 do tipo viral BPV13: Estatísticas do gráfico de Ramachandram, planaridade de ligações, distorções angulares e Fator-G (Overall).

Dados gerados pelo programa PROCHECK.

Apêndice 18 - Análise dos modelos gerados para a proteína E6 do BPV14 pelo PROCHECK.

BPV14								
Mod	Ramachandran			D	Distorções			G-factors
	F	AF	GF		TL	Plan	DA	
1	95,2	4,8	0	0	0	0	0	0,06
2	95,9	3,4	0	0,7	0	0	0	0,05
3	95,2	4,1	0,7	0	0	0	0	0,03
4	91,2	8,8	0	0	0	0	0	0,05
5	93,2	6,2	0	0	0	0	1	0,03
6	93,8	6,2	0	0	0	0	0	0,04
7	93,2	6,1	0,7	0	0	0	1	0
8	94,6	4,8	0,7	0	0	0	1	0,06
9	93,9	6,1	0	0	0	0	0	0,05
10	95,9	4,1	0	0	0	0	0	0,08

Mod: Modelo.

F: região favorável.

AF: região adicionalmente favorável.

GF: região generosamente favorável.

D: região desfavorável.

TL: Tamanho das Ligações.

Plan: Planaridade.

DA: Distorções Angulares.

Análise dos modelos gerados para a proteína E6 do tipo viral BPV14: Estatísticas do gráfico de Ramachandram, planaridade de ligações, distorções angulares e Fator-G (Overall).

Dados gerados pelo programa PROCHECK.

Apêndice 19 - Análise dos modelos gerados para a proteína E6 do CcaPV1 pelo PROCHECK.

CcaPV1								
Mod	Ramachandran			D	Distorções			G-factors
	F	AF	GF		TL	Plan	DA	
1	89,6	9,6	0,9	0	2	0	0	-0,04
2	90,4	9,6	0	0	7	0	1	-0,04
3	87,8	11,3	0,9	0	1	0	1	0,01
4	87	12,2	0,9	0	2	0	2	-0,02
5	89,6	9,6	0,9	0	5	0	1	-0,06
6	90,4	8,7	0	0,9	3	0	1	-0,04
7	90,4	8,7	0,9	0	2	0	0	-0,04
8	91,3	8,7	0	0	2	0	0	0,01
9	89,6	10,4	0	0	2	0	1	-0,07
10	90,4	8,7	0,9	0	2	0	1	0,01

Mod: Modelo.

F: região favorável.

AF: região adicionalmente favorável.

GF: região generosamente favorável.

D: região desfavorável.

TL: Tamanho das Ligações.

Plan: Planaridade.

DA: Distorções Angulares.

Análise dos modelos gerados para a proteína E6 do tipo viral CcaPV1: Estatísticas do gráfico de Ramachandram, planaridade de ligações, distorções angulares e Fator-G (Overall).

Dados gerados pelo programa PROCHECK.

Apêndice 20 - Análise dos modelos gerados para a proteína E6 do CdPV1 pelo PROCHECK.

CdPV1								
Mod	Ramachandran			D	Distorções			G-factors
	F	AF	GF		TL	Plan	DA	
1	94,7	4,4	0,9	0	1	0	0	0,07
2	90,3	8,8	0,9	0	1	0	0	0,04
3	93,3	5,3	0	0,9	0	0	0	0,05
4	91,2	8,8	0	0	0	0	1	-0,09
5	89,4	10,6	0	0	0	0	1	0,01
6	92,9	6,2	0,9	0	0	0	0	0,06
7	92	7,1	0	0,9	0	0	0	0,04
8	90,3	8,8	0	0,9	1	0	0	-0,01
9	92	7,1	0	0,9	0	0	0	0,05
10	93,8	6,2	0	0	0	0	0	0,02

Mod: Modelo.

F: região favorável.

AF: região adicionalmente favorável.

GF: região generosamente favorável.

D: região desfavorável.

TL: Tamanho das Ligações.

Plan: Planaridade.

DA: Distorções Angulares.

Análise dos modelos gerados para a proteína E6 do tipo viral CdPV1: Estatísticas do gráfico de Ramachandram, planaridade de ligações, distorções angulares e Fator-G (Overall).

Dados gerados pelo programa PROCHECK.

Apêndice 21 - Análise dos modelos gerados para a proteína E6 do CdPV2 pelo PROCHECK.

CdPV2								
Mod	Ramachandran			D	Distorções			G-factors
	F	AF	GF		TL	Plan	DA	
1	91,7	7,3	0	0,9	4	0	1	0
2	88,1	11	0,9	0	3	0	1	-0,03
3	89	8,3	1,8	0,9	2	0	1	-0,03
4	91,7	7,3	0	0,9	3	0	1	-0,01
5	89,9	9,2	0	0,9	3	0	1	0,01
6	90,8	7,3	0	1,8	3	0	1	0,04
7	91,7	6,4	0	1,8	4	0	2	0
8	91,7	7,3	0	0,9	4	0	2	0,01
9	90,8	8,3	0	0,9	4	0	3	-0,03
10	90,8	8,3	0	0,9	4	0	1	0

Mod: Modelo.

F: região favorável.

AF: região adicionalmente favorável.

GF: região generosamente favorável.

D: região desfavorável.

TL: Tamanho das Ligações.

Plan: Planaridade.

DA: Distorções Angulares.

Análise dos modelos gerados para a proteína E6 do tipo viral CdPV2: Estatísticas do gráfico de Ramachandram, planaridade de ligações, distorções angulares e Fator-G (Overall).

Dados gerados pelo programa PROCHECK.

Apêndice 22 - Análise dos modelos gerados para a proteína E6 do OaPV1 pelo PROCHECK.

OaPV1								
Mod	Ramachandran			D	Distorções			G-factors
	F	AF	GF		TL	Plan	DA	
1	90,8	9,2	0	0	0	0	0	0,03
2	92,7	7,3	0	0	0	0	0	0,04
3	93,6	6,4	0	0	0	0	0	0,03
4	92,7	6,4	0,9	0	0	0	0	0,03
5	91,7	7,3	0	0,9	0	0	0	0,05
6	92,7	7,3	0	0	1	0	0	0,01
7	93,6	5,5	0	0,9	0	0	0	0,05
8	91,7	8,3	0	0	0	0	0	0,04
9	95,4	3,7	0,9	0	0	0	0	0
10	92,7	7,3	0	0	0	0	0	0,04

Mod: Modelo.

F: região favorável.

AF: região adicionalmente favorável.

GF: região generosamente favorável.

D: região desfavorável.

TL: Tamanho das Ligações.

Plan: Planaridade.

DA: Distorções Angulares.

Análise dos modelos gerados para a proteína E6 do tipo viral OaPV1: Estatísticas do gráfico de Ramachandram, planaridade de ligações, distorções angulares e Fator-G (Overall).

Dados gerados pelo programa PROCHECK.

Apêndice 23 - Análise dos modelos gerados para a proteína E6 do OaPV2 pelo PROCHECK.

OaPV2								
Mod	Ramachandran			D	Distorções			G-factors
	F	AF	GF		TL	Plan	DA	
1	89,9	8,3	1,8	0	0	0	1	0,05
2	91,7	8,3	0	0	0	0	1	0,03
3	90,8	8,3	0	0,9	0	0	0	0,05
4	90,8	8,3	0	0,9	0	0	0	0,04
5	90,8	9,2	0	0	0	0	1	0
6	91,7	7,3	0	0,9	0	0	0	-0,03
7	90,8	9,2	0	0	0	0	0	0,03
8	90,8	8,3	0,9	0	0	0	0	0,02
9	91,7	8,3	0	0	0	0	0	0,06
10	93,6	5,5	0,9	0	0	0	0	-0,06

Mod: Modelo.

F: região favorável.

AF: região adicionalmente favorável.

GF: região generosamente favorável.

D: região desfavorável.

TL: Tamanho das Ligações.

Plan: Planaridade.

DA: Distorções Angulares.

Análise dos modelos gerados para a proteína E6 do tipo viral OaPV2: Estatísticas do gráfico de Ramachandram, planaridade de ligações, distorções angulares e Fator-G (Overall).

Dados gerados pelo programa PROCHECK.

Apêndice 24 - Análise dos modelos gerados para a proteína E6 do OvPV1 pelo PROCHECK.

OvPV1								
Mod	Ramachandran			D	Distorções			G-factors
	F	AF	GF		TL	Plan	DA	
1	90,8	7,6	1,7	0	5	0	1	-0,04
2	89,9	9,2	0,8	0	7	0	1	-0,04
3	89,1	9,2	1,7	0	6	0	1	-0,04
4	89,9	9,2	0,8	0	7	0	2	0
5	91,6	7,6	0,8	0	8	0	1	-0,03
6	89,1	8,4	2,5	0	7	0	3	-0,03
7	89,1	10,1	0	0,8	9	0	3	-0,03
8	89,9	9,2	0	0,8	8	0	1	-0,1
9	89,9	8,4	1,7	0	5	0	1	-0,02
10	92,4	5,9	1,7	0	5	0	0	-0,04

Apêndice 25 - Análise dos modelos gerados para a proteína E6 do RalPV1 pelo PROCHECK.

RalPV1								
Mod	Ramachandran			D	Distorções			G-factors
	F	AF	GF		TL	Plan	DA	
1	90,5	8,6	0,9	0	1	0	1	0
2	89,7	10,3	0	0	5	0	1	-0,03
3	89,7	9,5	0,9	0	2	0	1	-0,02
4	88,8	10,3	0,9	0	1	0	1	-0,03
5	86,2	12,9	0,9	0	4	0	0	-0,02
6	90,5	8,6	0,9	0	2	0	1	0,03
7	88,8	10,3	0,9	0	1	0	2	0
8	91,4	6,9	0,9	0,9	1	0	1	-0,03
9	87,9	8,6	3,4	0	3	0	3	-0,09
10	87,9	8,6	2,6	0,9	4	0	2	-0,02

Mod: Modelo.

F: região favorável.

AF: região adicionalmente favorável.

GF: região generosamente favorável.

D: região desfavorável.

TL: Tamanho das Ligações.

Plan: Planaridade.

DA: Distorções Angulares.

Análise dos modelos gerados para a proteína E6 do tipo viral RalPV1: Estatísticas do gráfico de Ramachandram, planaridade de ligações, distorções angulares e Fator-G (Overall).

Dados gerados pelo programa PROCHECK.

Apêndice 26 - Análise dos modelos gerados para a proteína E6 do RtPV1 pelo PROCHECK.

RtPV1								
Mod	Ramachandran			D	Distorções			G-factors
	F	AF	GF		TL	Plan	DA	
1	87,3	8,9	0,8	0	1	0	1	-0,08
2	90,7	8,5	0,8	0	2	0	1	-0,01
3	90,7	8,5	0,8	0	2	0	1	-0,05
4	90,7	9,3	0	0	1	0	1	-0,03
5	88,1	10,2	1,7	0	2	0	1	0
6	89	10,2	0,8	0	2	0	1	-0,03
7	89	10,2	0,8	0	6	0	3	-0,06
8	89	9,3	1,7	0	6	0	1	-0,04
9	88,1	10,2	1,7	0	2	0	3	-0,01
10	88,1	10,2	1,7	0	6	0	1	-0,12

Mod: Modelo.

F: região favorável.

AF: região adicionalmente favorável.

GF: região generosamente favorável.

D: região desfavorável.

TL: Tamanho das Ligações.

Plan: Planaridade.

DA: Distorções Angulares.

Análise dos modelos gerados para a proteína E6 do tipo viral RtPV1: Estatísticas do gráfico de Ramachandram, planaridade de ligações, distorções angulares e Fator-G (Overall).

Dados gerados pelo programa PROCHECK.

Anexo 1 - Publicação: Proteína E6 do BPV, análise de sequência e evolução molecular.

Veterinary Microbiology 181 (2015) 328–333

Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetmic

Letter to the Editor

Bos taurus papillomavirus (BPV) E6 protein: Sequence analysis and molecular evolution

By 2015 thirteen types of *Bos taurus papillomavirus* (BPV) were well characterized and classified into three distinct genera: *Delta* (BPV-1, -2 and -13), *Epsilon*, and *Xipapillomavirus* (Bernard et al., 2010; Hatama et al., 2011; Zhu et al., 2012; Lunardi et al., 2013a). Only BPV-7 is unclassified in these genera, because it is phylogenetically distant from the other BPV types (Ogawa et al., 2007). The Delta-PV types induce the appearance of fibropapillomas in cattle and also cause sarcoid in equines (Lunardi et al., 2013b; Nasir and Campo, 2008; Jelínek and Tachezy, 2005; Otten et al., 1993; Olson and Cook, 1951). More recently, a DNA sequence from feline sarcoid-associated papillomavirus (FeSarPV) was amplified and its genome was sequenced. This led to the description of a new viral type designated as BPV-14. The phylogenetic analysis based on a 2759bp concatenated nucleotide alignment of E1, E2, L1, and L2 ORF sequences revealed that the PV was closely related to the *Delta* BPV genus (Munday et al., 2015).

The Papillomavirus genomes contain all basic features that a putative virus should have, that is to say: regions responsible for replication (long control region – LCR), transcription (Early region

– E1 and E2) and, finally, viral packaging (late region – L1 and L2). Furthermore, it contains “adaptive proteins” (E5, E6 and/or E7) associated with uncontrolled cell proliferation and transformation processes (reviewed in Van Doorslaer, 2013; Gottschling et al., 2007; Garcia-Vallve et al., 2005). The E6 gene product is a basic protein, which tends to be positively charged at physiological pH, with Cys motifs conserved amongst all PVs corresponding to two zinc-binding sites. E6 *Deltapapillomavirus* are proteins formed by 137-amino acid residues with a similar spacing of 36 amino acids between the two conserved sites (Lunardi et al., 2013a; Mazzuchelli-de-Souza et al., 2013; Tong et al., 1998; Chen et al., 1997; Tong and Howley, 1997; Ullman et al., 1996; Barbosa et al., 1989). This encodes a transforming protein expressed in the initial stages of the infection. In humans, it targets the tumor suppressor protein p53 for degradation via ubiquitination, while in BPV-1 does not bind to p53 (reviewed in Garcia-Vallve et al., 2005).

Recently, Munday et al. (2015) proposed the classification of a novel *Bos taurus papillomavirus* type (BPV-14), with a very peculiar E6 protein. They stated “the E6 protein of the novel PV contained one conserved zinc-binding domain (CXXC-X29-CXXC, aa 40–76), which was separated by 36 amino acids from another putative zinc-binding domain with 30 nt between conserved CXXC motifs (aa 113–150)”. The Table 1 of the referred article indicated an E6 protein 137 amino acid in length, which does not match with the nucleotide length (495) showed in the same table or with the available GenBank sequence (accession number AKB94037), which

has a length of 164 amino acids. Moreover, there are 30 amino acids between the conserved CXXC motifs of the second putative zinc-binding domain (C₁₁₃XXC₁₁₆–30aa–C₁₄₇XXC₁₅₀). These little inconsistencies caught our attention and we decided to carry out a preliminary sequence and evolutionary analysis. Due to the importance of the description of this new papillomavirus type, and the role of E6 in the cellular transformation, we believe that additional theoretical and experimental analyses should be performed to validate this new putative E6 protein.

To evaluate the primary sequence and molecular evolution of the E6 protein family, we performed an exhaustive search through Pfam database (Finn et al., 2014). All E6 amino acid sequences available up to 9th June 2015 were downloaded and aligned using the Clustal Omega software (Sievers et al., 2011) based on a hidden Markov model profile for this family. The initial dataset was formed by 1357 sequences with an average domain length of 108 amino acids and an average identity of the alignment equal to 51%. After a rigorous process of manual sequence curation, excluding very short and incomplete sequences, the final dataset included 686 hits. The alignment was then manually edited to optimize the final positional homology necessary for further phylogenetic analysis. The evolutionary history of E6 protein family was obtained using a neighbor-joining algorithm (Saitou and Nei, 1987) and the *p* distance model implemented in MEGA 6

program (Tamura et al., 2013). We believe this to be the most comprehensive phylogenetic analysis of E6 proteins performed up to the present date considering the large number of sequences evaluated.

In relation to the E6 protein of BPV *Deltapapillomavirus*, the closest homolog sequences of BPV-14 E6 protein (accession number AKB94037) are shown in Table 1, which were obtained through the BLASTp algorithm (Altschul et al., 1990). The corresponding alignment performed with AliView software (Larsson, 2014), using the MAFFT algorithm (Katoh, 2013), can be seen in Fig. 1.

Based on the alignments, it is interesting to notice the absence of the first eighteen amino acids, including the first methionine of BPV-14 E6, in the E6 of BPV-1, -2 and -13 homolog sequences, which characterizes a huge insertion/deletion (indel) event. If we consider the second methionine (M₁₉) as the first amino acid, BPV-14 E6 has a insertion of five amino acids (QQIYA) at the start of its sequence and four (KESR) at the final, totaling a protein with 146 amino acids in length. These three indel events particularly distinguish the BPV-14 E6 protein from all other *Delta* BPV E6 described at the literature and must be analyzed more critically in an evolutionary context.

Considering the E6 initial regions among *Delta* BPV, one observes the sequence F₆XR₆NPFSGLXC₁₇ in BPV-1, -2 and -13 E6 proteins. A very similar region is found in *Bos grunniens papillomavirus* 1 (F6ARTNPFSGLDC17), while in BPV-14 E6 one

Anexo 27 - Publicação: Potencial mutagênico da E6 de BPV1.

Hindawi Publishing Corporation
 Hindawi Research International
 Volume 2015, Article ID 806361, 15 pages
<http://dx.doi.org/10.1155/2015/806361>

Research Article

Mutagenic Potential of *Bos taurus* Papillomavirus Type 1 E6 Recombinant Protein: First Description

Rodrigo Pinheiro Araldi,^{1,2} Jacqueline Mazzuchelli-de-Souza,^{1,2}
 Diego Grando Modolo,¹ Edilane Barreiros de Souza,³ Thatiana Corrêa de Melo,¹
 Diva Denelle Spadacci-Morena,⁴ Roberta Fiusa Magnelli,¹
 Márcio Augusto Caldas Rocha de Carvalho,¹ Paulo Luis de Sá Júnior,¹
 Rodrigo Franco de Carvalho,¹ Willy Beçak,¹ and Rita de Cassia Stocco¹

¹Laboratório de Genética, Instituto Butantan, 05503-900 São Paulo, SP, Brazil

²Programa de Pós-Graduação Interinstituições em Biotecnologia, Instituto de Ciências Biomédicas (ICB),
 Universidade de São Paulo (USP), 05508-900 São Paulo, SP, Brazil

³Laboratório de Biologia Molecular, Genética e Mutagenese, Departamento de Biologia, Faculdade de Ciências e Letras de
 Assis (FCLA), Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), 19066-900 Assis, SP, Brazil

⁴Laboratório de Fisiopatologia, Instituto Butantan, 05503-900 São Paulo, SP, Brazil

Correspondence should be addressed to Rita de Cassia Stocco; rita.stocco@butantan.gov.br

Received 16 July 2015; Revised 7 October 2015; Accepted 15 October 2015

Academic Editor: Janusz Blasiak

Copyright © 2015 Rodrigo Pinheiro Araldi et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Bovine papillomavirus (BPV) is considered a useful model to study HPV oncogenic process. BPV interacts with the host chromatin, resulting in DNA damage, which is attributed to E5, E6, and E7 viral oncoproteins activity. However, the oncogenic mechanisms of BPV E6 oncoprotein *per se* remain unknown. This study aimed to evaluate the mutagenic potential of *Bos taurus* papillomavirus type 1 (BPV-1) E6 recombinant oncoprotein by the cytokinesis-block micronucleus assay (CBMNA) and comet assay (CA). Peripheral blood samples of five calves were collected. Samples were subjected to molecular diagnosis, which did not reveal presence of BPV sequences. Samples were treated with 1 µg/mL of BPV-1 E6 oncoprotein and 50 µg/mL of cyclophosphamide (positive control). Negative controls were not submitted to any treatment. The samples were submitted to the CBMNA and CA. The results showed that BPV E6 oncoprotein induces clastogenesis *per se*, which is indicative of genomic instability. These results allowed better understanding the mechanism of cancer promotion associated with the BPV E6 oncoprotein and revealed that this oncoprotein can induce carcinogenesis *per se*. E6 recombinant oncoprotein has been suggested as a possible vaccine candidate. Results pointed out that BPV E6 recombinant oncoprotein modifications are required to use it as vaccine.

1. Introduction

Papillomaviruses (PVs) are a group of viruses with epithelium and mucous tropism [1, 2]. PVs can infect all vertebrates, including rabbits [3–5], dogs [6, 7], goats [8], humans [9–12], and bovines [13–15]. In the last decades, an increasing interest in studies involving these viruses has been observed [16, 17]. This fact is justified because the PVs are associated with benign (papillomas) and malignant lesions, which can affect both human [16, 18] and animals [1, 15, 19]. In this scenario,

Bos taurus papillomavirus is considered the best model for oncogenic process studies associated with PVs [20–23].

Bos taurus papillomaviruses, also known as bovine papillomaviruses (BPVs), have a worldwide distribution [23]. It is estimated that 60% of the Brazilian herd is infected by BPV [1]. However, this number can be greater, once the infection can be asymptomatic [24]. BPVs cause bovine papillomatosis, an infectious disease characterized by the presence of multiple papillomas, which can regress spontaneously or progress to malignancy [1]. Among the 14 BPVs types already

Anexo 3 - Publicação: Revisão sistemática sobre papilomavírus.

Genetics and Molecular Biology Online Ahead of Print
Copyright © 2017, Sociedade Brasileira de Genética. Printed in Brazil
DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2016-0128>

Papillomaviruses: a systematic review

Rodrigo Pinheiro Araldi^{1,2}, Suely Muro Reis Assaf¹, Rodrigo Franco de Carvalho¹, Márcio Augusto Caldas Rocha de Carvalho^{1,3}, Jacqueline Mazzuchelli de Souza^{1,2}, Roberta Fiusa Magnelli^{1,2}, Diego Grando Módolo¹, Franco Peppino Roperto⁴, Rita de Cassia Stocco¹ and Willy Beçak¹

¹Laboratório de Genética, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil.

²Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia, Instituto de Ciências Biomédicas (ICB), Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brazil.

³Programa de Aprimoramento Profissional (PAF), Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil

⁴Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli, Campania, Italy.

Abstract

In the last decades, a group of viruses has received great attention due to its relationship with cancer development and its wide distribution throughout the vertebrates: the papillomaviruses. In this article, we aim to review some of the most relevant reports concerning the use of bovines as an experimental model for studies related to papillomaviruses. Moreover, the obtained data contributes to the development of strategies against the clinical consequences of bovine papillomaviruses (BPV) that have led to drastic hazards to the herds. To overcome the problem, the vaccines that we have been developing involve recombinant DNA technology, aiming at prophylactic and therapeutic procedures. It is important to point out that these strategies can be used as models for innovative procedures against HPV, as this virus is the main causal agent of cervical cancer, the second most fatal cancer in women.

Keywords: bovine papillomavirus (BPV), bovine papillomatosis, carcinogenesis, natural history.

Received: May 09, 2016; Accepted: September 28, 2016.

A brief history of the papillomavirus (PVs) on carcinogenesis

In the last decades, novel diagnostic methods and therapies have been implemented in an attempt to combat cancer. However, the number of patients that succumb to the disease has increased globally (Varga *et al.*, 2014). This negative result emphasizes the complexity of the oncogenic process, which has a multifactorial cause. Among the etiological factors associated to cancer are the infectious agents, such as bacteria and viruses.

The association between cancer and infectious agents has been discussed for centuries (Graner, 2000). In 1858, George B. Wood stated in his book *Practice of Medicine* that cancer could be disseminated as an infectious disease (Graner, 2000). However, the association between cancer and infectious agents was only implied in the second half of 19th century by Rudolf Maier (Graner, 2000; zur Hausen, 2009). The major difficulty in demonstrating this association can be attributed to the time-lapse of 15-40 years be-

tween the infection and the development of the first clinical signs that would allow cancer diagnosis (zur Hausen, 2009). Yet, in the last decades, the involvement of infectious agents with cancer has aroused great attention, as one in ten human malignancies is caused by these pathogens (Ribeiro-Müller and Müller, 2014).

Current studies estimate that 23% of all human malignancies are associated with infectious agents (zur Hausen, 2009; WHO 2013; Brücher and Jamall, 2014; Bravo and Felez-Sanchez, 2015). Among them, human papillomavirus (HPV) is responsible for 27.9% (zur Hausen, 2009) to 30.0% (Bravo *et al.*, 2010) of all incident cancer cases in the world. This data is very concerning, once 75% of the global population lives in developing countries (Marrazzo and Holmes, 2013), where the lack of information about the HPV and others sexually transmitted diseases (STD) contributes to the increase of HPV-associated cancers. According to the World Health Organization (WHO) (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs380/en/>), 85% of cervical cancer cases occurs in less developed countries.

Papillomaviruses (PVs) are not only associated to human cancers, but also to animal malignancies. Although

Send correspondence to Willy Beçak. Laboratório de Genética, Instituto Butantan, Avenida Vital Brasil 1500, 05553900 São Paulo, SP, Brazil. E-mail: wbeçak@yahoo.com.br

Anexo 4 - Publicação: Produção de VLPs para vacinas profiláticas.

Vaccine 35 (2017) 1590–1593

Contents lists available at ScienceDirect

Vaccine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vaccine

Short communication

Integrated analysis of recombinant BPV-1 L1 protein for the production of a bovine papillomavirus VLP vaccine

Diego Grando Módolo^a, Rodrigo Pinheiro Araldi^{a,b}, Jacqueline Mazzuchelli-de-Souza^{a,b}, Alexandre Pereira^a, Daniel Carvalho Pimenta^c, Letícia Maria Zanphorlin^d, Willy Beçak^a, Marcelo Menossi^e, Rita de Cassia Stocco^a, Rodrigo Franco de Carvalho^{a,*}

^aLaboratório de Genética, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil

^bPrograma de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia, Instituto de Ciências Biomédicas (ICB), Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brazil

^cLaboratório de Bioquímica e Biofísica, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil

^dLaboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Biotanol, Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, Campinas, SP, Brazil

^eInstituto de Biologia, Departamento de Genética, Evolução e Biogerontes, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 October 2016

Received in revised form 31 January 2017

Accepted 2 February 2017

Available online 17 February 2017

Keywords:

Bovine papillomavirus

L1 protein

Capsomeres

VLP

Vaccine

Biosafety

ABSTRACT

Bovine papillomatosis is an infectious disease that is caused by bovine papillomavirus (BPV), which results in important economic losses. However, no BPV vaccines or effective treatment methods are commercially available to date. Moreover, the absence of papillomavirus replication *in vitro* makes the use of recombinant protein a promising candidate for vaccine formulations. Hence, we developed an integrated study on the L1 capsid protein of BPV-1, obtained from a bacterial expression system, regarding its purification, biosafety, thermostability and immunogenicity. The results indicated an absence of genotoxicity of the purified recombinant L1 protein, β -sheet prevalence of secondary structure folding, protein stability under high temperatures as well as the presence of capsomeres and VLPs. In addition, preliminary experimental vaccination of calves showed the production of specific antibodies against BPV-1 L1.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Bovine papillomatosis (BP) is an infectious disease that is caused by the bovine papillomavirus (BPV), a worldwide-distributed virus, presenting as multiple benign epithelial proliferative lesions [1]. The lesions can regress spontaneously or progress to malignancies when combined with environmental co-factor exposure [2]. BP causes economic losses mainly in dairy cattle. Affected animals usually show delayed development, weight loss, reduction of milk flow and reduced leather quality. Although the majority of BPVs are considered to be species-specific, BPVs from the *Deltapapillomavirus* genus are an exception because they affect other species, such as equines [3]. Particularly in horses, *Deltapapil-*

lomaviruses cause a non-metastatic but proliferative and invasive neoplasia known as equine sarcoid [4]. Furthermore, BP is considered to be a useful model for both oncologic and vaccine studies [5].

There are few methods available for BP treatment, namely: (1) application of surgical excision of papillomas, which is inefficient in large herds or animals with a high incidence of lesions; (2) self-hemotherapy, which stimulates the immune response against the infection; and (3) autogenous vaccination, which also has a limited efficacy [6].

Despite the proposal of several vaccine models [7–10], there are no commercial formulations against BPV available to date. Moreover, there is a lack of information about the mutagenic potential and stability of these models. On the other hand, the absence of papillomavirus replication *in vitro* makes recombinant DNA technology, based on *Escherichia coli* models, a useful tool for the development of new vaccine formulations [11,12]. In this sense, the papillomaviruses' structural proteins L1 and L2 are potential candidates for prophylactic immunization. These proteins can induce an effective humoral response once the epitopes displayed in the

Abbreviations: BP, Bovine papillomatosis; BPV, Bovine papillomavirus; CBMNT, Cytokinesis-block micronucleus test; ELISA, Enzyme-linked immunosorbent assay; HPV, Human papillomavirus; OPD, O-Phenylenediamine; PBS, Phosphate-buffered saline; VLPs, Virus-like particles.

* Corresponding author at: Laboratório de Genética, Instituto Butantan, Av. Vital Brasil, 1500, Butantã, São Paulo, SP, Brazil.

E-mail address: rodolfo@butantan.gov.br (R.F. de Carvalho).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.02.007>

0264-410X/© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Anexo 5 - Artigo publicado como Rapid Communication: Detecção de BPV2 em ovinos.

Received: 21 December 2017

DOI: 10.1111/tbed.12892

RAPID COMMUNICATION

WILEY *Transboundary and Emerging Diseases*

First detection of bovine papillomavirus type 2 in cutaneous wart lesions from ovinos

J. Mazzuchelli-de-Souza^{1,2} | R. F. de Carvalho¹ | D. G. Módolo¹ | C. E. Thompson³ |
R. P. Araldi^{1,2} | R. C. Stocco^{1,2}

¹Laboratório de Genética, Instituto Butantan, Secretaria de Estado da Saúde, São Paulo, Brazil

²Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

³Departamento de Farmacociências, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

Correspondence

Jacqueline Mazzuchelli-de-Souza,
Laboratório de Genética, Instituto Butantan,
Secretaria de Estado da Saúde, São Paulo,
Brazil.
Email: rita.stocco@butantan.gov.br

Funding information

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Grant/Award Number: 2016/09450-7; Fundação Butantan

Summary

This study diagnosed cutaneous wart lesions excised from three rams from a sheep farm in São Paulo State, Brazil. Histopathologically, these cases were diagnosed as papilloma. The amplification by PCR, sequencing and bioinformatics analysis showed that all the lesions presented DNA sequences of bovine papillomavirus type 2. This is the first report confirming the detection of BPV2 in papilloma warts from ovinos.

KEYWORDS

BPV2, ovine papillomas, papillomavirus, virus detection

Anexo 6 - Certificado de Participação em Curso Internacional.

Anexo 7 - Certificado de Participação em Evento Científico Internacional.

CERTIFICATE

We hereby declare that

Jacqueline Mazzuchelli-de-Souza

Attended the **3rd ICGEB Workshop on HPV and associated malignancies: biology, prevention and therapy.**
Universidade de São Paulo, Brazil, from 2nd to 5th September, 2017 as an invited speaker
presenting the poster entitled

The E6 protein: Sequence analysis and molecular evolution

Ana Paula Lepique

Luisa Villa

Lawrence Banks

On behalf of the Organizing Committee

ORGANIZATION

FINANCIAL SUPPORT