

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

ELIANE CAMPOS COIMBRA

**Desenvolvimento de Estratégias Vacinais contra o Câncer
de Colo de Útero baseadas em “Virus-Like Particles” e
Imunização Genética**

Recife

2012

ELIANE CAMPOS COIMBRA

**Desenvolvimento de Estratégias Vacinais contra o Câncer
de Colo de Útero baseadas em “Virus-Like Particles” e
Imunização Genética**

**Tese de Doutorado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da
Universidade Federal de Pernambuco para a
obtenção do Título de Doutora em Inovação
Terapêutica.**

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos De Freitas

Recife

2012

**Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788**

C679d Coimbra, Eliane Campos

Desenvolvimento de estratégias vacinais contra o Câncer de colo de útero baseadas em “Vírus-Like Particles” e imunização genética / Eliane Campos Coimbra. – Recife: O Autor, 2012.

87 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Antonio Carlos de Freitas

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Inovação Terapêutica, 2012.

Inclui referências e anexos

- 1. Papilomavírus – vacinas 2. Colo uterino – câncer I. Freitas, Antonio Carlos de (orientadora) II. Título.**

579.2445

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2012-310

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**

PARECER DA COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE

ELIANE CAMPOS COIMBRA

**“DESENVOLVIMENTO DE ESTRATÉGIAS VACINAIS CONTRA O
CÂNCER DE COLO DE ÚTERO BASEADAS EM “VIRUS-LIKE
PARTICLES” E IMUNIZAÇÃO GENÉTICA”**

A comissão examinadora, composta pelos professores abaixo, sob a presidência do primeiro,
considera a candidata **APROVADA**

Recife, 04 de Setembro de 2012.

Orientador: Dr. Antonio Carlos de Freitas (UFPE)

Membro Externo: Dr. Jacinto da Costa Silva Neto (UFPE)

Membro Externo: Dr. Valdir de Queiroz Balbino (UFPE)

Membro Interno: Dr. César Augusto Souza de Andrade (UFPE)

Membro Interno: Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão (UFPE)

AGRADECIMENTOS

Para mim é com muita satisfação que chego ao “fim” desta etapa de doutoranda. Neste momento, relembro com muito carinho o início desta história...

O ingresso no curso de Ciências Biológicas da UPE, com o sonho de contribuir para uma grande realização ou descoberta, e a presença de uma única convicção: trabalhar em pesquisas relacionadas ao câncer e à genética, assuntos que sempre me fascinaram...

Foi com esta meta que consegui ser aprovada na monitoria da disciplina de genética, através da qual seria mais fácil alcançar meu 1º grande objetivo: ser aceita como estagiária no Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Oncohematologia Pediátrica da UPE. A partir de então iniciei meus trabalhos na área tão desejada, recebendo com grande orgulho, minha primeira denominação: Iniciação Científica ou “IC”.

O tempo passou e novos rumos foram traçados. A conquista de um título de mestre após muitos desafios e a feliz oportunidade da continuidade no doutorado...

Hoje, prestes a receber o título de Doutora, sinto-me profundamente agradecida pela oportunidade de viver estas etapas acadêmicas, pois assim como na ciência, o progresso (intelectual e pessoal) é contínuo e ininterrupto, independente do título que se tenha. São singulares todos os que me ajudaram na realização deste objetivo.

Agradeço primeiramente a **Deus**, inteligência suprema e causa primária de todas as coisas, por me conceder nesta existência os subsídios necessários ao meu aperfeiçoamento e por me fazer enxergar cada vez mais que o acaso não existe, e que todos nós estamos no lugar certo e com as pessoas certas. E é para estas pessoas que deixarei um pequeno registro da minha gratidão:

Aos meus Pais, **Estêvão Falcão Coimbra** e **Teresa Cristina Campos Coimbra**, por constituírem a base de tudo que sou, e por me ensinarem não só por palavras, mas através de inúmeros exemplos a conduta que devo ter diante de tudo e de todos. Agradeço também o incentivo ao meu sucesso em todos os aspectos, e por me agradecerem com um Lar sólido e cristão, porto seguro de refazimento e aprendizado constantes.

Ao meu irmão, **Rafael Campos Coimbra** (Fael) e à minha cunhada **Vanessa Andrade de Mendonça Coimbra** (Vanvis), pela amizade valorosa e por serem exemplos de dedicação, inteligência e integridade.

À minha irmã (de coração), **Maria da Conceição Gomes Leitão** (Ceça), por ser parte fundamental do meu amadurecimento científico e pessoal. Por estar sempre presente, compartilhando com profunda sinceridade e dedicação tantos momentos da minha vida. Para mim, é dos maiores exemplos de pessoa e profissional.

Ao meu orientador, **Prof. Antonio Carlos de Freitas**, pelo seu acolhimento, desde o mestrado. Por confiar nas minhas capacidades e me estimular cada vez mais à pesquisa e ao alcance de metas sempre maiores. Agradeço a oportunidade de convivência, a qual tem me feito aprender bastante, não só através da explanação dos seus conhecimentos científicos, mas também pela sua conduta moral e ética, e especialmente pela sua simplicidade, mostrando que apesar dos títulos que nos capacitam ensinar, somos eternos aprendizes.

Aos meus amigos, do **Grupo de Estudos Moleculares Aplicados a Papilomavíruses-GEMAP** ("GEMAPianos!"). Não tenho nem palavras para expressar o quanto é agradável trabalhar com vocês, o quanto me sinto privilegiada em poder compartilhar momentos tão

ricos em todos os aspectos. A alegria e a disposição em ajudar são marcas muito fortes deste grupo ao qual tenho muito orgulho de ser parte:

André Luiz Santos de Jesus (Bala), por estar sempre disposto às discussões que permitiram o bom andamento deste trabalho;

Filipe Colaço Mariz (Fifis), pela grande parceria neste trabalho, me auxiliando na obtenção dos resultados;

Marcelo Nazário Cordeiro (Tchetcha), por sempre estar disposto em ajudar, com um sorriso no rosto e uma tranquilidade sem igual;

Breno Moacir Farias de Albuquerque (Breneti), que se mostrou um amigo valioso e com quem sempre poderei contar;

Jackeline Gomes da Silva (Jack), **Carolina Maria Medeiros do Amaral** (Kerols), **Maria Angélica Ramos da Silva** (Gégé), **Bárbara Simas Chagas** (Baba), **Cybelle Cristina da Rocha Carvalho** (*in memoriam*), **Elyda Gonçalves de Lima** (Elyndinha), **Ana Pavla Almeida Diniz Gurgel** (Pavlinha) e **Nayara Evaristo de Pontes** (Nay), que sempre se mostraram muito amigas e prestativas;

Luciana Cavalcanti de Arruda Coutinho (Lú), pela atenção e confiança que deposita na minha pessoa e no meu trabalho, me ajudando muito nesta caminhada com sua grande amizade.

Aos que compõem o LAVITE-FIOCRUZ, em especial, **Geórgia Guimarães**, **Amanda Carvalho** e **Renato Sousa**, pelo apoio fundamental para a realização de determinadas etapas deste projeto.

Ao **Prof. Fernando Araripe Gonçalvez Torres**, da UnB e ao **Prof. Marcos Antonio de Moraes Junior** por toda atenção dispensada através de discussões produtivas para o bom andamento deste trabalho.

A **Larissa Mélo do Nascimento**, do Departamento de Microbiologia/CPqAM, pela colaboração técnica e científica, especialmente nos ensaios de imunodeteção.

Aos que fazem parte do Grupo de Biologia Molecular e Engenharia Metabólica da UFPE, e que contribuíram de alguma forma para o trabalho, em especial, **Fernanda Cristina Bezerra Leite**.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** (CAPES), pelo suporte financeiro.

RESUMO

COIMBRA, EC. Desenvolvimento de Estratégias Vacinais contra o Câncer de Colo de Útero baseadas em “Virus-Like Particles” e Imunização Genética. 2012. Tese. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

O câncer cervical é considerado o segundo tipo de tumor a ocasionar maior número de mortes entre as mulheres no mundo, e a infecção pelo papilomavirus humano (HPV) é a principal causa relacionada com o desenvolvimento desta neoplasia. No Brasil, o câncer cervical produz uma média de 2,5 óbitos/100.000 indivíduos. Atualmente existem duas vacinas no mercado, baseadas em “Virus-Like Particles” (VLPs), mas o alto custo inviabiliza seu uso pelos países em desenvolvimento. As VLPs de HPV são produzidas a partir da proteína capsidial L1, contra a qual é conferida forte imunidade humoral. Uma estratégia vacinal orientada para a prevenção do câncer cervical em humanos é muito importante para a saúde pública, no entanto, como há muitas pessoas já infectadas pelo HPV, uma abordagem terapêutica se torna necessária. Neste trabalho foi proposta a expressão do gene L1 de HPV-16 em células da levedura *Pichia pastoris*, como base de uma estratégia preventiva e a construção de uma vacina de DNA baseada na proteína E5 do HPV-16, identificada como potencial antígeno tumoral para terapia do câncer. O gene L1 otimizado de HPV-16 foi clonado em vetor de expressão pPGK para integração no genoma de *P. pastoris*, sua transcrição foi confirmada por RT-PCR e a expressão da proteína detectada por dot blot, colony blot e western blot. A vacina de DNA foi construída pela inserção do gene E5 de HPV-16 otimizado e adicionado do epítipo AU1, no vetor pCIneo. Para estudo inicial da funcionalidade da construção vacinal pCI-E5sintH16, foi realizada uma análise *in vitro* em células HEK-293, através de RT-PCR e western blot. O estudo do gene E5 de HPV como antígeno terapêutico, apesar de pouco explorado ainda, é bastante relevante.

Palavras-Chave: Papilomavírus Humano; Virus-Like Particle; gene E5, vacina de DNA.

ABSTRACT

COIMBRA, EC. Development of Vaccine strategies against cervical cancer based on Virus-Like Particles and Genetics Immunization. 2012. Thesis. Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

Cervical cancer is the second type of tumor to cause deaths among women worldwide. The infection of human papillomavirus (HPV) is the leading cause related to the development of this neoplasia. In Brazil, cervical cancer produces an average of 2.5 deaths per 100.000 individuals. There are currently two vaccines on the market, based on Virus-Like Particles, but the high cost (U.S. \$ 350.00) prevents its use by developing countries. HPV VLPs are formed from the L1 capsid protein, against which it is given strong humoral immunity. A targeted vaccination strategy for the prevention of cervical cancer in humans is very important to public health; however there are many people already infected with HPV, and therefore a therapeutic approach is needed. In this study was proposed the expression of the L1 gene of HPV-16 in *Pichia pastoris* yeast cells as the basis for a preventive strategy and the construction of a DNA vaccine based on the HPV-16 E5 protein, identified as a potential tumor antigen for cancer therapy. The optimized L1 gene of HPV-16 was cloned into the expression vector pPGK for integration into the genome of *Pichia*. The transcript of this gene was confirmed by RT-PCR and L1 protein expression detected by dot blot, colony blot and western blot. The DNA vaccine was constructed by cloning the optimized E5 gene of HPV-16, with the inserted AU1 epitope, in the pCIneo vector. In vitro analysis were performed with HEK-293 cells transfected with the PCI-E5sintH16 vector, including RT-PCR and western blot for the initial evaluation of DNA vaccine functionality. The study of the cancer therapy with the E5 gene of HPV-16 although still unexplored is quite relevant.

KEYWORDS: Human papillomavirus; Virus-Like Particle; E5 gene, DNA vaccine.

LISTA DE FIGURAS

| | Página |
|--|--------|
| Revisão da Literatura | |
| Figura 1. Evolução para o câncer cervical após infecção pelo HPV | 4 |
| Figura 2. Organização do genoma do HPV e seu ciclo viral | 6 |
| Figura 3. Cooperação entre as oncoproteínas do HPV para induzir a carcinogênese | 8 |
| Figura 4. Interação de E5 de HPV-16 com EGFR e proteínas de membrana | 9 |
| Figura 5. Indução das vias de sinalização por E5 de HPV-16 | 10 |
| Figura 6. Esquema do endocérvice, zona de transformação e ectocérvice | 12 |
| Figura 7. Estrutura da proteína L1 de HPV-16 | 15 |
| Figura 8. Mecanismo de ativação da resposta imune pela vacina de DNA | 19 |
| Metodologia | |
| Figura 9. Esquema do gene L1 de HPV-16, enviado para otimização de códons | 24 |
| Figura 10. Esquema do vetor pPGK com o gene L1H16ot inserido | 26 |
| Figura 11. Esquema do gene E5 de HPV-16, enviado para otimização de códons | 32 |
| Resultados | |
| Figura 12. Sequência do gene L1H16ot | 37 |
| Figura 13. Purificação de L1H16ot | 38 |
| Figura 14. Purificação do vetor pPGK | 38 |
| Figura 15. Confirmação dos clones pPGK_L1H16ot por digestão | 39 |
| Figura 16. Confirmação dos clones pPGK_L1H16ot por PCR | 40 |
| Figura 17. Clones X33/PGK_L1H16ot | 40 |
| Figura 18. RT-PCR de clone X33/ PGK_L1H16ot | 41 |
| Figura 19. Proteínas visualizadas por SDS-PAGE | 42 |
| Figura 20. Dot Blot de clones X33/ PGK_L1H16ot | 42 |
| Figura 21. Colony Blot de clones X33/ PGK_L1H16ot | 43 |
| Figura 22. Western Blot da proteína L1H16 | 43 |
| Figura 23. Sequência do gene E5H16ot | 44 |
| Figura 24. Purificação do gene E5H16ot | 45 |
| Figura 25. Vetor vacinal pCIneo purificado | 45 |
| Figura 26. Detecção de clones pCI_E5H16ot por digestão enzimática | 46 |
| Figura 27. Detecção de clones pCI_E5H16ot por PCR | 46 |
| Figura 28. RT-PCR de células transfectadas com a construção pCI_E5H16ot | 47 |

LISTA DE TABELAS

| | Página |
|--|--------|
| Metodologia | |
| Tabela 1. Primers para detecção de L1H16ot | 26 |
| Tabela 2. Primers que anelam no vetor pCIneo | 33 |
| Tabela 3. Primers que anelam no gene E5H16ot | 33 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---------------|---|
| AdV | Adenovírus |
| AOX1 | Álcool oxidase 1 |
| AP-1 | Proteína ativadora-1 |
| APC | Célula apresentadora de antígeno |
| APM-1 | Gene da adiponectina |
| ATPase | Enzima que catalisa a hidrólise da adenosina trifosfato |
| Bak | Gene pró-apoptóticos |
| BAP31 | Proteína de membrana do retículo endoplasmático, substrato da caspase-8 |
| Bax | Proteína supressora de tumor |
| BMGluY | Meio complexo tamponado com glicose |
| BMGY | Meio complexo tamponado com glicerol |
| BPV1 | Papilomavírus bovino tipo1 |
| CD4+ | Linfócito T auxiliar |
| CD8+ | Linfócito T citotóxico |
| CDK | Quinase dependente de ciclina |
| cDNA | DNA complementar |
| CD | Célula dendrítica |
| CIN | Neoplasia cervical intraepitelial |
| CL | Célula de Langerhan |
| CMV | Citomegalovírus |
| c-Myc | Gene regulador que codifica fator de transcrição/ pró-oncogene |
| COPV | Papilomavírus oral canino |
| COX-2 | Ciclooxigenase-2 |
| CRPV | Papilomavírus de coelho |
| cVLP | Partícula semelhante ao vírus quimérica |
| DMEM | Meio Eagle modificado por Dulbecco |
| DNA | Ácido desoxirribonucléico |
| dNTP | Dinucleotídeo trifosfato |
| DO | Densidade óptica |
| DST | Doença sexualmente transmissível |
| EGFR | Receptor de fator de crescimento epidermal |

| | |
|----------------|--|
| EP2/EP4 | Receptores para prostaglandinas |
| ETAR | Receptor acoplado à proteína G |
| FANCC | Gene envolvido na anemia de Fanconi C |
| FLD1 | Gene que codifica para formaldeído desidrogenase |
| GAP | Gene que codifica para gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase |
| HEK-293 | Células embrionárias de rim humano |
| HIV | Vírus da imunodeficiência humana |
| HPV | Papilomavírus humano |
| HSIL | Lesão intraepitelial escamosa de alto grau |
| HSP70 | Proteína de choque térmico 70 |
| hTERT | Gene da subunidade catalítica da telomerase humana |
| Iga | Imunoglobulina a |
| IgG | Imunoglobulina G |
| IL-10 | Interleucina-10 |
| IL-12 | Interleucina-12 |
| Kex2 | Sítio de clivagem da enzima Kex2p |
| LB | Meio Luria Bertani |
| LCR | Longa região de controle |
| LIE | Linfócitos intra-epiteliais |
| LSIL | Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau |
| MALT | Tecido linfóide associado à mucosa |
| MD | Meio mínimo com glicose |
| MHC | Complexo de histocompatibilidade principal |
| NCBI | Centro nacional de informação biotecnológica |
| NF-1 | Fator nuclear-1 |
| NIC | Neoplasia intraepitelial cervical |
| NK | Célula exterminadora natural |
| NR4A2 | Gene que codifica receptor nuclear subfamília 4 |
| p53 | Proteína 53, supressora de tumor |
| PBS | Solução de tampão fosfato |
| pBSK | Vetor de clonagem pBluescript SK |
| PEG | Polietilenoglicol |
| PEX8 | Gene que codifica para proteína da matriz peroxisomal |

| | |
|--------------------|--|
| PGE2 | Prostaglandina E2 |
| PGK1 | Gene que codifica 3-fosfoglicerato quinase |
| PI3K-Akt | Via de sinalização envolvida na proliferação e sobrevivência celular |
| pRB | Proteína do retinoblastoma |
| PVDF | Fluoreto de polivinilideno |
| Ras-Raf-MAP | Via de transdução de sinal celular |
| RIPA | Tampão radioimunoprecipitação modificado |
| RNA | Ácido ribonucléico |
| RNAm | RNA mensageiro |
| RT-PCR | Reação de polymerase em cadeia via transcriptase reversa |
| SDS-PAGE | Gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio |
| SIL | Lesão escamosa intraepitelial |
| TBS | Tampão tris salino |
| TCA | Ácido tricloroacético |
| TCR | Receptor de células T |
| TE | Tampão tris ácido etilenodiaminotetracético |
| TLR- 9 | Receptor tipo toll-9 |
| TNFAIP2 | Gene do fator de necrose tumoral alfa induzida por proteína 2 |
| VLP | Partícula semelhante ao vírus |
| YPD | Meio extrato de levedura peptona glicose |
| YPDS | Meio extrato de levedura peptona glicose sorbitol |
| YPT1 | Gene que codifica pequena GTPase envolvida em secreção celular |
| ZT | Zona de transformação |

SUMÁRIO

| | Página |
|--|--------|
| 1. Introdução | 1 |
| 2. Revisão bibliográfica | 2 |
| 2.1. Papilomavírus Humano x Câncer Cervical | 2 |
| 2.2. Ciclo de infecção do HPV | 4 |
| 2.3. Oncogênese pelo HPV | 6 |
| 2.3.1. Papel da Proteína E5 de HPV-16 na progressão do câncer cervical | 8 |
| 2.4. Resposta Imune contra a Infecção pelo HPV | 11 |
| 2.5. Estratégias Vacinais contra o Câncer Cervical | 13 |
| 2.5.1. Vacina Profilática: Vírus-like Particles | 14 |
| 2.5.1.1. Levedura <i>Pichia pastoris</i> como sistema de expressão | 16 |
| 2.5.2. Vacina Terapêutica: Vacinas de DNA | 18 |
| 3. Justificativa | 22 |
| 4. Objetivos | 23 |
| 5. Metodologia | 24 |
| 5.1. Estratégia baseada em VLPs: Expressão de L1 de HPV-16 em <i>Pichia pastoris</i> | 24 |
| 5.1.1. Construção do gene L1 otimizado para expressão em <i>Pichia pastoris</i> | 24 |
| 5.1.2. Clonagem do gene L1 de HPV-16 otimizado em vetor PGK | 25 |
| 5.1.3. Detecção dos clones PGK_L1H16ot por digestão e PCR | 26 |
| 5.1.4. Eletroporação de <i>Pichia pastoris</i> com a construção PGK_L1H16ot | 27 |
| 5.1.5. Detecção dos clones X33/ pPGK1_L1H16ot por PCR de colônia | 28 |
| 5.1.6. Triagem de clones para a produção de L1 por Dot Blot e Colony Blot | 28 |
| 5.1.7. Indução da expressão do gene L1H16ot em frasco | 29 |
| 5.1.8. Análise da transcrição do gene L1H16ot através de RT-PCR | 30 |
| 5.1.9. Precipitação de proteínas do sobrenadante com TCA e acetona | 30 |
| 5.1.10. Análise de proteínas por gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) | 30 |
| 5.1.11. Western Blot da proteína L1 de HPV-16 | 31 |
| 5.2. Estratégia baseada em imunização genética: vacina de DNA | 31 |
| 5.2.1. Construção do gene E5 de HPV-16 otimizado para expressão em células de mamífero | 31 |
| 5.2.2. Clonagem do gene E5 de HPV-16 otimizado em vetor pCIneo | 32 |

| | |
|--|----|
| 5.2.3. Detecção dos clones pCI_E5H16ot por digestão e PCR | 33 |
| 5.2.4. Transfecção da construção pCI_E5H16ot em células eucarióticas in vitro | 34 |
| 5.2.5. Análise da transcrição do gene E5H16ot através de RT-PCR | 34 |
| 5.2.6. Imunoprecipitação da proteína E5H16 | 35 |
| 5.2.7. Western Blot da proteína E5 de HPV-16 | 36 |
| 6. Resultados | 37 |
| 6.1. Estratégia baseada em VLPs: Expressão de L1 de HPV-16 em <i>Pichia pastoris</i> | 37 |
| 6.1.1. Obtenção do gene L1 de HPV-16 otimizado | 37 |
| 6.1.2. Clonagem do gene L1 de HPV-16 otimizado em vetor PGK | 37 |
| 6.1.3. Obtenção dos clones de <i>Pichia pastoris</i> , X33/PGK_L1H16ot | 40 |
| 6.1.4. Detecção do transcrito do gene L1H16ot em células de <i>Pichia pastoris</i> | 41 |
| 6.1.5. Visualização das proteínas por SDS-PAGE | 41 |
| 6.1.6. Detecção da produção de L1H16 por Dot Blot e Colony Blot | 42 |
| 6.1.7. Detecção da produção de L1H16 por Western Blot | 43 |
| 6.2. Estratégia baseada em imunização genética: vacina de DNA | 44 |
| 6.2.1. Obtenção do gene E5 de HPV-16 otimizado | 44 |
| 6.2.2. Clonagem do gene E5 de HPV-16 otimizado em vetor vacinal pCIneo | 44 |
| 6.2.3. Detecção do transcrito do gene E5H16ot em células <i>HEK-293</i> | 47 |
| 6.2.4. Western Blot da proteína E5 de HPV-16 | 47 |
| 7. Discussão | 49 |
| 8. Conclusões | 53 |
| 9. Referências Bibliográficas | 54 |
| 10. Anexos | 84 |
| 10.1. Artigo Científico Publicado 1: <i>Brazilian Journal of Medical and Biological Research</i> | 84 |
| 10.2. Artigo Científico Publicado 2: <i>Journal of Clinical and Cellular Immunology</i> | 85 |
| 10.3. Artigo Científico Publicado 3: <i>Genetics and Molecular Research</i> | 86 |
| 10.4. Artigo Científico Publicado 4: <i>Gynecologic Oncology</i> | 87 |

1. INTRODUÇÃO

O papilomavirus humano (HPV) é capaz de provocar infecção clínica ou subclínica em mulheres e homens após transmissão por via sexual. Várias evidências experimentais sustentam a correlação entre a infecção com alguns tipos específicos de HPV e a etiologia do câncer anogenital, em especial o carcinoma cervical, para o qual o HPV-16 está presente em 50-60% dos casos. Há evidências de que a infecção pelo HPV tem aumentado nas últimas décadas, sendo hoje, a papilomatose humana, a doença sexualmente transmissível mais prevalente no mundo.

Abordagens preventivas consistem na melhor alternativa para o controle das infecções pelo papilomavírus. Diversas estratégias vacinais contra o HPV foram investigadas por grupos de pesquisa em todo mundo e os resultados mais promissores no desenvolvimento de vacinas profiláticas empregam partículas protéicas desprovidas do genoma viral, as *Virus-Like Particles* (VLPs). Uma estratégia vacinal dirigida para a prevenção do câncer de colo de útero em humanos é muito importante no âmbito da saúde pública, entretanto, como existem muitos indivíduos já infectados pela doença, uma proposta terapêutica se torna necessária. O estudo de terapias para o câncer é uma linha de pesquisa que cresce cada vez mais devido à relevância do tema. Pesquisadores em todo o mundo têm voltado o interesse para as vacinas de DNA, que surge como uma promissora tecnologia ao tratamento de neoplasias. Deste modo, é de grande importância pesquisas que foquem o desenvolvimento de uma terapia inovadora, baseada em imunização genética, para impedir a evolução do câncer cervical.

No Brasil, a falta de laboratórios capacitados para a produção e avaliação de novas tecnologias em saúde, como as VLPs e as vacinas de DNA, representa o principal fator limitante na geração de competência para a produção de vacinas contra o HPV. Neste projeto propomos o estabelecimento do sistema de expressão em células da levedura *Pichia pastoris* para a produção de VLPs e a construção de uma vacina de DNA para controle do câncer do colo do útero relacionado ao HPV-16, o tipo viral predominante em tumores deste tipo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Papilomavírus Humano x Câncer Cervical

Os papilomavírus são pertencentes à família *Papillomaviridae*, não apresentam envelope e abrigam DNA circular, fita dupla, como material genético (de Villiers *et al*, 2004). São vírus espécie-específicos que infectam o tecido epitelial cutâneo ou mucoso de mamíferos, répteis e pássaros (Doorbar, 2005; Scheurer *et al*, 2005) provocando o aparecimento de lesões, papilomas ou verrugas, em geral benignas, que podem regredir naturalmente ou se transformar em tumores malignos (Clifford *et al*, 2003; Stanley, 2001).

Os tipos que atacam os seres humanos são denominados por HPV (Papilomavirus Humano), sendo o contato sexual a principal forma de transmissão (Souto *et al*, 2005). Todavia, a transmissão do HPV não depende exclusivamente da penetração sexual, pois pode ser transmitido pelo contato com a pele ou com as superfícies de mucosas contaminadas (Moscicki *et al*, 2006). Há evidências de que a infecção pelo HPV tem progressivamente aumentado nas últimas décadas, o que leva a papilomatose humana ser considerada a doença sexualmente transmissível (DST) mais prevalente no mundo (Scheurer *et al.*, 2005). Estima-se que cerca de 50-80% dos homens e mulheres sexualmente ativos irão adquirir algum tipo de HPV (de baixo ou alto risco) nas suas vidas. O período após o início da atividade sexual é considerado de maior risco para aquisição do vírus (Peto *et al*, 2004) e o risco da infecção aumenta com o número de parceiros (Koutsky, 1999).

Atualmente mais de 120 tipos de HPV foram identificados (Rombaldi *et al.*, 2009) além de subtipos e variantes, com base nas diferenças entre as seqüências de nucleotídeos dos genótipos (Myers *et al*, 1996). Cerca de 40 tipos acometem o trato genital pelo contato sexual e de acordo com o grau da lesão induzida são considerados de alto ou baixo risco (Stanley, 2001).

A associação do HPV com alguns tipos de neoplasias foi detectada, primeiramente, em cânceres do trato anogenital, incluindo cérvix, vulva, vagina, pênis e ânus. A relação entre câncer cervical e infecção por HPVs de alto risco foi evidenciada a partir de estudos epidemiológicos e funcionais (zur Hausen, 2002; Bosh e de Sanjose, 2003), onde o vírus foi detectado em mais de 99,7% do carcinoma de células escamosas (Walboomers *et al*, 1999, Munoz *et al*, 2003) e em 94-100% do carcinoma cervical adeno e adenoescamoso (van Muyden *et al* 1999; Zielinski *et al*, 2003). Além destes, estão também associados ao HPV,

cânceres de cabeça, pescoço (Syrjanen, 2005) e pele (Sterling, 2005). Globalmente, estima-se que este vírus é o agente causal de 5% dos cânceres humanos (Stanley, 2010a).

Existem, pelo menos, 15 tipos de HPVs oncogênicos, dentre os quais, o 16 e o 18 são os mais importantes, por aparecerem em mais de 70% de todos os casos de câncer cervical (Munoz *et al*, 2006). Este tipo de câncer é a segunda causa de morte entre as mulheres no mundo com aproximadamente 500.000 novos casos diagnosticados a cada ano e uma taxa de mortalidade de 50% (Parkin, 2006; Lowndes, 2006; INCA, 2009). Mais de 80% destes casos ocorrem nos países em desenvolvimento, onde a maioria dos diagnósticos são feitos em estágios relativamente avançados da doença (Frazer *et al*, 2004) e onde a sobrevida média, após cinco anos, é cerca de 41%; levando em conta que a média mundial estimada é de 49% e que nos países desenvolvidos esta varia de 51% a 66% (INCA, 2009). A América Latina, a África Subsaariana e a Ásia (Sul e Sudeste) compõem as regiões que apresentam a maior incidência (Parkin *et al*, 2005).

O câncer cervical evolui de uma lesão não-invasiva, pré-maligna, denominada de neoplasia intraepitelial cervical (NIC), ainda denominada de lesão intraepitelial escamosa (do inglês, *Squamous Intraepithelial lesion-SIL*) (figura 1). As lesões pré-malignas são classificadas conforme a extensão do comprometimento da camada epitelial, em displasia média (NIC I), moderada (NIC II), severa (NIC III) e câncer invasivo. A NIC I também pode ser considerada como *SIL* de baixo grau (do inglês, *Low Grade SIL –LSIL*) e as NIC II/III como *SIL* de alto grau (do inglês, *High Grade SIL- HSIL*) (Steenbergen *et al*, 2005).

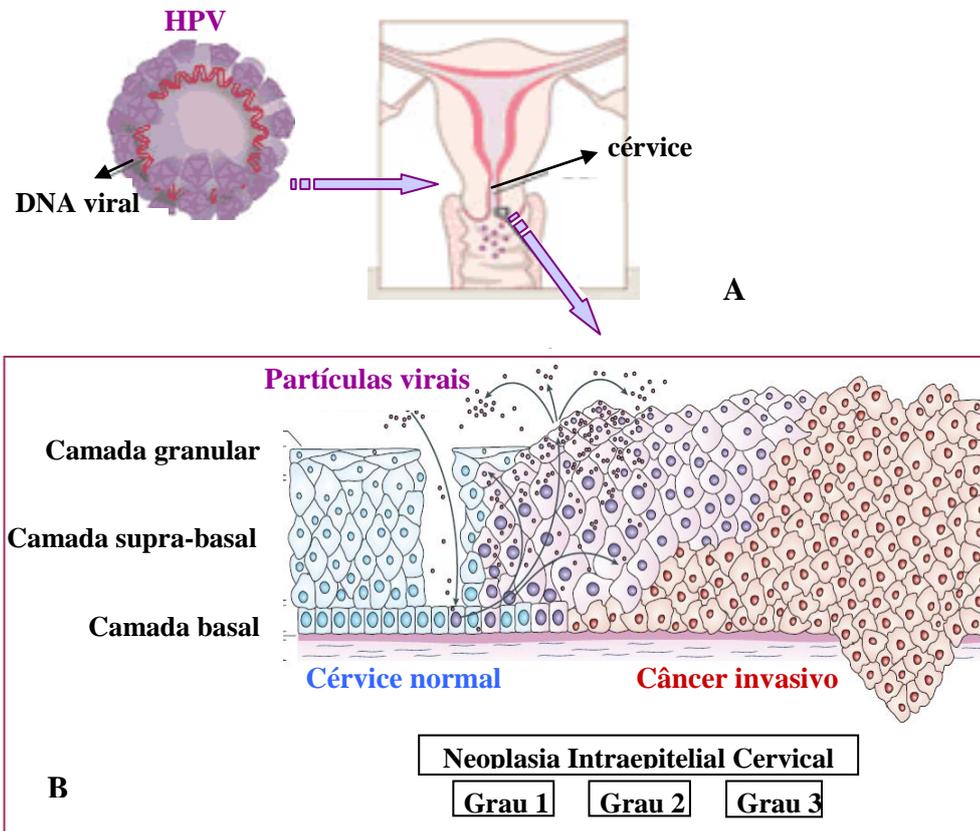


Figura 1. Evolução para o câncer cervical após infecção pelo HPV. Em A, o vírus entra no epitélio pela camada basal da cérvix uterina (adaptado de Nobel_Foundation – ilustração Annika Röhl). Em B, é esquematizado o início do ciclo reprodutivo com a formação de novas partículas virais e a expansão da infecção (NIC 1, 2 e 3) até o câncer invasivo (adaptado de Woodman *et al*, 2007).

Em média, o aparecimento do câncer cervical leva décadas, sendo assim, a carcinogênese do colo do útero é um processo que envolve fatores genéticos, ambientais, hormonais e imunológicos, além da infecção pelo HPV (Stanley *et al*, 2003). Segundo o INCA (2009) são fatores que contribuem para a etiologia desse tumor: tabagismo, multiplicidade de parceiros sexuais, uso de contraceptivos orais, multiparidade, baixa ingestão de vitaminas, iniciação sexual precoce e coinfeção por agentes infecciosos como o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e a *Chlamydia trachomatis*.

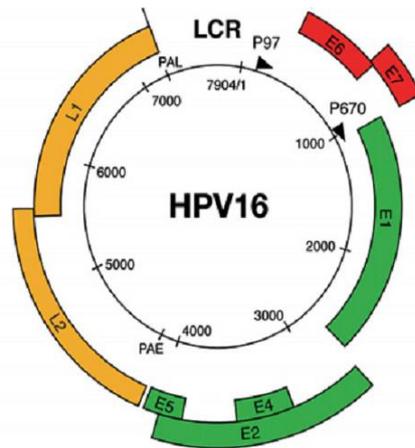
2.2. Ciclo de Infecção do HPV

A cérvix uterina é coberta por dois epitélios distintos denominados de endocérvice (epitélio colunar secretório) e de ectocérvice (epitélio escamoso de proteção, não queratinizado). Durante a menarca, é desenvolvido um epitélio de junção, imaturo, escamoso e metaplástico que forma a zona de transformação. O ciclo do papilomavírus tem início

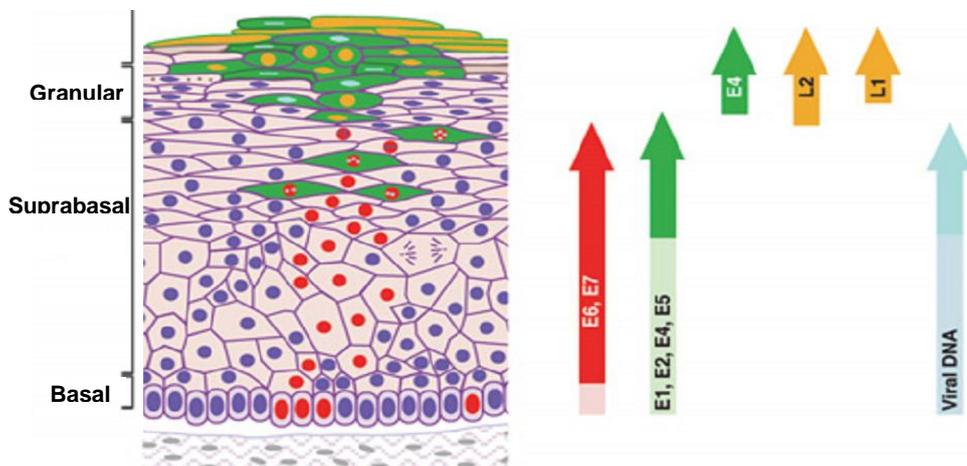
quando ele alcança as células basais do epitélio escamoso através de um microtrauma onde seu genoma se estabelece na forma episossomal e é replicado, junto com o DNA do hospedeiro, para um número de até 100 cópias (Doorbar, 2005). Essa infecção pode ocorrer em qualquer localização da mucosa genital feminina (Roberts *et al.*, 2007), mas, por motivos ainda não bem compreendidos, o desenvolvimento do processo carcinogênico ocorre mais frequentemente na zona de transformação do epitélio (Schiffman *et al.*, 2007).

O genoma do HPV tem um tamanho de aproximadamente 8Kb, composto pela região LCR (longa região de controle), onde se encontram as sequências regulatórias da transcrição viral e a origem de replicação dos seus genes precoces (E1, E2, E5, E6 e E7) e tardios (L1 e L2), sendo assim denominados pela ordem temporal de expressão dos mesmos (Favre *et al.*, 1997). As primeiras proteínas virais a serem produzidas são: E1 (helicase) e E2, responsáveis pela formação de um complexo que se liga à origem de replicação, recrutando a maquinaria da célula, tais como DNA polimerase e proteínas acessórias para estimular a replicação do genoma do vírus (Mohr *et al.*, 1990; Frattini *et al.*, 1994; Conger *et al.*, 1999). Além disso, a proteína E2 funciona como um fator de transcrição que ativa ou reprime a transcrição dos outros genes E (McBride *et al.*, 1991).

Durante o ciclo ocorre a indução da proliferação basal e parabasal das células epiteliais, o que leva à hiperplasia com papilomatoses de várias extensões. Esta atividade oncogênica do HPV é devido à ação transformante das proteínas E5, E6, e E7 (Stoler *et al.*, 1989; Haller *et al.*, 1995). O último estágio do ciclo corresponde à montagem dos vírions e à sua liberação, sendo assim, há um alto nível de expressão das proteínas virais tardias, também denominadas de estruturais: L1 e L2 (figura 2). A proteína não-estrutural, E4, também é encontrada nessa fase, pois tem como função, facilitar o rompimento do citoesqueleto citoplasmático para a liberação dos vírions (Doorbar *et al.*, 1991).



A



B

Figura 2. Organização do genoma do HPV e seu ciclo viral. Em A, é esquematizado o genoma circular do HPV de aproximadamente 8Kb, composto pelos genes “Early” (E1, E2, E5, E6 e E7) e “Late” (L1 e L2), além da LCR (“Long Control Region”) que apresenta seqüências ativadoras e repressoras da transcrição viral (p97 e p670 são promotores presentes nesta região), além da origem de replicação. Em B, é demonstrada a expressão das proteínas virais no tecido epitelial, após a infecção (Adaptado de Doorbar, 2006).

2.3. Oncogênese pelo HPV

As principais ações transformantes do HPV são devidas às proteínas E6 e E7, as quais interagem entre si para a imortalização das células e desenvolvimento do câncer (McLaughlin-Drubin e Munger, 2009). Uma série de rotas e proteínas que participam do funcionamento normal da célula são alteradas, tais como as envolvidas no processo de divisão e apoptose. A proteína E7, por exemplo, se liga a proteínas supressoras de tumor, da família

pRB, degradando-as; o que resulta na ativação descontrolada do fator de transcrição E2F, responsável pelo estímulo da expressão de genes implicados na fase S do ciclo celular (Dyson *et al*, 1989). Além disso, E7 interage com importantes inibidores de ciclinas (CDK), as proteínas p21 e p27, que têm como principal alvo a ciclina CDK2 nos queratinócitos humanos e que, por sua vez, regula a passagem da fase G1 para a fase S (Eichten, *et al* 2004). A região carboxi-terminal das proteínas E7 nos HPV de alto risco, liga-se a estes inibidores neutralizando os seus efeitos e aumentando consideravelmente a atividade da CDK2 nas células infectadas (Huibregtse *et al*, 1991; Scheffner *et al*, 1990; Scheffner *et al*, 1993). A proteína E6 também influencia na ação de proteínas supressoras de tumor, tais como Bak, Bax, c-Myc e p53, as quais são pró-apoptóticas (Finzer e Rosl, 2002).

Outros estudos já identificam diferentes alvos das principais oncoproteínas, E6 e E7, incluindo: telomerase (Duensing *et al*, 2000), membros que respondem aos danos no DNA (Duensing e Munger, 2002), fatores importantes para a duplicação centrossômica (Duensing *et al*, 2007) e proteínas de sinalização (Garnett *et al*, 2006; Garnett e Duerksen-Hughes, 2006). Sendo assim, estas atividades em conjunto, levam as células a uma proliferação contínua e a uma incapacidade de reparar possíveis danos no seu material genético, acumulando rearranjos, mutações e aneuploidias que propiciam o desenvolvimento de uma neoplasia (Vousden, 1993; Sandal, 2002; Jayshree et al, 2009).

Nas neoplasias cervicais de alto grau e câncer, o DNA do HPV apresenta-se integrado ao cromossomo do hospedeiro. Esta etapa ocorre por uma clivagem no genoma do vírus, na região dos genes E1/E2 (Motoyama et al, 2004), provocando uma deleção de parte do gene E2 e de adjacências das regiões E2-E4, E5 e L2 (Ueda et al, 2003). Sendo assim, a repressão transcricional exercida por E2 é anulada, o que resulta na superexpressão dos oncogenes E6 e E7, conduzindo a malignização das células ou formação do tumor (Doorbar *et al*, 1991; Bosch *et al*, 1992; Jeon *et al*, 1995). Além disso, a integração viral ocorre com frequência, em regiões cromossômicas que abrigam genes envolvidos no processo de carcinogênese, tais como: *MYC*, *NR4A2*, *hTERT*, *APM-1*, *FANCC*, *TNFAIP2*, etc., (Ramdass *et al*, 2007).

Embora E6 e E7 sejam mais amplamente estudadas (Storey *et al*, 1988; Werness *et al*, 1990), a visibilidade do papel da proteína E5 na formação da neoplasia cervical vem emergindo nas pesquisas. As ações desta oncoproteína dão suporte (figura 3) à progressão do tumor nos estágios iniciais da doença, uma vez que o gene E5 é deletado após a integração do genoma viral (DiMaio and Mattoon, 2001).

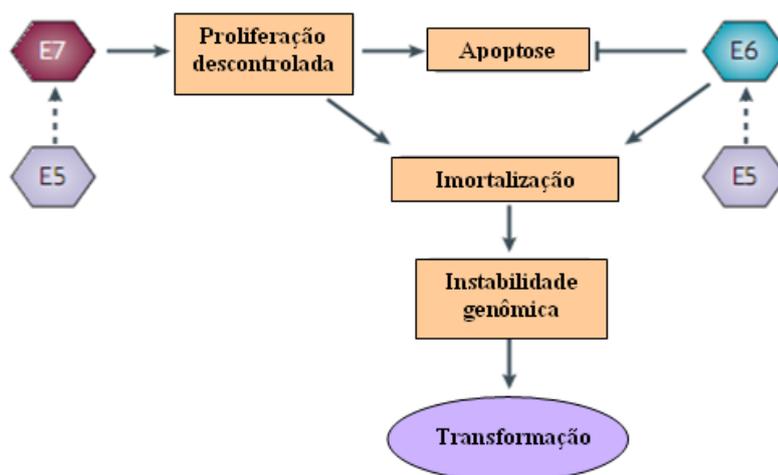


Figura 3. Cooperação entre as oncoproteínas do HPV para induzir a carcinogênese. A indução da hiperproliferação por E7, estimula a apoptose, a qual é bloqueada pelas ações de E6. O processo de imortalização das células pela interação entre os mecanismos de E6 e E7 é aumentado pelas ações de E5. Reguladores cruciais dos processos de proliferação, apoptose, imortalização e estabilidade genômica são significativamente alterados por estas oncoproteínas, resultando na progressão maligna das células infectadas (Adaptado de Moody e Laimins, 2010).

2.3.1. Papel da Proteína E5 de HPV-16 na progressão do câncer cervical

Em muitos casos de tumores cervicais HPV-positivos, as células cancerígenas abrigam tanto a forma integrada, quanto a forma epissômica do DNA viral (Arias-Pulido *et al*, 2006; Kristiansen *et al*, 1994). Desta forma, além de possuir importante papel nas etapas iniciais do processo carcinogênico, E5 também é expressa pelos epissomos virais nas neoplasias já estabelecidas, cooperando com os mecanismos exercidos por E6 e E7, as quais são altamente expressas nestas células, pelo genoma viral integrado (Moody e Laimins, 2010). Existe uma estimativa que o nível de expressão de E5 seja de aproximadamente 80, 90 e 60% nas LSILs, HSILs e nos carcinomas cervicais, respectivamente (Chang *et al*, 2001).

A proteína E5 é hidrofóbica, pequena (apenas 83 aminoácidos) e é localizada nas endomembranas do retículo endoplasmático, complexo de Golgi e membrana plasmática (Conrad *et al*, 1993; Disbrow *et al*, 2003; Disbrow *et al*, 2005). A localização de E5 no retículo endoplasmático sugere que ela tenha um papel importante no tráfico das proteínas de membrana através deste compartimento. Este fato é consistente com a interação entre a oncoproteína e o regulador do transporte de proteínas de membrana, o BAP31 (Regan e

Laimins, 2008), assim como com a cadeia pesada do MHC de classe-1; resultando em baixos níveis deste na superfície celular e contribuindo, desta forma, para a sobrevivência do vírus na célula (Ashrafi *et al*, 2006).

A oncogenicidade exercida pela proteína E5 foi detectada através da transformação de fibroblastos de murinos e queratinócitos humanos (Straight *et al*, 1993; Valle e Banks, 1995; Chen *et al*, 1996), e também pela sua participação na carcinogênese de pele em camundongos transgênicos (Genther *et al*, 2005; Maufort *et al*, 2007). Estudos mais recentes demonstraram que a presença de E5 sozinha ou em combinação com E6 e E7, contribui para o câncer cervical, e que, além disso, o seu potencial parece ser semelhante ou maior que o da proteína E6 (Maufort *et al*, 2010).

Os mecanismos em que a oncoproteína E5 está implicada são muitos e se encaixam dentro das várias vias de sinalização celular para a proliferação, angiogênese e apoptose. Uma das funções mais bem conhecidas é a sua interação com o receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR), o qual ativa várias destas vias como a Ras-Raf-MAP quinase e a PI3K-Akt (Dannenber *et al*, 2005). A oncoproteína E5 aumenta a quantidade do EGFR nas células, pois impede a sua degradação, através da ligação com a ATPase vacuolar, interferindo na acidificação endossomal, como mostra a figura 4 (Straight *et al*, 1995; Dimairo e Mattoon, 2001). Adicionalmente, na presença do fator de crescimento epidermal (EGF), ela exacerba a atividade do receptor, não pelo aumento do número, mas pelo aumento da fosforilação deste (Crusius *et al*, 1998).

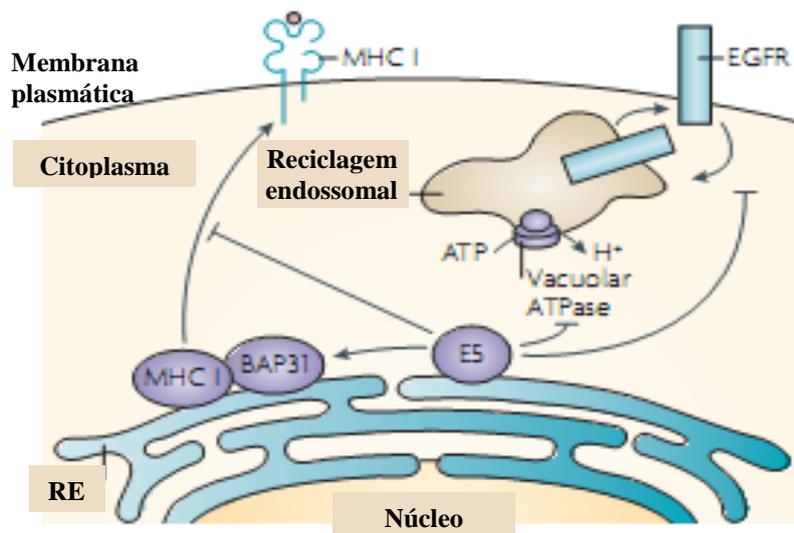


Figura 4. Interação de E5 de HPV-16 com EGFR e proteínas de membrana. O esquema mostra a reciclagem do EGFR para a membrana plasmática e sua consequente atividade constitutiva, favorecida pela ligação de E5 com a ATPase vacuolar. O impedimento do

tráfego do MHC-1 para a superfície celular também pode ser explicado pela ligação de E5 a fatores reguladores do transporte (BAP31) (Adaptado de Moody *et al*, 2010).

A proteína E5 do HPV-16 também pode estimular a proliferação por outros caminhos que não o do EGFR, como: pela inibição de dois supressores de tumor (p21 e p27), ambos inibidores de cinase dependente de ciclina (CKIs) e, portanto, determinantes da parada do ciclo celular (Tsao *et al*, 1996; Pedroza-Saavedra *et al*, 2010); e pelo aumento da ativação das vias envolvidas com os receptores acoplados a proteína G (ETAR, EP4, EP2) elevando tanto a mitogênese, quanto a angiogênese e a invasão celular (Venuti *et al*, 1998; Oh *et al*, 2009; Chell *et al*, 2006). A ativação de fatores de transcrição como o AP-1 (*Activator Protein-1*) e o NF-1 (*Nuclear factor-1*) também é um mecanismo inerente à E5, do qual resulta uma elevada expressão da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2), relacionada com o desencadeamento da inflamação e a formação da prostaglandina E2 (PGE2), que por sua vez está envolvida em múltiplos processos que levam à progressão maligna (figura 5) (Dannenber *et al*, 2005; Kim *et al*, 2009; Greenhough *et al*, 2009). A COX-2 está associada com a baixa sobrevida de pacientes com câncer cervical por resistência ao tratamento quimioterápico/radioterápico e pelo aumento de metástase linfonodal (Gaffney *et al*, 2001; Ferrandina *et al*, 2002).

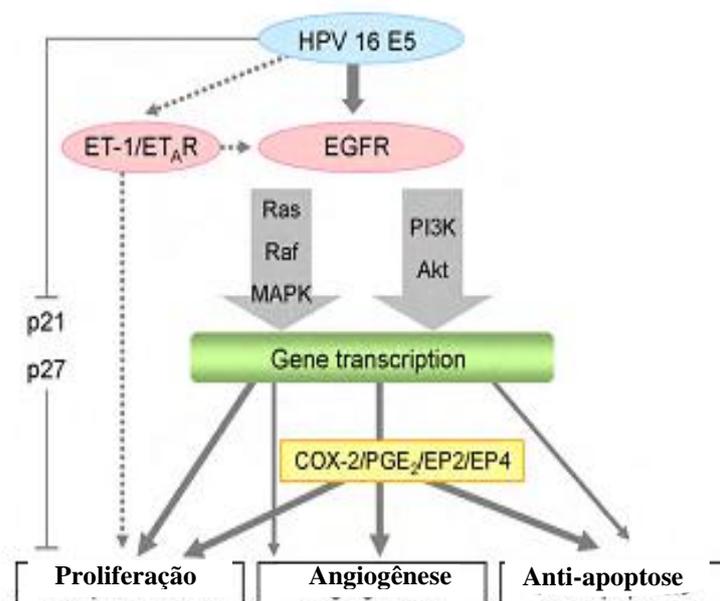


Figura 5. Indução das vias de sinalização por E5 de HPV-16. Alguns dos mecanismos pelos quais a proteína E5 ativa cascatas de sinalização para o estímulo da proliferação, angiogênese e inibição da apoptose (Adaptado de Kim *et al*, 2010).

Compreender os processos realizados pela proteína E5 de HPV-16 pode ajudar no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra o câncer colo de útero. A sua ação mais proeminente nos primeiros estágios do processo neoplásico e a sua influência em múltiplas rotas decisivas a tornam bastante atrativa como novo alvo para tratamento do câncer (Moody e Laimins, 2010; Kim et al, 2010).

2.4. Resposta Imune contra a Infecção pelo HPV

O sistema imune do trato genital feminino é induzido pelo tecido linfóide associado à mucosa (MALT) que é um sistema integrado, onde os linfócitos T e B ou as células apresentadoras de antígenos (APCs), ativadas em um determinado sítio podem migrar através dos vasos linfáticos para outro sítio efetor na mucosa (Bergquist *et al*, 1997). O cérvix uterino normal é composto por infiltrados de linfócitos (CD4+, CD8+, células plasmáticas); APCs, denominadas de dendríticas (CDs) ou de *Langerhans* (CLs); e macrófagos. Existem também os linfócitos intra-epiteliais (LIE) e da zona de transformação (ZT), sendo os CD8+ encontrados com mais frequência (Kobayashi *et al*, 2002; Pudney *et al*, 2005). As células NK (*Natural Killer*) não são encontradas normalmente, mas estão presentes nas infecções.

Além da defesa local, a imunidade sistêmica tem papel fundamental na proteção da mucosa do trato genital, uma vez que grande parte das IgG e IgA não são produzidas neste sítio (Johansson & Lycke, 2003). No entanto, estudos demonstraram níveis elevados de citocinas como a IL-10 e a IL-12, nas secreções do trato genital de mulheres infectadas pelo HPV (Castle *et al.*, 2002). A ectocérvice, principalmente a zona de transformação, são os principais sítios de indução de resposta imune (figura 6) por concentrarem maior quantidade de linfócitos intraepiteliais com potencial citotóxico, células NK e APCs (Lima e Alves, 2008)

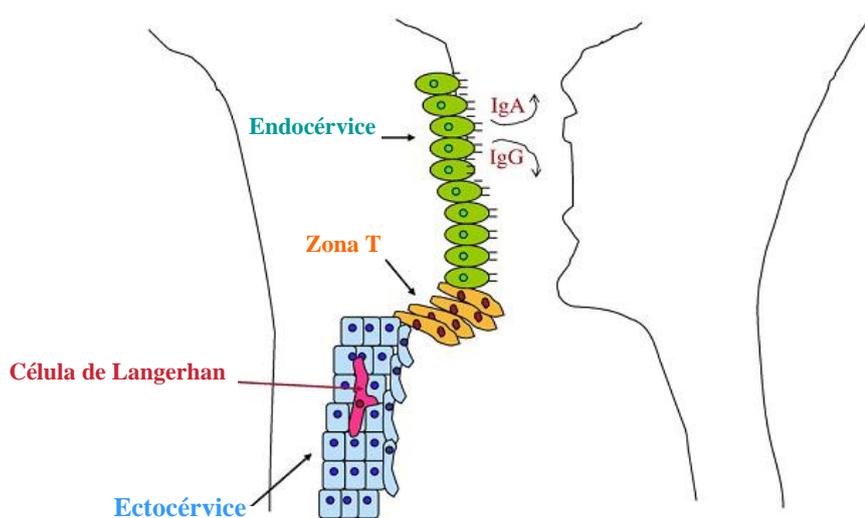


Figura 6. Esquema do endocérvice, zona de transformação e ectocérvice. A imunidade local da mucosa protege o endocérvice, e a imunidade sistêmica protege a zona de transformação e ectocérvice (Adaptado de Palmer *et al*, 2009).

A infecção pelo HPV é exclusivamente intraepitelial e, teoricamente, deveria ser detectada pelas CLs. Todavia, os locais infectados apresentam um número significativamente reduzido destas APCs (Lehtinen *et al*, 1993; Connor *et al*, 1999). Estudos mostram que a proteína E6 do HPV-16 interfere na interação entre o queratinócito e a CL através da inibição da molécula de adesão, E-caderina (Mathews *et al*, 2003). A redução no número das CLs e, conseqüentemente, a alteração na resposta celular é apenas um dos vários mecanismos utilizados pelo vírus para escapar do sistema imune (Kanodia *et al*, 2007). O próprio tipo de ciclo intraepitelial, não-lítico impede o estímulo de sinais essenciais para a resposta imune, como a produção de citocinas pró-inflamatórias que ativam a migração das células apresentadoras de antígenos (APCs) (Kupper e Fuhlbrigge, 2004; Stanley, 2006). Além do ciclo do vírus ser praticamente invisível ao hospedeiro, as suas oncoproteínas desenvolveram mecanismos moleculares para facilitar a evasão ao sistema imune, como: a interferência na via interferon de defesa anti-viral (Herdman *et al*, 2006; Stanley, 2006; Stanley *et al*, 2007), a redução da expressão do complexo MHC-I (Bottley *et al*, 2008) e a alteração na expressão do receptor tipo toll-9 (TLR- 9), o qual tem um papel essencial no reconhecimento de patógenos e na ativação da imunidade inata (Hasan *et al*, 2007).

Apesar dos eficientes métodos de escape desenvolvidos pelo HPV, eventualmente muitas das infecções são reconhecidas e eliminadas espontaneamente pelo sistema imune, ocasionando alterações citológicas cervicais menores e transitórias ou subclínicas (Munoz, 2000; Bosh *et al*, 2002). Há uma estimativa de que 70% das infecções pelo HPV são

resolvidas pelo organismo dentro de um ano (Zur Hausen, 1999). Análises imuno-histológicas de verrugas genitais que regrediram espontaneamente mostraram um grande infiltrado de células T (CD4+ e CD8+) e macrófagos, tanto no estroma, como no epitélio (Stanley, 2006). Há evidências de que as células TCD4+ associadas à eliminação são específicas para a proteína E2 (Lee *et al*, 2004). Em pacientes com grandes lesões ou com tumor cervical foram encontradas células CD8+ específicas para E6 (Welters *et al*, 2003; Woo *et al*, 2010) e E7 (Kadish *et al*, 2002).

Além da imunidade celular, é produzida uma resposta humoral específica para cada tipo de HPV, com uma baixa produção de anticorpos dirigidos à principal proteína capsidial L1 (Stanley *et al*, 2008). Esta resposta é lenta com um tempo de soroconversão que varia de 8-9 meses, e só 50-70% de mulheres com a infecção pelo HPV soroconvertem (Carter *et al*, 2002). Mesmo a baixos níveis, os anticorpos podem persistir no organismo de muitas mulheres durante 10 anos e com efeito protetor (af *et al*, 1998; Olsson *et al*, 2009).

2.5. Estratégias Vacinais contra o Câncer Cervical

O princípio da maioria das vacinas profiláticas utilizadas com sucesso e grande aceitação em todo mundo foi descoberto com o vírus da varíola, pelo médico Edward Jenner, no ano de 1796 (Henderson, 1997) e baseia-se na inoculação de patógenos mortos ou inativados, ou ainda de parte destes, no organismo, para que este desenvolva a proteção adequada frente à uma nova investida do agente infeccioso (Kalil *et al*, 2008). Em relação ao HPV, existe uma dificuldade para a montagem de um sistema de propagação em laboratório que permita a produção de vírions para fins vacinais (Da Silva *et al*, 2001), pois o ciclo do papilomavírus é dependente da diferenciação completa das células epiteliais (Stanley, 2001).

As inovações tecnológicas na área da saúde têm permitido o desenvolvimento de algumas estratégias para a prevenção e tratamento das doenças. Nesse contexto, o campo da vacinologia prevê excelentes promessas para o controle de diferentes doenças não-infecciosas e infecciosas. Dentre as novas abordagens, existem as vacinas utilizando vírus e bactérias recombinantes; as vacinas de ácidos nucleicos (DNA e / ou RNA), de proteínas e peptídeos, de células inteiras (baseada em células dendríticas ou células tumorais), as vacinas comestíveis, e as compostas por partículas semelhantes aos vírus (*virus-like particles*) (Bolhassani *et al*, 2009; Palena *et al*, 2006). Atualmente, também são estudadas metodologias para o engenheiramento das vacinas no sentido de direcioná-las a um tipo de resposta (celular ou humoral) ou de torná-las mais eficientes; estas incluem: a identificação de antígenos

tumorais, a identificação de epítomos imunodominantes, a otimização da sequência de genes e/ou proteínas, e a utilização de sistemas de entrega ou liberação mais eficientes (Bodles-Brakhop e Draghia-Akli, 2008; Palena *et al*, 2006).

A vacinação para a prevenção da infecção pelo HPV é alvo de estudos que já ultrapassam décadas (Stanley, 2010b). A dificuldade de produzir o vírus em laboratório, aliado à necessidade de erradicação da doença e ao surgimento de novas tecnologias, possibilitou o desenvolvimento de estratégias profiláticas (Muños *et al*, 2004), já liberadas para o mercado, e também terapêuticas, sendo estas mais recentes, e ainda em testes pré-clínicos e clínicos (Huang *et al*, 2010).

2.5.1. Vacina Profilática: Virus-like Particles

A descoberta de que os anticorpos neutralizantes do HPV eram produzidos contra a proteína capsidial L1, despertou o interesse da comunidade científica para o desenvolvimento das vacinas profiláticas. Até o momento, existem duas vacinas preventivas contra o HPV, licenciadas para uso; ambas são compostas por estruturas macromoleculares formadas pelas subunidades de L1 e denominadas de virus-like particles ou VLPs, sendo consideradas morfológicamente similares às partículas virais selvagens.

A segurança e eficiência das VLPs de HPV foi primeiramente testada em modelos animais, como: cachorro-COPV (Suzich *et al*, 1995), coelho-CRPV (Breitburd *et al*, 1995) e vaca-BPV-4 (Kirnbauer *et al*, 1996). Nos estudos clínicos, as VLPs mostraram ser bem toleradas e altamente eficazes na prevenção das infecções contra os tipos em questão (Kjaer *et al*, 2009; Paavonen *et al*, 2009). Todavia, a duração da proteção é algo que permanece indefinido, já que os testes de fase III, onde foram observados estes resultados, duraram apenas 4 anos (Stanley, 2010b).

As vacinas preventivas que estão no mercado, compreendem a “Gardasil®” (Merck & Co, Inc, 2006), composta por VLPs de 4 tipos de HPVs (HPV-6, -11, -16, and -18); e a “Cervarix®” (GlaxoSmithKline UK, 2007), que é bivalente pois agrega VLPs dos 2 tipos oncogênicos (HPV-16 e -18). A necessidade de produzir vacinas polivalentes está relacionada à resposta imune tipo-específica, que é devida ao fato dos epítomos neutralizantes imunodominantes de L1 encontrarem-se em regiões hipervariáveis das alças que compõem a proteína (figura 7) (Chen *et al*, 2000). Além disso, os anticorpos neutralizantes reconhecem os epítomos conformacionais (não-lineares), contribuindo para uma maior especificidade da ligação (Kirnbauer *et al*, 1992). Mesmo assim, ainda é observada uma fraca reação cruzada

com outros tipos de HPVs que pode levar a efeitos protetores variáveis com uma duração potencialmente reduzida (Villa *et al*, 2005; Harper *et al*, 2006).

A variação geográfica da prevalência dos HPVs de alto risco, também é uma implicação no desenvolvimento de vacinas mais eficazes (Bosch *et al*, 1995; Góes *et al*, 2008). Globalmente, o HPV tipo 16 é o mais freqüente, seguido pelo tipo 18. No Brasil, no que se refere ao segundo tipo mais freqüente, existem variações de acordo com a região: no Nordeste encontra-se o 31; no Centro-Oeste, o 33; e nas regiões Norte, Sudeste e Sul, o HPV-18 (Cavalcanti *et al*, 1994; Eluf-Neto *et al*, 1994; Bosch *et al*, 1995; Gonçalves *et al*, 1999; Noronha *et al*, 1999; Lorenzato *et al*, 2000; Guimarães *et al*, 2008; Baldez da Silva *et al*, 2009).

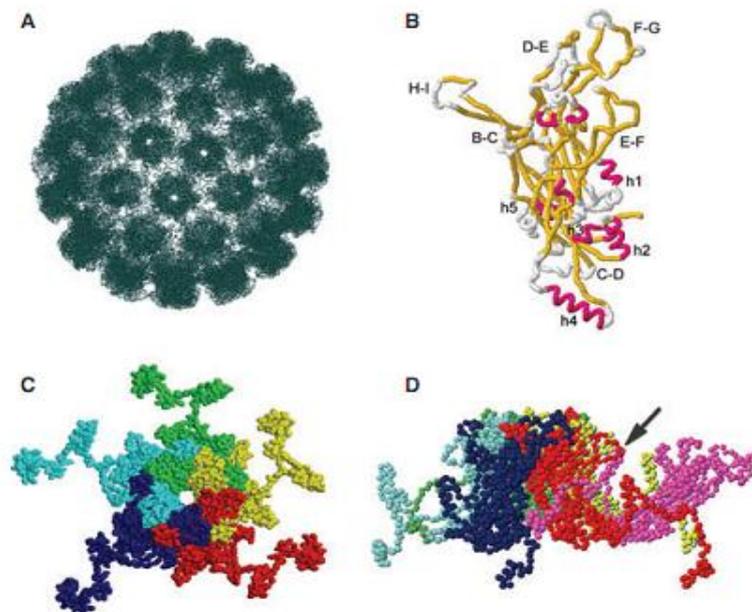


Figura 7. Estrutura da proteína L1 de HPV-16. (A) esquema do capsídio viral formado por pentâmeros de L1 (Chen *et al*, 2000; Modis *et al*, 2002); (B) Monômero de L1, com as alfa-hélices (h1-h5) em rosa e as 5 alças marcadas, juntamente com a alça interna (C-D); (C) vista topográfica de um pentâmero de L1, onde cada monômero tem uma cor diferente; (D) vista lateral do pentâmero, mostrando interações interpentaméricas (seta) entre as α -hélices localizadas próximas a porção C-terminal de L1, previamente demonstradas (Bishop *et al*, 2007) como essenciais para a montagem do capsídio (Adaptado de Sapp e Bienkowska-Haba, 2009).

A semelhança com os vírions nativos, a ausência do genoma viral e a manutenção dos epítomos conformacionais para a resposta imune (Da Silva *et al*, 2001; Dupuy *et al*, 1999; Palker *et al*, 2001; Breitburd *et al*, 1995; Suzich *et al*, 1995), aumentam o interesse na

utilização das VLPs para diversas estratégias vacinais. Além do uso como imunógeno direto, elas têm sido exploradas como carreadores de peptídeos, DNA e pequenas moléculas que podem estar relacionados a outros tipos de doenças (Roy e Noad, 2008). A razão pela qual as VLPs são consideradas excelentes carreadores está na facilidade com a qual elas são captadas pelas células apresentadoras de antígenos, facilitando a resposta celular e a produção de anticorpos (Roy e Noad, 2008). Como exemplo, um estudo com VLPs quiméricas (cVLPs), fusionadas à proteína E7, demonstrou que a resposta celular específica contra esta foi significativamente aumentada em camundongos (Schafer *et al*, 1999).

As VLPs podem ser obtidas através da produção heteróloga da proteína L1 em sistemas de expressão que utilizam células de mamífero (Nakauchi *et al*, 2008), plantas (Varsani *et al*, 2003), bactérias (Hou *et al*, 2009), insetos (Zhou *et al*, 1991) e leveduras (Vassileva *et al*, 2001; Kirnbauer *et al*, 1992). O domínio destas tecnologias para obtenção das VLPs torna possível a realização de estudos mais aprofundados na área da vacinologia assim como, na compreensão da infecção pelo vírus (Kanodia *et al*, 2007; Malboeuf *et al*, 2007; Cubas *et al*, 2009).

2.5.1.1. Levedura *Pichia pastoris* como sistema de expressão

Nos últimos 15 anos, a levedura *Pichia pastoris* foi extensivamente utilizada para a produção de proteínas de interesse acadêmico e biotecnológico, sendo atualmente, o segundo sistema de expressão mais utilizado após a bactéria *Escherichia coli*, primeiramente usada neste intuito a 40 anos atrás (Cohen *et al*, 1973). Segundo estudo baseado em pesquisas de citações do banco de dados do *PubMed*, realizado por Sørensen (2010), o uso de *P. pastoris* cresceu de 4% a 17% entre os anos de 1995 a 2009, enquanto que neste mesmo período o uso do sistema *E.coli* permaneceu constante.

Pichia pastoris é uma levedura metilotrófica capaz de crescer em meios contendo metanol como única fonte de carbono. O fato dela superexpressar a enzima álcool oxidase 1 (AOX1) que participa desta via metabólica despertou o interesse científico para a sua utilização como sistema de expressão de proteínas heterólogas (Cregg *et al*, 2000). Sendo assim, a maioria dos vetores para expressão em *Pichia*, possuem o promotor forte e induzível do gene *AOX1* (Daly e Hearn, 2005). A adaptação de técnicas de manipulação genética, como a transformação, já descritas para *Saccharomyces cerevisiae*, facilitou o uso do sistema. A transformação em *Pichia* geralmente ocorre pela integração do cassete de expressão em locus

específico do seu genoma (via recombinação homóloga), o que resulta em transformantes geneticamente estáveis (Daly e Hearn, 2005).

A maior vantagem de *P. pastoris* sobre o sistema de expressão em bactérias é o seu potencial para fazer as modificações pós-traducionais tipicamente associadas a eucariotos superiores e necessárias para a atividade biológica das proteínas, tais como: processamento de seqüências sinais, formação de pontes dissulfeto, enovelamento (*folding*), adição de lipídios, e glicosilações (Macauley-Patrick *et al*, 2005). Os tipos de glicosilações são as que mais se aproximam ao dos mamíferos, com adição de 8-14 resíduos de manoses em cadeias de oligossacarídeos (Grinna e Tschoop, 1989), diferentemente da levedura *S. cerevisiae* que adiciona de 50-150 resíduos de manose (Innis, 1989). Além disso, os oligossacarídeos de *P. pastoris* não apresentam glicosilações nas posições α -1,3, as quais tornam muitas das proteínas recombinantes produzidas em leveduras inviáveis para uso farmacêutico, uma vez que são hiper-antigênicas (Cereghino e Cregg, 2000; Daly e Hearn, 2005).

Outro atrativo do sistema que utiliza células de *Pichia* é a sua habilidade de produzir altos níveis de proteínas heterólogas, tanto intracelular, quanto extracelularmente. Desta maneira, diversas proteínas, em um número que chega a ser maior que 550, têm sido expressas neste sistema, em quantidades satisfatórias (Lin-Cereghino *et al*, 2006). Entre essas proteínas destacam-se: precursor de insulina-1.5 g/L (Wang *et al*, 2001), albumina sérica humana-4 g/L (Cregg *et al*, 1993), fator de necrose tumoral-6 g/L (Dale *et al*, 1999) e outras (Cereghino e Cregg, 2000; Macauley-Patrick *et al*, 2005). A expressão extracelular é bastante utilizada porque esta levedura secreta baixos níveis de proteínas nativas, o que pode simplificar o processo de purificação da proteína heteróloga (Rees *et al*, 1999). Para tal, o vetor de expressão deve apresentar uma seqüência sinal para a secreção, que geralmente é derivada do α -mating factor (fator de acasalamento α) de *S. cerevisiae* (Kurjan e Herskowitz, 1982).

Embora o promotor *AOX1* tenha tido sucesso em numerosas expressões de genes heterólogos, outros promotores são atrativos para expressão de certos genes, entre eles *GAP*, *FLD1*, *PEX8*, *YPT1* (Cereghino e Cregg, 2000; Daly e Hearn, 2005) e *PGK1* (de Almeida *et al*, 2005). Promotores para expressão constitutiva como o *GAP* (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) e o *PGK1* (3-fosfoglicerato quinase) são ativados em meios contendo metanol, glicerol ou glicose; sendo esta última, a fonte de carbono associada a maiores níveis de expressão. Genes da via glicolítica são conhecidos por serem altamente expressos, e as enzimas correspondentes podem representar 30-60% do total de proteínas solúveis em *S.cerevisiae* (Fraenkel, 1982). Apesar de apresentar vantagens, como a não necessidade da

adição periódica de indutor no meio, estes promotores são apropriados apenas para proteínas recombinantes que não sejam tóxicas às células (Waterham *et al*, 1997; Vassileva *et al*, 2001; de Almeida *et al*, 2005).

2.5.2. Vacina Terapêutica: Vacinas de DNA

Uma estratégia vacinal dirigida para a prevenção do câncer de colo de útero é muito importante no âmbito da saúde pública, entretanto, como existem muitas mulheres já afetadas pela doença, uma proposta terapêutica seria prioritária. As duas vacinas preventivas contra o HPV (Gardasil e Cervarix) são eficientes para a proteção dos tipos envolvidos, contudo a resposta celular induzida pelas mesmas, não é capaz de combater a lesão ou o câncer já estabelecidos. Isto pode ser explicado pelo fato de que a imunidade celular é direcionada apenas contra L1, reconhecendo apenas a parte superior das lesões ou do epitélio (onde a mesma é produzida para liberação natural das partículas). Somado a isso, o HPV é um vírus que não provoca viremia, e portanto não expõe as proteínas E que são expressas nas camadas basal e parabasal, o que dificulta o reconhecimento dos linfócitos nestas regiões (Doorbar, 2005). Consequentemente, é fundamental a busca de diferentes estratégias que foquem os principais antígenos atuantes na transformação pelo vírus, assim como as vias celulares implicadas (Kim *et al*, 2010). As oncoproteínas do HPV, expressas precocemente e responsáveis pela progressão maligna da lesão, seriam os alvos mais adequados para o desenvolvimento de vacinas terapêuticas, pois estimulariam a resposta celular contra as células transformadas (Crook *et al*, 1989; Huang *et al*, 2010).

Vários estudos de vacinas terapêuticas contra o câncer cervical estão sendo realizados e quase todos utilizam as proteínas E6 e E7. Alguns destes já estão em fase pré-clínica e clínica e incluem o uso de vacinas de peptídeos ou proteínas, vacinas recombinantes com vetores virais vivos, vacinas baseadas em células e vacinas de DNA. Dentre estas várias formas, a vacina de DNA têm sido uma candidata bastante atrativa para a imunoterapia antígeno-específica, pois além de ser relativamente fácil de produzir, ela oferece segurança (pode ser administrada repetidas vezes, sem risco de estimular anticorpos contra o DNA no paciente), estabilidade (o DNA é termoestável) e pode expressar altos níveis do antígeno nas células onde foram introduzidas (Donnelly *et al*, 1997; Gurunathan *et al*, 2000).

O princípio de tais vacinas é simples. O DNA que codifica um antígeno vacinal é inserido em um vetor viral ou plasmidial que pode ser liberado no organismo por uma variedade de rotas (incluindo injeção intramuscular). O retrovírus é uma das principais

ferramentas de transferência gênica em mamíferos, sendo explorado em protocolos de terapia gênica (Freitas *et al*, 2002). Porém, vetores retrovirais possuem características que os inviabilizam para o processo vacinal, tal como o risco de integração no genoma hospedeiro (Freitas, 1997). Os vetores plasmidiais geralmente são constituídos por um promotor eucariótico forte, como o CMV (derivado do citomegalovírus) (Montgomery et al, 1994); múltiplos sítios de restrição para clonagem; gene de resistência a antibióticos; origem de replicação em bactéria e seqüências de poliadenilação, que são capazes de estabilizar os transcritos de RNA e translocar este, do núcleo para o citoplasma (Donnelly e Ulmer, 1999). Após introdução do vetor vacinal no organismo (figura 8), o antígeno é então produzido utilizando a maquinaria transcricional do hospedeiro (Dunham, 2002), sendo capaz de induzir ambos os tipos de imunidade: celular e humoral (linfócitos T CD8+ e TCD4+, respectivamente) (Dunham, 2002; Henke, 2002).

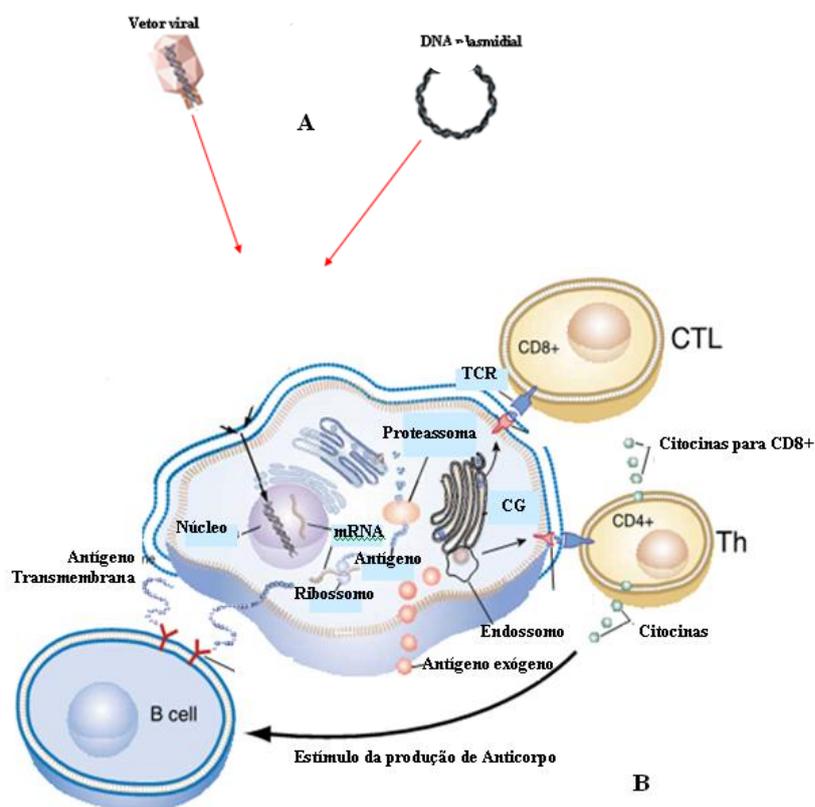


Figura 8. Mecanismo de ativação da resposta imune pela vacina de DNA. Em A, é demonstrada a introdução da vacina de DNA, na célula, através de vetor viral e plasmidial. Em B, é esquematizada a expressão do antígeno vacinal de forma exógena (passando pela via de secreção complexo de golgi-endossomo), o qual é reconhecido diretamente pelos linfócitos T CD4+ ou é captado por APCs que degradam o mesmo em peptídeos para apresentação pelo MHC-II. Os T CD4+ que reconhecem estes peptídeos iniciam a produção de citocinas para ativação de células T CD8+ e para produção de anticorpos pelos linfócitos B. Os anticorpos

reconhecem tanto os antígenos extracelulares, quanto os transmembrana. O antígeno intracelular é degradado em peptídeos pelo proteossoma, os quais são complexados com o MHC-I e reconhecidos pelos T CD8+. A interação dos linfócitos com a célula ocorre através do receptor de células T, o TCR (Adaptado de Liu *et al*, 2003).

A imunização genética tem sido documentada como uma estratégia efetiva para a indução de imunidades humoral e celular em grande número de modelos animais, como: ovinos (Chandrachud *et al*, 1995; Candido *et al*, 2003), suínos (Gerdtts *et al*, 1997), caninos (Suzich *et al*, 1995), coelhos (Sundaram *et al*, 1997; Han *et al*, 1999; Hu *et al*, 2002), camundongos (Kutzler e Weiner, 2008), entre outros. Todavia, alguns estudos mostram baixa imunogenicidade, que pode ser explicada pela introdução do material genético em células não específicas, e pela incapacidade deste se replicar ou se espalhar pelas células vizinhas *in vivo*. Neste sentido, existem inúmeras pesquisas para potencializar a vacina de DNA, como a otimização dos sistemas de entrega do DNA às células, através de métodos físicos (eletroporação, biobalística, tatuagem, etc) e químicos (lipossomos, nanopartículas, peptídeos catiônicos, etc) (Luo e Saltzman, 2000; Ulmer *et al*, 2006); além do aprimoramento da própria sequência gênica, utilizando: a adaptação de códons para expressão em mamíferos (Ko *et al*, 2005); a fusão com outras proteínas que favoreçam a apresentação do antígeno vacinal (Grujic *et al*, 2009; Wang *et al*, 2004; Xu *et al*, 2005), e a inserção de moléculas estimulatórias, como citocinas e quimiocinas (Rinaldi *et al*, 2001; Gollob *et al*, 2000; Perales *et al*, 2008).

Muitas vacinas de DNA para terapia das lesões ou tumores provocados pelo HPV estão em estudo. Uma delas é a vacina ZYC-101a (MGI Pharma), que codifica múltiplos epítomos (para ativação de linfócitos T citotóxicos - CTL) de E6 e E7, dos HPVs tipos 16 e 18. Testada através de 3 doses intramusculares, os resultados mostraram que um número significativamente maior de lesões dos tipos NIC-2/3, foram resolvidas em mulheres jovens (abaixo de 25 anos) quando comparado àquelas que receberam as doses placebo (Sheets *et al*, 2003; Garcia *et al*, 2004). Outro exemplo é o da vacina de DNA denominada de Sig/E7detox/HSP70 com a qual foram realizados os testes clínicos de fase I. Esta vacina codifica uma sequência sinal, fusionada a uma forma mutada de E7 (E7detox) para perda da afinidade com a pRB, e que por sua vez é fusionada à proteína do choque térmico (HSP70). Os resultados dos testes, realizados em pacientes que apresentavam lesões de alto grau NIC-2/3, mostraram uma resposta imune de células citotóxicas (CD8+ T) específica contra E7, com ausência de efeitos adversos. A regressão das lesões foi observada em 3 das 9 pacientes vacinadas (Trimble *et al*, 2009).

As vacinas baseadas na oncoproteína E5 também são promissoras. Uma construção vacinal constituída pelo vetor adenovírus (AdV) e o gene E5, mostrou a redução do tumor que expressava o oncogene, após injeção intramuscular, de apenas uma dose, em camundongos (Liu *et al*, 2000). Outra vacina constituída pelo peptídeo 25-33 de E5 do HPV-16, fusionado a motivos CpG mostrou resultados superiores à vacina anterior (AdV-E5) (Chen *et al*, 2004). Motivos CpG são sequências de DNA, ricas em dinucleotídeos citosina-guanina, encontradas geralmente em bactérias, capazes de estimular o sistema imune (Krieg, 2002).

Estas primeiras análises indicam que E5 é reconhecida pelo sistema imune como um antígeno tumoral e reforça a hipótese de que esta oncoproteína seria a melhor candidata para a erradicação das lesões pré-malignas, já que a mesma é mais atuante nos estágios iniciais do câncer cervical (Kim e Yang, 2006; Kim *et al*, 2010).

3. JUSTIFICATIVA

De acordo com o Ministério da Saúde, são linhas prioritárias, pesquisas que visem aumentar a qualidade e expectativa de vida da população. Entre essas prioridades de pesquisa se encontra o câncer de colo de útero. No Brasil são esperados 17.540 casos de câncer cervical para o ano de 2012, dos quais, 970 em Pernambuco, e 190 em Recife. Apesar dos esforços e avanços do país na atenção básica e em todo o Sistema Único de Saúde (SUS), reduzir a mortalidade por este tipo de câncer ainda é um desafio.

A infecção por HPV de alto risco está diretamente relacionada com o desenvolvimento deste tipo de câncer, portanto, é universalmente aceito que a prevenção de infecções por tipos de HPV oncogênicos, reduziria a incidência de câncer cervical no mundo. Recentemente, duas vacinas contra a infecção pelo HPV baseadas em VLPs foram aprovadas. Todavia, elas apresentam um alto custo o que inviabiliza seu uso pelo SUS. Além disso, elas são efetivas somente contra os HPVs 16 e 18, excluindo pelo menos 13 outros tipos de alto risco, como o 31 e 33, prevalentes na região Nordeste e Centro-Oeste do Brasil, respectivamente.

No Brasil, a falta de laboratórios capacitados para a produção e avaliação de novas tecnologias em saúde, como as VLPs, representa o principal fator limitante na geração de competência para a produção de vacinas contra o HPV. Além do desenvolvimento de competência técnico-científica, a produção de VLPs de HPV em células da levedura *P. Pastoris* utilizando um vetor não comercial, facilitaria sua aplicação pelo SUS, uma vez que é passível de patente.

De outro lado, países em desenvolvimento, como o Brasil, apresentam um grande número de mulheres já infectadas pelo HPV, com lesões e risco de desenvolver o câncer. Este ponto é de extrema relevância para a investigação de novas estratégias de tratamento, como a a vacina de DNA. Neste sentido, a proteína viral E5, que é mais atuante no estágio inicial do desenvolvimento das neoplasias cervicais, vem sendo considerada como um potencial alvo para a imunização genética contra o câncer cervical.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Desenvolvimento de estratégias vacinais contra a infecção por papilomavírus humano baseada em VLPs, usando um vetor não comercial e imunização genética com o gene E5.

4.2 Objetivos específicos

- Construir os genes L1 e E5 de HPV-16 para expressão em *Pichia pastoris* e células de mamíferos, respectivamente;
- Avaliar a expressão do gene L1 otimizado de HPV-16 em *Pichia pastoris*, sob indução do promotor *PGK1* constitutivo;
- Avaliar, *in vitro*, a construção vacinal baseada no gene E5 otimizado de HPV-16.

5. METODOLOGIA

5.1. Estratégia baseada em VLPs: Expressão de L1 de HPV-16 em *Pichia pastoris*

5.1.1. Construção do gene L1 otimizado para expressão em *Pichia pastoris*

A sequência do gene L1 de HPV-16 (1,5Kb), disponível no banco de dados do NCBI (número de acesso GI: 27752860) foi utilizada para adição e marcação de nucleotídeos específicos, como: os sítios de restrição XhoI e NotI, a sequencia Kex2 para expressão extracelular e as cisteínas, importantes para a formação das VLPs. A sequência com os nucleotídeos marcados (figura 9) foi enviada à *Epoch Biolabs* (USA), a qual sintetizou o gene, substituindo os códons pelos preferencialmente utilizados por *P. pastoris*, e clonando-o em vetor pBSK.

```
5´-CTCGAG (XhoI) AAA AGA GAG GCT GAA GCT (Kex2).. GENE (sem stop codon)...
CAT CAT CAT CAT CAT TAA (stop) GCGGCCGC (Not I) - 3´
  cauda de histidina (6x)
TGT (cisteínas)

Sequencia L1 HPV-16

CTCGAGAAAGAGAGGCTGARGCTATGTCTCTTTGGCTGCC TAGTGAGGCCACTGTCTACTTGCC TCTGTCCCA GTATCTAA
GGTTGTAAGCAC GGATGAATATGTTGCACGCACAAAACATATATTATCATGCAGGGACATCCAGACTACTTGCAGTTGGACATC
CCTATTTTCTCTATTA AAAAACCTAAC AATAACAAAAATTAAGTTCC TAAAGTATCAGGATTACAATACAGGGTATTTAGAATA
CATTTACCTGACCCCAATAAGTTTGGTTTTCTGACACCTCATTTTATAATCCAGATACACAGCGGCTGGTTTTGGCCTGTGT
AGGTGTTGAGGTAGGCCGTGGTCAGCATTAGGTGTGGGCATTAGTGGCCATCCTTTATTAATAAAATTGGATGACACAGAAA
ATGCTAGTGTCTATGCGACAAAATGCAGGTGTGGATAATAGAGAATGTATATCTATG GATTACA AAAACAAAACAATGTGTTTA
ATTGTTGCAAAACCACTATAGGGGAACACTGGGGCAAAGGATCCC CATGTTACCAATGTTG CAGTAAATC CAGGTGATTGTCC
ACCATTA GAGTTAATAAACACAGTTATTCAGGATGGTGATATGGTTGATAC TGGCTTTGGTGCTATGGACTTTTACTACATTAC
AGGCTAA CAAAA GTGAAGTTC CACTGGATATTTGTACATCTATTTG CAAATATCCAGATTATATTA AAAATGGTGT CAGAACCA
TATGGCGACAGCTTATTTTTTTATTTTACGGAGGGAA CAAATGTTGTTAGACATTTATTTAATAGGGCTGGTGCTGTTGGTGA
AAATGTACCAGACGATTTATACATTAAGGCTCTGGGTCTACTGCAAATTTAGCCAGTTCAAATTTATTTTCTTACACCTAGTG
GTTCTATGGTTACCTCTGATGCCAAATATTCAATAAACCTTATTGGTTAC AACGAGCACAGGGC CACAAATAATGGCATTGTG
TGGGGTAACCAA CTATTTGTTACTGTTGTTGATACTACACGCAGTACAAATATGTCATTATGTGCTGCCATATCTACTTCA
AACTACATATAAAAATACTAACTTTAAGGAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTTATTTTCACTGTGCA
AAATAACCTTAACTGCA GACGTTATGACATACATACATTCTATGAATTTCCACTATTTTGGAGGAC TGGAAATTTTGGTCTACA
CCTCCCC CAGGAGGCACACTAGAAGATACTTATAGGTTTGTAAACATCCCAGGCAATTGCTTGTCAAAAACATACACCTCCAGC
ACCTAAA GAAGATCCCCTTAAAAAATACACTTTTTGGGAAAGTAAATTTAAAGGAAAAGTTTTCTGCAGACCTAGATCAGTTTC
CTTTAGGACGCAAAATTTTACTACAAGCAGGATTGAAGGCC AAACC AAAATTTACATTTAGGAAAA CGAAAAGCTACACCCACC
ACCTCATCTACC TCTACAACTGCTAAACGCAAAAAACGTAAGCTGCATCATCATCATCATTAAGCGGCCGC
```

Figura 9. Esquema do gene L1 de HPV-16, enviado para otimização de códons. Os nucleotídeos coloridos são os que não deveriam ser modificados no processo de otimização, indicados na parte superior da figura.

5.1.2. Clonagem do gene L1 de HPV-16 otimizado em vetor pPGK

Inicialmente, o plasmídeo pBSK contendo o gene L1 de HPV-16 otimizado foi inserido em células de *E. coli* DH5 α quimiocompetentes (tratadas com cloreto de cálcio) segundo o protocolo de Sambrook *et al*, 1989. Após a transformação foram escolhidas 4 colônias, as quais foram estriadas em outra placa LB/Ampicilina (100 μ g/ml) para posterior preparação de DNA plasmidial em pequena escala (Sambrook *et al*, 1989) e confirmação dos clones obtidos. A extração de DNA plasmidial em média escala da construção pBSK_L1H16ot foi realizada através do *Qiagen Plasmid Midi Kit*, segundo recomendações do fabricante e a partir da qual foi obtida a quantidade necessária para a digestão e purificação do gene L1 otimizado. A digestão para liberação e purificação do gene L1H16ot inserido no vetor pBSK, foi realizada com uma quantidade de DNA entre 5 μ g e 10 μ g, com as enzimas XhoI (10u/ μ l) e NotI (10u/ μ l) e seus respectivos reagentes da *New England Biolabs*, em um volume final de 10 μ l, durante 6 horas a 37° C. A purificação do gene foi realizada a partir da excisão da banda relacionada em gel de agarose 0,8% com o uso do *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen).

O vetor para expressão em *P.pastoris*, contendo o promotor constitutivo do gene 3-fosfoglicerato quinase (*PGK1*) foi construído e gentilmente disponibilizado pelo Prof. Fernando Araripe Torres da UnB. O vetor pPGK possui uma sequência sinal para a secreção e os sítios de restrição para clonagem do inserto (figura 10). A purificação do vetor pPGK foi realizada paralelamente à do gene L1, seguindo os mesmos procedimentos citados anteriormente, de transformação bacteriana, extrações plasmidiais (pequena e média escala) e digestão com as mesmas enzimas de restrição XhoI e NotI. Adicionalmente, antes de purificar o vetor, o mesmo foi tratado com a enzima fosfatase alcalina (1u/ μ l) da *New england Biolabs*, a 37°C, por 45', no intuito de desfosforilar os sítios digeridos e impedir a sua recircularização, aumentando a eficiência de clonagem.

A reação de ligação foi realizada com os fragmentos purificados, na razão molar de 1:3, entre vetor e inserto, em um volume final de reação de 10 μ l. A incubação com a T4 DNA ligase (2U/ μ l) e tampão (10x) da *New England Biolabs* foi feita durante 20 horas, na temperatura de 16°C, seguida da inativação enzimática por 10', a 65°C.

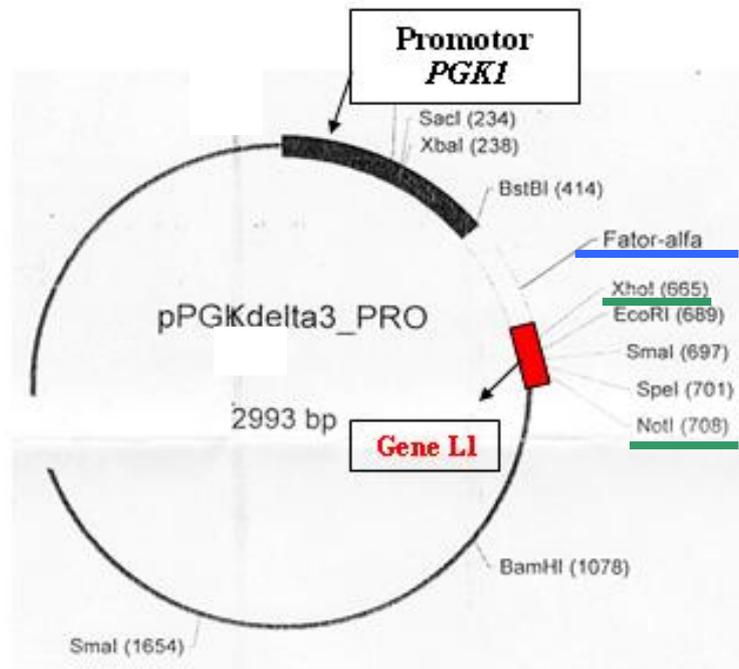


Figura 10. Esquema do vetor pPGK com o gene L1H16ot inserido. A figura ilustra o gene L1 otimizado (em vermelho) de HPV-16 inserido no vetor pPGK. A presença da sequência sinal para secreção em leveduras (fator alfa) e dos sítios de restrição utilizados (XhoI e NotI) também são demonstrados esquematicamente.

5.1.3. Detecção dos clones pPGK_L1H16ot por digestão e PCR

Para análise e confirmação da ligação entre o gene L1 otimizado e o vetor de expressão pPGK, foram feitas reações de digestão enzimática e PCR. Os clones pPGK_L1H16ot foram submetidos à digestão com as enzimas XhoI e NotI para a liberação do inserto. Adicionalmente, foram utilizadas enzimas AccI e SacI que cortam o gene otimizado e o vetor, respectivamente. A análise dos sítios de restrição presentes na sequência otimizada foi realizada através do programa *Web Cutter* (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>).

As PCRs foram feitas com primers específicos para a sequência do gene L1H16ot e para as regiões do vetor que flanqueiam o inserto (tabela 1).

Tabela 1. *Primers* para detecção de L1H16ot

| Primers | Sequência |
|-------------------------------|--|
| <i>Primer L1H16ot Forward</i> | 5'- TAGGATCCATGTCATTATGGCTTCCA -3' |
| <i>Primer L1H16ot Reverse</i> | 5'- CTGGATCCTTAATGATGATGATGATGATGCAA -3' |
| <i>Primer pPGK Forward</i> | 5' TCATAGTTCATCCCTCTCTCC 3' |
| <i>Primer pPGK Reverse</i> | 5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3' |

O ciclo de amplificação em termociclador seguiu os seguintes passos: desnaturação inicial à 95°C por 3'; com 35 ciclos de 94°C por 1', anelamento à 58°C por 30'' e extensão à 72°C por 30''; sendo a extensão final de 72°C por 2'. As reações de PCR foram realizadas com o *GoTaq® Green Master Mix* (Promega) 2X (pH 8.5), dNTPs (400µM dATP, 400µM dGTP, 400µM dCTP, 400µM dTTP) e 3mM de MgCl₂, em um volume de reação final de 15µL. Além disso, os *primers* foram utilizados na concentração de 0,6µM.

Os *primers* pPGK foram utilizados para o seqüenciamento das amostras no Núcleo Integrado de Tecnologia (NIT) do CPqAM-FIOCRUZ, utilizando o sequenciador automático de DNA ABI Prism 3100 (Applied Biosystem®), de acordo com os padrões previamente estabelecidos nesta unidade.

5.1.4. Eletroporação de *Pichia pastoris* com a construção pPGK_L1H16ot

Aproximadamente 10µg da construção pPGK_L1H16ot foram linearizadas por digestão com a enzima *SacI*, para possibilitar a integração por recombinação no genoma da levedura. Paralelamente, 10 µg do vetor pPGK linearizados, sem inserto, também foram transformados para obtenção de um controle negativo da expressão.

Para preparação de células eletrocompetentes, foram realizados os seguintes procedimentos: uma colônia da levedura *P. pastoris* X-33 (linhagem tipo selvagem) foi pré-inoculada em 10mL de YPD (extrato de levedura 1%, peptona 2% e glicose 2%), a 250 rpm e 30°C, durante 6-8 horas, até ser atingida uma DO₆₀₀ igual a 3. Um volume de 50µl do pré-inóculo foi adicionado a 200mL de meio YPD para crescimento *overnight* ou até atingir uma DO₆₀₀ igual 1.3-1.5. Após alcançada a DO₆₀₀, a cultura foi centrifugada (3000 rpm por 5', a 4°C) para sedimentação das células e a lavagem do precipitado foi gentilmente realizada por pipetagem, através de uma ressuspensão inicial das células em 100mL de água deionizada (autoclavada) gelada, seguida de centrifugação e descarte do sobrenadante; a segunda ressuspensão do precipitado foi realizada com 50mL de água deionizada estéril, seguindo-se de nova centrifugação e descarte do sobrenadante; a última lavagem do precipitado foi realizada com 20mL de sorbitol 1M gelado, seguindo-se da última centrifugação e descarte do sobrenadante. Ao final, as células foram ressuspensas em 1mL de sorbitol 1M e mantidas sob gelo.

Para a eletroporação, os 10µg de DNA previamente linearizados (em um volume de 10µL) foram adicionados a 80µL de células eletrocompetentes e transferidos para uma cubeta de 0.2cm pré-resfriada no gelo por 5'. A cubeta foi inserida no eletroporador (*Multiporator*

Eppendorf) para transformação, seguindo os parâmetros determinados pelo fabricante: 1500 V por 5ms. Imediatamente após o pulso elétrico, 1 mL de sorbitol 1M gelado foi adicionado a cubeta. Em seguida, esse material foi transferido para um tubo estéril de 15 mL e incubado por 2 horas a 30°C, sem agitação. Para aumentar o rendimento da transformação, foi adicionado 1 mL de YPD ao tubo, seguido de incubação a 30°C por 2-3 horas, sob agitação. A partir desse material, alíquotas de 10, 25 e 100µL foram semeadas em placas de meio YPDS (extrato de levedura 1%, peptona 2%, glicose 2%, sorbitol 1M e Agar 2%) contendo 100 µg/mL de Zeocina para incubação a 30°C, por 2-5 dias.

5.1.5. Detecção dos clones X33/ pPGK1_L1H16ot por PCR de colônia

A PCR de colônia com os *primers* específicos para o vetor pPGK e para o gene L1H16ot foi realizada através de uma pequena alçada dos clones (em placa fresca) misturada a 25µL de H₂O estéril. A mistura foi incubada a 95°C, por 5' e uma alíquota de 4µL do lisado foi utilizada para a reação de PCR, preparada com o *GoTaq® Green Master Mix* (Promega). O ciclo de amplificação em termociclador seguiu os seguintes passos: desnaturação inicial à 95°C por 3'; com 35 ciclos de 94°C por 1', anelamento à 58°C por 30'' e extensão à 72°C por 30''; sendo a extensão final de 72°C por 2'.

5.1.6. Triagem de clones para a produção de L1 por *Dot Blot* e *Colony Blot*

Após obtenção dos recombinantes X33/pPGK_L1H16ot, foi realizada uma triagem inicial para detectar os clones com maior potencial ou com o maior número de cópias do cassete de expressão, repicando-os em placas de YPD contendo concentrações mais elevadas de zeocina (500µg/ml e 1000µg/ml) e cultivando-os em meio líquido em pequena escala para realização do *dot blot*. Para a indução da expressão, foram inoculados 28 clones (a partir das colônias crescidas em meio YPD sólido com 100µg/ml de zeocina) em uma placa de cultura de 96 poços, com 1 mL de meio YPD em cada poço. O crescimento foi deixado até 72h, sob agitação de 250 rpm, em shaker, a temperatura de 28°C. Após este período de indução da expressão, os sobrenadantes foram obtidos utilizando-se uma centrífuga de placa (*Eppendorf* 5804), a 10000rpm, por 5'. Um volume de 100µL destas amostras foi aplicado em membrana de PVDF 0,45µm (*Amersham Hybond-P*; GE), aderida ao dispositivo *dot blotter*, acoplado a uma bomba de sucção à vácuo, a qual teve a pressão ajustada para 0,8mbar durante uma hora, para sensibilização da membrana. Em seguida, a membrana foi lavada com 100µl de TBS 1X

(Tris-HCl 50mM, pH 7.4 e NaCl 150mM) por 5'. Para o bloqueio utilizou-se solução de leite 5% por 40' (100µl). O leite foi retirado com o auxílio de uma pipeta *Pasteur*, seguindo-se outra lavagem com TBS 1X por 5' para aplicação de 30µl do anticorpo CamVir-1 (anti-L1 de HPV-16) diluído 1:1000 em leite 5%, e posterior incubação por 1h à 37°C. Após este período, o anticorpo foi retirado e a membrana foi lavada três vezes com solução TBS-Tween (0,05%) por 10'. Posteriormente, foi adicionado o anticorpo secundário conjugado a peroxidase, diluído 1:2000 em leite 5%. Depois de mais 3 lavagens de 10', com TBS-Tween (0,05%), a revelação foi realizada por quimioluminescência com incubação da membrana em solução do substrato que inclui três reagentes: o Luminol (SIGMA-ALDRICH®); o Iodofenol (SIGMA-ALDRICH®) diluído em DMSO (Merck); e o peróxido de hidrogênio comercial 20 volumes. Em seguida a membrana foi utilizada para sensibilizar filmes *BioMax Light Film* para eletroquimioluminescência (ECL) da empresa KODAK. As revelações dos filmes foram realizadas com revelador Dektol (KODAK) diluído 1:3 e a fixação por soluções de ácido acético.

Ainda com o objetivo de escolher clones com melhor potencial de expressão, foi realizado o *colony blot*. Este experimento consiste na incubação da membrana de PVDF (0,45µm), por um período de 3h, sobre as estrias das leveduras recombinantes (em placa e mantidas em estufa 30°C, por 72h). Após este tempo, a membrana é lavada três vezes, por 10' com o TBS-Tween (0,05%). A partir de então, a membrana é bloqueada com leite 5% por 1h. O anticorpo CamVir-1 diluído 1:1000 é adicionado à solução de incubação e deixado por 1-2h a 2-8°C. As três lavagens, por 10' com o TBS-Tween (0,05%) são repetidas e à membrana é adicionado o anticorpo secundário, conjugado à peroxidase (1:3000) em leite 5%. Após o tempo de incubação de 1h, a membrana foi novamente lavada e submetida à revelação por quimioluminescência, já citada.

5.1.7. Indução da expressão dos clones X33/ pPGK_L1H16ot em frasco

O pré-inóculo foi feito a partir da colônia recombinante (retirada de placa YPD fresca) em 25ml de meio BMGY-*Buffered Glycerol-complex Medium* (extrato de levedura 1%, peptona 2%, tampão fosfato de potássio 100 mM-pH 6.0, YNB 1.34%, biotina 4×10^{-5} %, glicerol 1%), em um *Erlenmeyer* de 250ml. Após o crescimento *overnight* (16-18h), a 28°C e a 250rpm, a cultura com DO_{600} de 2-6 foi centrifugada (3000rpm, 5') para ressuspensão das células em 100ml de meio BMGluY (extrato de levedura 1%, peptona 2%, tampão fosfato de potássio 100 mM-pH 6.0, YNB 1.34%, biotina 4×10^{-5} %, glicose 2%) ou MD (biotina 4×10^{-5}

⁵%, YNB 1.34%, glicose 2%) em *Erlemmeyer* de 1L. As condições do crescimento foram as mesmas do pré-inóculo. A cada 24 horas (até o tempo de 72h) foram retirados 5 ml do sobrenadante para as análises subseqüentes da expressão do gene L1H16ot. O recombinante X33/pPGK foi utilizado como controle negativo. Em paralelo, outro protocolo de indução utilizando apenas meio BMGluY (sem a etapa de pré-inóculo) foi utilizado. Neste, foram aplicadas as mesmas condições de crescimento, anteriormente citadas.

5.1.8. Análise da transcrição do gene L1H16ot através de RT-PCR

Um dos clones X33/PGK_L1H16ot positivos no dot blot e colony blot, foi selecionado para crescimento em frasco de 500ml, com 50ml de YPD. Após 72h do início do crescimento e consequente indução da expressão, um precipitado foi obtido a partir de 1ml da cultura para a extração do RNA total com o *RNeasy Mini Kit* (Qiagen).

O RNAm do gene L1H16ot foi detectado por RT-PCR, usando o kit *ImProm-II™ Reverse Transcription System* (Promega). O produto da amplificação de 500pb foi gerado com os *primers* desenhados para uma região interna do gene sintético: *Forward* 5'-GGTCAACCTTTAGGAGTTGG-3' e *Reverse* 5'-GACGAACATTTGTTCCCTTCA -5', visualizado por eletroforese em gel de agarose 1%.

5.1.9. Precipitação de proteínas do sobrenadante com TCA e acetona

Para a precipitação das proteínas, foi utilizado 1mL do sobrenadante com 200µl de ácido tricloroacético (TCA) 100%. Após incubação a 2-8°C, por 1-3h, centrifugou-se a 14.000 rpm, por 30' e a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 200µl de acetona gelada, centrifugando-se novamente sob as mesmas condições. A etapa de lavagem foi repetida por 3 vezes. O precipitado foi secado em centrífuga à vácuo por 10' e ressuspensão em 20µl de tampão de amostra 2x (Tris-HCl, pH 6.8, 200Mm; SDS 4%, β-mercaptoetanol 4%; glicerol 20% e azul de bromofenol 0,1%).

5.1.10. Análise das proteínas por gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)

As proteínas foram submetidas à separação em gel SDS-PAGE em sistema de eletroforese, com corrente constante (20mA) e tampão de corrida 1x (Tris 125mM, Glicina 0,96M e SDS 0,5%), por 1-2h. Antes da aplicação, as amostras foram fervidas em tampão de

amostra 2x, por 5', no intuito de desnaturar as proteínas. O gel foi preparado segundo descrição de Laemmli (1970). A visualização das bandas no gel foi realizada com a incubação em solução corante (*commassie brilliant blue* R-250 0,25%, metanol 45% e ácido acético glacial 10%) por 40'-60', e em seguida em solução descorante (metanol 45% e ácido acético glacial 10%). Também foi utilizado o protocolo de coloração por prata, no qual foi utilizado o gel descorado (após coloração por *comassie*). Na primeira etapa o gel foi desidratado com etanol 50%, por 3 incubações a 20'. Acrescentou-se o tiosulfato de sódio (0,02%) por 1', sob agitação, seguido de 3 lavagens brandas com água destilada. A solução de nitrato de prata (nitrato de prata 0,2% e formaldeído 0,075%) foi adicionada para incubação, sob agitação, por 30'. Ao término de três lavagens brandas com água destilada, foi acrescentada a solução de revelação (carbonato de cálcio 6%, formaldeído 0,05% e solução tiosulfato de sódio 2%) até o aparecimento das bandas, com posterior interrupção pela solução de parada (ácido acético glacial 13%).

5.1.11. Western Blot da proteína L1 de HPV-16

Para detecção da proteína L1 de HPV-16 produzida pelos clones recombinantes de *P.pastoris*, o gel SDS-PAGE foi transferido para a membrana de PVDF 0,45µm em sistema de transferência *Bio-Rad Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell*, segundo recomendações do fabricante. Os protocolos de bloqueio, lavagem, incubação com anticorpo CamVir-1 e revelação da reação por quimioluminescência foram os mesmos utilizados para o colony blot, descrito no item 5.1.4.1.

5.2. Estratégia baseada em imunização genética: vacina de DNA

5.2.1. Construção do gene E5 de HPV-16 otimizado para expressão em células de mamífero

O gene sintético para expressão em células de mamífero foi construído com base na sequência codificadora da proteína E5 de HPV-16 que apresenta 83 aminoácidos, identificada no banco de dados do NCBI (número de acesso NC_001526.1). Foram inseridos na sequência: o epítopo AU1 na porção N-terminal para facilitar a detecção imunológica (Lim et al., 1990), a sequência consenso de Kozak para expressão em eucariotos e sítios para as enzimas de restrição XhoI e NotI que flanqueiam o gene e permitem a construção da vacina

de DNA através da estratégia de subclonagem no vetor pCIneo. A sequência com os nucleotídeos marcados (figura 11) foi enviada à empresa *Epoch Biolabs* (USA), a qual sintetizou o gene, substituindo os códons pelos preferencialmente utilizados por mamíferos, e clonando-o em vetor pBSK.



Figura 11. Esquema do gene E5 de HPV-16, enviado para otimização de códons. Em A, os nucleotídeos marcados na sequência do gene E5; em B, uma legenda que identifica: os sítios de restrição, o epítipo AU1, a sequência consenso de Kozak para tradução em eucariotos, a sequência do gene E5 e o códon de parada.

5.2.2. Clonagem do gene E5 de HPV-16 otimizado em vetor pCIneo

Os protocolos para obtenção do gene E5H16ot e também do vetor pCIneo foram os mesmos mencionados no item 5.1.2 deste trabalho. Os fragmentos purificados (ambos digeridos com as enzimas XhoI e NotI) foram submetidos a uma reação de ligação (volume final de 10µl) realizada com a T4 DNA ligase (3U/µl) do *RBC Rapid Ligation Kit*, sendo submetida a 22°C, por 1 hora. Para cada ligação foi utilizada uma concentração padrão de 100ng/µl do vetor pCIneo. As proporções inserto:vetor foram de 5:1 e 10:1, sendo utilizado o cálculo que relaciona o tamanho do inserto com o do vetor:

- **Cálculo Inserto-Vetor, relação de 5:1:**

$$\text{Concentração do vetor} \times \text{Tamanho em Kb do inserto} \times 5 = \text{ng do inserto necessária}$$

Tamanho em Kb do vetor

5.2.3. Detecção dos clones pCI_E5H16ot por digestão e PCR

A primeira análise dos clones foi feita através da digestão enzimática dos plasmídios extraídos dos clones, com as enzimas de restrição utilizadas para a clonagem, XhoI (10u/μl) e NotI (10u/μl). A detecção da ligação do inserto no vetor, também foi realizada por PCR com *primers* que pareiam no pCIneo (tabela 2), assim como com os *primers* que pareiam na região do gene E5H16ot (tabela 3). A análise da orientação deste inserto também foi feita através de uma PCR, utilizando numa mesma reação, o *primer forward* que pareia na região do vetor e o *primer reverse* que pareia no gene.

Tabela 2 . Primers que anelam no vetor pCIneo

| Primers | Sequência |
|-----------------------|------------------------------|
| <i>Primer Forward</i> | 5' TTTGCCTTTCTCTCCACAGG 3' |
| <i>Primer Reverse</i> | 5' GCATTCTAGTTGTGGTTTGTCC 3' |

Tabela 3 . Primers que anelam no gene E5H16ot

| Primers | Sequência |
|-----------------------|-----------------------------|
| <i>Primer Forward</i> | 5' ACGTTACTGGCCGAAGCCGCT 3' |
| <i>Primer Reverse</i> | 5' ATAATATGGCCACAACCATGG 3' |

O programa usado no termociclador para o gene E5H16ot seguiu a seguinte ordem: desnaturação inicial a 94°C por 1'; 35 ciclos de 94°C por 20'', 50°C por 40'' e 72°C por 30'', com extensão final de 72°C por 2'. As reações de PCR foram realizadas com o *GoTaq® Green Master Mix* (Promega) 2X (pH 8.5), dNTPs (400μM dATP, 400μM dGTP, 400μM dCTP, 400μM dTTP) e 3mM de MgCl₂, em um volume de reação final de 15μL. Além disso, os *primers* foram utilizados na concentração de 0,6μM.

Os clones positivos nas análises de PCR e digestão foram submetidos ao sequenciamento utilizando-se os *primers* para o vetor pCIneo. Estes *primers* pareiam nas regiões que flanqueiam o gene de interesse, permitindo a verificação da matriz de leitura do inserto. As amostras foram sequenciadas no Núcleo Integrado de Tecnologia (NIT) do CPqAM-FIOCRUZ, utilizando o sequenciador automático de *DNA ABI Prism 3100 (Applied Biosystem®)*, de acordo com os padrões previamente estabelecidos nesta unidade.

5.2.4. Transfecção da construção pCI_E5H16ot em células eucarióticas *in vitro*

O vetor vacinal com o gene E5H16ot foi transfectado em células eucarióticas HEK-293 (*Human embryonic kidney cell*), cultivadas em meio DMEM completo (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium-Invitrogen®*) constituído de: soro bovino fetal 10% (Gibco®); penicilina/estreptomicina 1% (Gibco®) e L-glutamina 1% (Sigma®). As células foram transfectadas após atingirem uma confluência de aproximadamente 80%, em placa de cultura de 6 poços (33,7mm), preparadas 24h antes, para uma concentração de 6×10^5 células/mL. O protocolo seguiu as instruções sugeridas pelo fabricante do *Polyfect Transfection Reagent (Qiagen®)*: homogeneização das células com 4µg da construção pCI_E5H16ot e 8µl do reagente para incubação por 10'; adição de 300µl de meio DMEM apenas acrescido de soro fetal bovino 10%; transferência de 408µl desta mistura para cada poço da placa de cultura e incubação por 4h em estufa 5% de CO₂, 37°C. Em seguida, foi retirado o meio anterior e adicionado o meio DMEM completo para a manutenção celular e incubação por 48 horas. As células também foram transfectadas com o plasmídeo pCIneo vazio, utilizado como controle negativo.

5.2.5. Análise da transcrição do gene E5H16ot através de RT-PCR

As células transfectadas, nas condições já descritas, foram cultivadas por 48h no objetivo de obtenção do RNA total e consequente detecção da presença do RNAm do gene heterólogo. Para isso, foi utilizada uma placa de 6 poços: dois poços com apenas células 293, outros dois com o vetor vazio pCI-neo e mais dois, com o pCI_E5H16ot. As duas primeiras situações foram utilizadas como controle negativo. Após 48 horas da transfecção, o meio DMEM foi retirado e o material restante lavado 1 vez com 1ml de PBS1X estéril. Em seguida, foram acrescentados 500µl de tripsina, com incubação por 30 segundos a 37°C. Para inativação da tripsina foi acrescentado 1 ml de meio DMEM completo e o volume referente aos dois poços de cada situação foram transferidos para tubo falcon de 15ml para centrifugação a 1500 rpm, por 10'. O precipitado foi guardado a -80°C para posterior extração do RNA.

A extração foi realizada de acordo com as instruções do *RNeasy Mini kit (Qiagen)*. Todas as amostras foram tratadas com a enzima DNase (Promega), por 1h, a 37°C para garantir a ausência de DNA contaminante, e consequentemente, os resultados falsos-positivos. Após esta etapa, 4µl do RNA tratado foram utilizados para a síntese do cDNA com

o kit *ImProm-II™ Reverse Transcription System* (Promega). Para cada amostra testada, foi realizada uma reação controle, sem transcriptase, para confirmar a ausência de DNA contaminante. O programa em termociclador consistiu de 3 ciclos: 25°C por 5', 42°C por 1h e 70°C por 15'.

A amplificação do cDNA foi feita através da RT-PCR, utilizando-se 4,75µl de cDNA, 0,75µl de cada primer (10pmol/ µl), e 6,25µl do *GoTaq® Green Master Mix* (Promega), para um volume final de 12,5µl de reação. Os primers utilizados foram os mesmos utilizados na detecção dos clones e pareiam nas extremidades do gene E5H16ot, resultando em um produto de amplificação de 280pb. O programa usado no termociclador foi: desnaturação inicial a 94°C por 1'; 35 ciclos de 94°C por 20'', 50°C por 40'' e 72°C por 30''; extensão final a 72°C por 2'.

5.2.6. Imunoprecipitação da proteína E5H16

A presença de E5 no meio intracelular foi analisada pela imunoprecipitação, a partir da transfecção da construção pCI_E5H16ot, de 6×10^5 células, em placa de cultura de 100mm, com uma confluência de 80%, usando o anticorpo monoclonal AU1. Como controle negativo, as células foram transfectadas com o vetor vazio pCI-neo e também foi utilizado o extrato celular da célula HEK-293. Após 48 horas, as células foram mantidas no gelo, lavadas três vezes com tampão PBS1X gelado e incubadas por 5' com 1mL do tampão de radioimunoprecipitação (RIPA) [20mM MOPS (ácido morfolino propanosulfônico) 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 1% Deoxicolato e 0,1% Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), pH 7.0] e coquetel de inibidores de proteases (Roche). As células foram transferidas para microtubo, homogeneizadas em vórtex por 2' e centrifugadas a 8.000rpm por, 5'. Foram transferidos 500µL do sobrenadante para outro microtubo, no intuito de incubá-lo com o anticorpo primário anti-AU1 (Covance), diluído 1:150, em rotação constante, por 1h, a 4°C. Foi adicionado 25µL da suspensão da proteína A-Sepharose CL-4B (Invitrogen) e incubado por mais 1h, a 4°C na mesma rotação. O imunocomplexo foi lavado 4 vezes com 500µL do tampão RIPA gelado, ressuspenso em 40µL de tampão de amostra 2X (10% SDS, 1M Tris-HCl pH6.8, glicerol, água e 2-Mercaptoetanol) e aquecido por 5', a 95°C. As amostras foram analisadas em gel SDS-PAGE 15%.

5.2.7. Western Blot da proteína E5 de HPV-16

Após a imunoprecipitação, as amostras foram fracionadas em gel SDS-PAGE 15% (250V e 30mA) e transferidas por 30 minutos (25V e 400mA) para membrana Immobilon-P (Millipore, Bedford, MA) em sistema semi-seco de transferência (Bio-Rad, Hercules, CA), segundo recomendações do fabricante. O western blot teve início com o bloqueio da membrana, durante 1h, em solução PBS 1X-Tween (0,05%) com leite 5%. Em seguida, foi adicionado o anticorpo monoclonal contra o epitopo AU1, diluído 1:500 em solução PBS 1X-Tween (0,05%) com leite 1%, para incubação por 1h, sob agitação. Subsequentemente, depois de lavada 3x, por 10' com PBS 1X-Tween (0,05%), as membranas foram incubadas com anticorpo secundário (1:5000) anti-IgG de camundongo, conjugado a peroxidase (Jackson ImmunoResearch®), também por 1h, sob agitação. Após mais 3 lavagens de 10' a membrana foi submetida à revelação por quimioluminescência com o uso do *ECL kit* (Amersham, England, UK®).

6. RESULTADOS

6.1. Estratégia baseada em VLPs: Expressão de L1 de HPV-16 em *Pichia pastoris*

6.1.1. Obtenção do gene L1 de HPV-16 otimizado

Após recebimento da sequência otimizada para expressão em *Pichia pastoris* de L1 de HPV-16, sintetizado pela empresa *Epoch Biolabs*, foi realizado um alinhamento desta (figura 11) com a sequência selvagem de L1 depositada no NCBI (número de acesso GI: 27752860), no intuito de detectar o grau de modificação após a substituição de códons originais para os preferenciais de *Pichia pastoris*. A sequência otimizada apresentou 22% de diferença em relação à selvagem. Esta análise foi realizada com a ferramenta *Nucleotide Blast* disponibilizada pelo NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

```
CTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTATGTCATTATGGCTTCCATCCGAGCTACTGTTTATTTACCACCTGTTCTGTTTCTAA
GGTCGCTCTACTGACGAGTATGTGGCAAGAATAATTTATTACCATGCTGGTACCTCCAGATTGCTGGCTGTCGGACACC
CATATTTCCCAATCAAGAAACCTAACACAATAAAAATATTAGTGCCTAAAGTCTCAGGTTTGCAATACAGAGTGTTTAGAATA
CATTTACCAGACCCAAATAAATTCCGATTCCAGATACATCTTTCTATAACCCAGATACACAGAGACTGGTTTGGGCATGCGT
TGGTGTGAAGTGGTAGGGTCAACCTTTAGGAGTTGGAATTTCTGGACATCCATTGTTGAATAAATTGGATGATACAGAAA
ATGCTTCCGCATACGCCGCTAATGCCGGTGTGCGACAATAGAGAGTGTATTTCTATGGACTACAAGCAGACACAATTATGCTG
ATAGTTGCAAACCCTATAGGTGAACACTGGGGTAAAGGTTCTCCTTGTACCAACGTCGCCGTTAATCTGGTACTGCC
ACCATTAGAATTAATTAACACCGTCATCCAAGACGGTGACATGGTTGATACTGGTTTCGGAGCAATGGATTTACTACATTAC
AGGCAAATAAGTCTGAGGTCCCATTGGACATTTGCACCTCTATTTGTAAGTACCCAGATTATATCAAGATGGTTTCCGAACCA
TACGGAGATTCTCTGTCTTTTATCTTAGAAGGGAACAAATGTTTCGTCAGACACTTGTCAATAGAGCTGGTGCAGTTGGTGA
AAACGTGCCAGATGATCTGTACATTAAGGATCAGGATCTACAGCCAACTTGGCATCCTCCAACCTACTTTCCTACTCCTCCG
GTTCTATGGTTACCTCTGACGCTCAAATCTTCAATAAGCCATACTGGTTGCAGCGTGTCAAGGACACAATAACGGTATTGT
TGGGTAACCAACTGTTTGTGACCGTTGTTGACACTACAAGGTCTACCAATATGTCATTATGTGCTGCCATCTCTACTTCAGA
AACACCTACAAGAACACAAACTTTAAGGAATACTTGAGACACGGTGAGGAGTACGACCTTCAGTTCAATTTCAATTGTGTA
AAATTACCCTTACCCTGATGTTATGACTTACATACATTTCAATGAACTCCACCATCCTGGAAGATTGGAACCTTGGTCTTCAG
CCTCCACCAGGAGGTACCTTGGAGGATACATACAGATTCGTGACATCACAAGCTATCGCTTGTCAAAGCATACTCCACCTGC
CCCAAAGGAGGACCCTCTGAAGAAGTACACTTTCTGGGAGGTTAACTTGAAAGAGAAGTTTTCAGCTGATTTGGATCAATTC
CTTTGGGAAGAAAGTCTTGCTTCAGGCTGGACTTAAAGCCAAGCCTAAATTCACCTCTGGAAAACGTAAGCTACTCCTACT
ACTTCTCAACTTCAACTACTGCTAAGCGTAAGAAACGTAAGTTGCATCATCATCATCATCATTAAGCGGCCGC
```

Figura 12. Sequência do gene L1H16ot. Em azul são mostrados os nucleotídeos referentes aos sítios de restrição, à sequência Kozak, à cauda de histidina, ao códon de parada e às cisteínas importantes na formação das VLPs (TGT). Em preto, a sequência do gene onde houve a troca de 22% dos nucleotídeos para os preferencialmente utilizados em *Pichia*.

6.1.2. Clonagem do gene L1 de HPV-16 otimizado em vetor PGK

A construção pBSK_L1H16ot, foi transformada em células de *E.coli* DH5α para posterior extração plasmidial e digestão (figura 13A), no intuito de obter uma quantidade suficiente do gene L1 purificado (figura 13B) para clonagem no vetor de expressão.

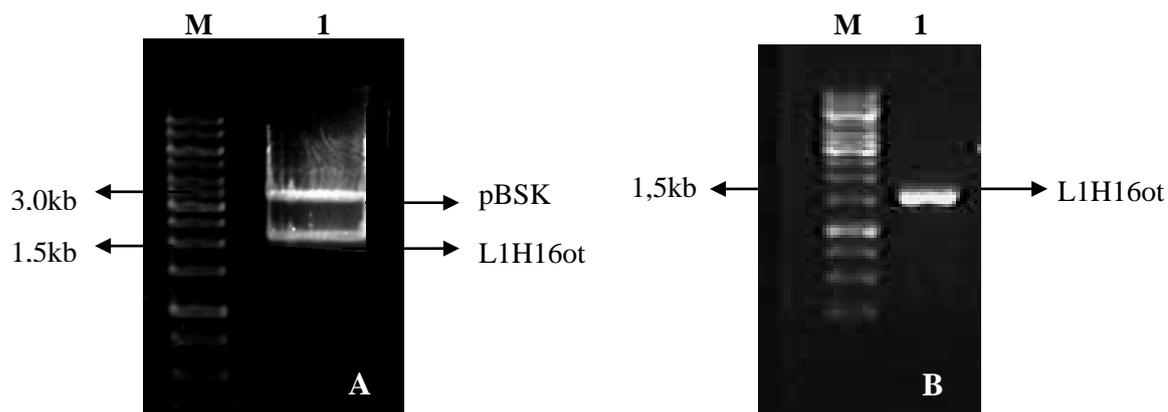


Figura 13. Purificação de L1H16ot. Em A, mega digestão do pBSK_L1H16ot para liberação do inserto; M: marcador 1kb (Promega); 1: digestão com as enzimas XhoI e NotI. Em B, gene L1H16ot purificado; M: marcador 1kb (Ludwig); 1: gene L1H16ot. Gel de agarose 0,8%, corrida a 75V e 100V, respectivamente.

O vetor de expressão pPGK foi digerido com as enzimas XhoI e NotI, resultando na liberação do gene do fator de crescimento epidermal (EGF), o qual estava clonado na construção recebida (figura 14A). A figura 14B mostra o vetor pPGK purificado.

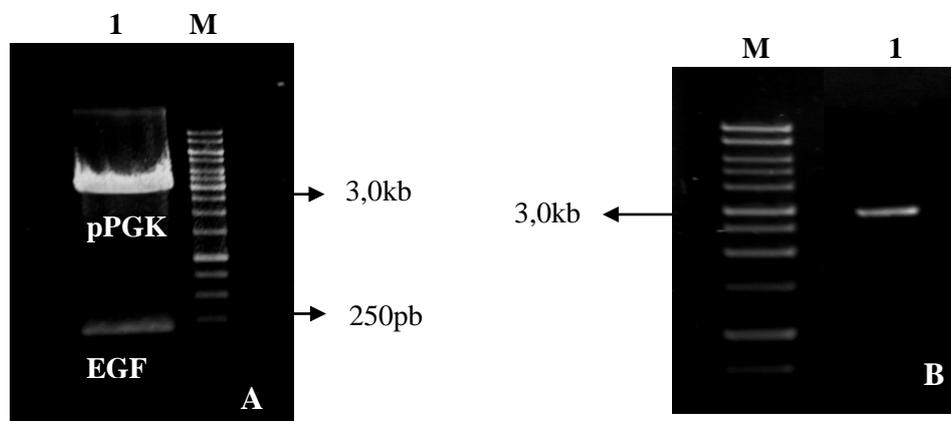


Figura 14. Purificação do vetor pPGK. Em A, digestão da construção pPGK_EGF para liberação do vetor; 1: construção pPGK_EGF digerida com XhoI e NotI; M: marcador 1kb (Ludwig). O vetor de expressão de aproximadamente 3,0Kb é visualizado em B; M: marcador 1kb (Promega); 1: vetor pPGK. Gel de agarose 0,8%, corrida a 100V.

A obtenção da construção PGK1_L1H16ot foi confirmada através de digestão e PCR. A digestão enzimática com as enzimas XhoI e NotI liberou o fragmento esperado, de 1,5Kb (figura 15A). Adicionalmente, as enzimas AccI e SacI também foram utilizadas para a digestão de sítios já conhecidos nas sequências do inserto e do vetor, respectivamente. A SacI

linearizou os vetores (sem inserto-3,0Kb e com inserto-4,5Kb) nos tamanhos esperados e a *AccI* liberou a banda de 593pb, indicando, deste modo, a correta orientação do inserto no vetor de expressão pPGK (figura 15B).

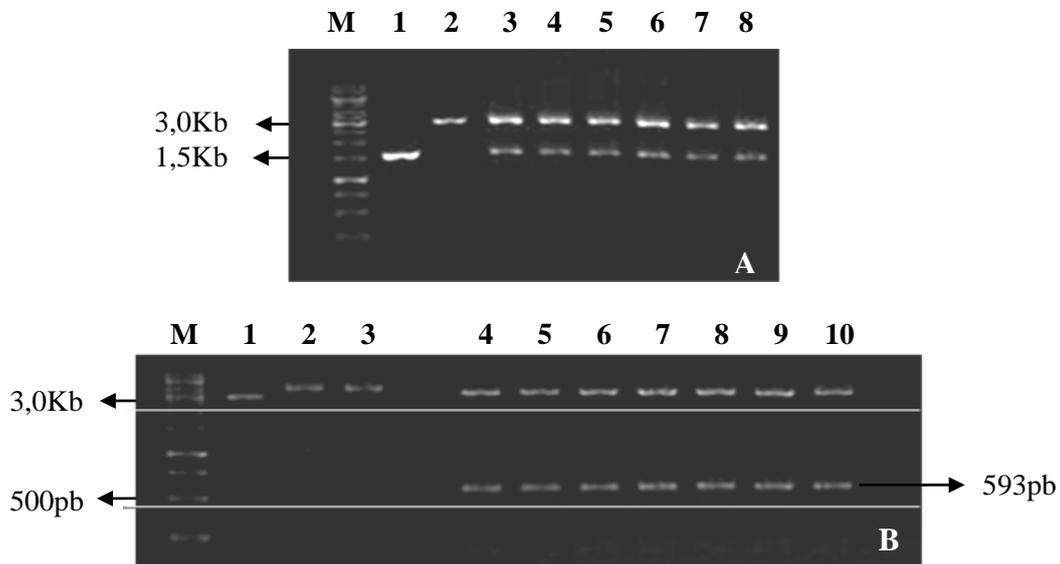


Figura 15. Confirmação dos clones pPGK_L1H16ot por digestão enzimática. Em A, digestão com enzimas *XhoI* e *NotI* visualizada em gel de agarose 0,8%, corrida a 100V.; M: Marcador 1Kb (Fermentas); 1: L1H16ot purificado; 2: vetor pPGK purificado; 3-8: liberação do inserto a partir do DNA plasmidial de 6 clones. Em B, digestões com enzimas *SacI* e *AccI* visualizadas em gel de agarose 2%, corrida a 100V; M: Marcador 1Kb (Fermentas); 1: vetor pPGK sem inserto (3,0Kb), linearizado com *SacI*; 2 e 3: linearização do DNA plasmidial de 2 clones com *SacI* (aproximadamente 4,5Kb); 4-10: digestão com a enzima *AccI* a partir do material genético de 7 clones, liberando um fragmento de 593pb da sequência otimizada do gene L1 de HPV-16.

Os fragmentos amplificados por PCR, tanto com os *primers* específicos para a sequência otimizada de L1, quanto com os *primers* para as regiões flangeadoras, presentes no vetor de expressão também confirmaram a correta integração L1H16ot no vetor pPGK (figura 16).

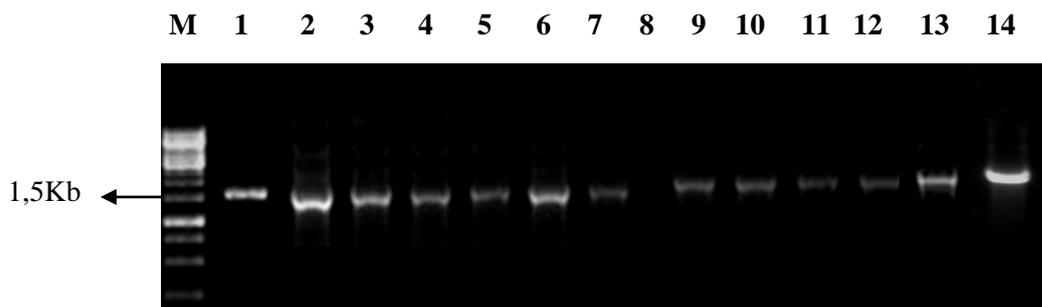


Figura 16. Confirmação dos clones pPGK_L1H16ot por PCR. M: Marcador 1Kb (Fermentas); 1: gene L1H16ot purificado; 2: controle positivo da reação; 3-7: bandas referentes à amplificação com os primers para sequencia otimizada do gene L1 (no gel, um pouco menor que o gene L1 purificado, pois o primer L1H16ot *Forward* anela após os 30 primeiros nucleotídeos da sequência otimizada); 8: controle negativo da reação; 9-13: bandas referentes à amplificação com os primers PGK *Forward* e L1H16ot *Reverse*; 14: banda referente à amplificação com os primers PGK *Forward* e PGK *Reverse* que anelam nas regiões flanqueadoras do inserto (apenas um clone foi escolhido). Os resultados foram visualizados em gel de agarose 0,8%, após corrida a 100V.

6.1.3. Obtenção dos clones X33/pPGK_L1H16ot

Os clones em célula de *Pichia pastoris* foram devidamente selecionados através do crescimento em placas com o antibiótico zeocina. Inúmeras colônias foram obtidas, mas apenas algumas foram repicadas em outra placa com zeocina (figura 16), para as análises posteriores. Uma PCR de colônia foi realizada com 4 clones, para confirmação da inserção do cassete de expressão no genoma da levedura (figura 17).

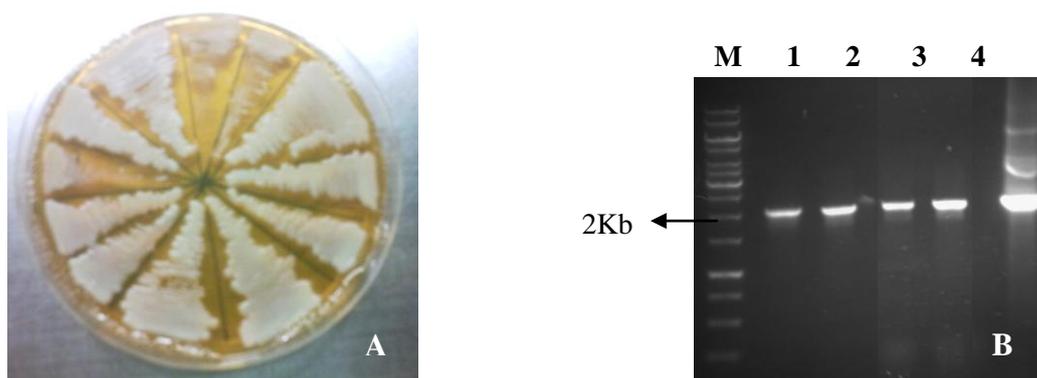


Figura 17. Clones X33/pPGK_L1H16ot. Em A, uma placa de YPD contendo 500µg/mL de zeocina, com estrias de algumas das colônias obtidas pela eletroporação. Em B, a confirmação da integração do cassete de expressão no genoma de *P.pastoris* por PCR de colônia. M: Marcador 1Kb Fermentas; 1-4: clones amplificados com os *primers* que anelam no vetor

pPGK (regiões que flanqueiam o gene L1H16ot); 6: controle positivo da PCR (vetor pPGK_L1H16ot).

6.1.4. Detecção da transcrição do gene L1H16ot em células de *Pichia pastoris*

Para análise da transcrição, um clone foi selecionado para extração de RNA total e detecção do RNAm do gene L1H16ot. A amplificação do fragmento de 500pb (região interna do gene), resultante dos *primers* desenhados para a RT-PCR, com base na sequência otimizada (figura 18), foi visualizada em gel de agarose 1%.

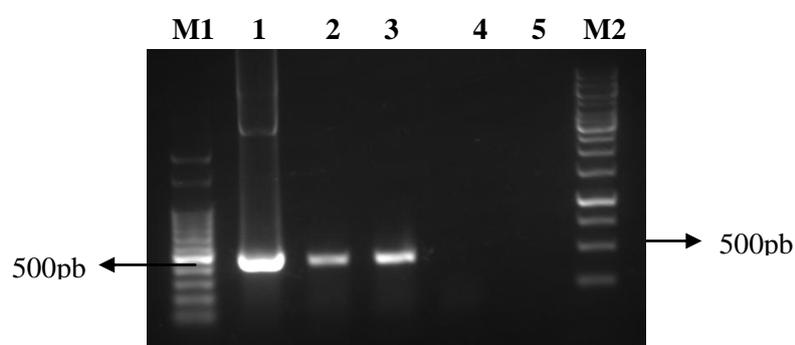


Figura 18. RT-PCR de clone X33/ PGK_L1H16ot. M1: marcador de 100pb (Ludwig); 1: Controle positivo da reação; 2 e 3: duplicata do cDNA amplificado, do clone X33/ pPGK_L1H16ot; 4: controle negativo da síntese de cDNA, com ausência da transcriptase reversa; 5: controle negativo da reação de PCR (branco); M2: marcador de 1Kb (Fermentas).

6.1.5. Visualização das proteínas dos clones por SDS-PAGE

Após precipitação das proteínas por TCA, dos sobrenadantes dos clones induzidos, as mesmas foram aplicadas em gel SDS-PAGE e submetidas à coloração por prata. No perfil apresentado, a banda de 55KDa referente à proteína L1 de HPV-16 não pôde ser evidenciada com precisão (figura 19).

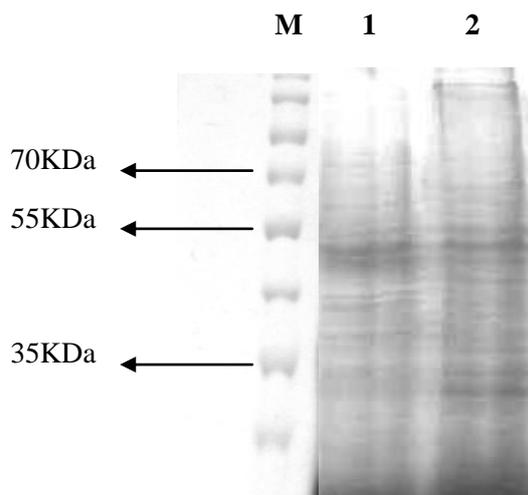


Figura 19: Proteínas visualizadas por SDS-PAGE. M: marcador de peso molecular (*PageRuler Prestained Protein Ladder-Fermentas*); 1: proteínas precipitadas por TCA a partir de sobrenadante do controle negativo X33/pPGK; 2: proteínas precipitadas por TCA a partir de sobrenadante do clone X33/pPGK_L1H16ot. Nos poços 1 e 2 foram aplicados 20 μ l da amostra. As proteínas foram precipitadas a partir do sobrenadante do tempo de 72 horas de indução.

6.1.6. Detecção da proteína L1H16 por Dot Blot e Colony Blot

A detecção da proteína L1 com anticorpo CamVir-1, foi possível, inicialmente, pelos ensaios de dot blot (utilizando o sobrenadante dos clones) e colony blot (utilizando as linhagens recombinantes repicadas em placa). A expressão do gene L1H16ot foi satisfatória apenas para alguns clones, demonstrada pela presença da proteína recombinante no meio extracelular, como observado nas figuras 20 e 21, respectivamente.

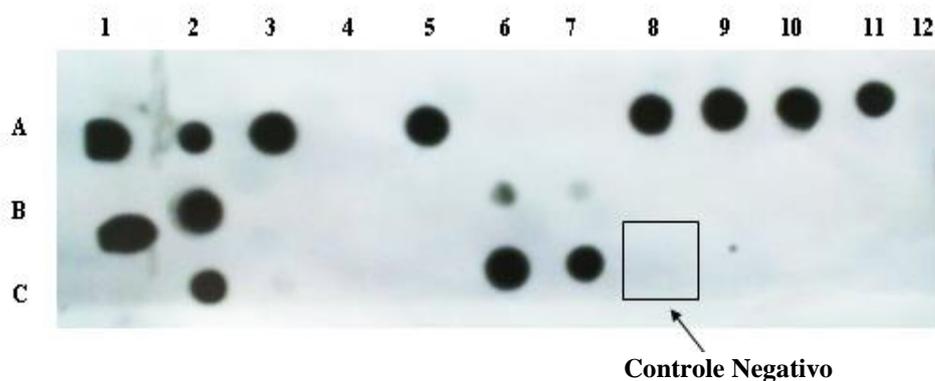


Figura 20. Dot Blot de clones X33/ PGK_L1H16ot. Em cada poço do blotter foram aplicados 100 μ l do sobrenadante dos clones crescidos em *deep well*, assim como do controle negativo (X33/pPGK1), representado na figura como a amostra 8C. Para alguns clones foi observada ausência de reação, como por exemplo, o clone 4A.

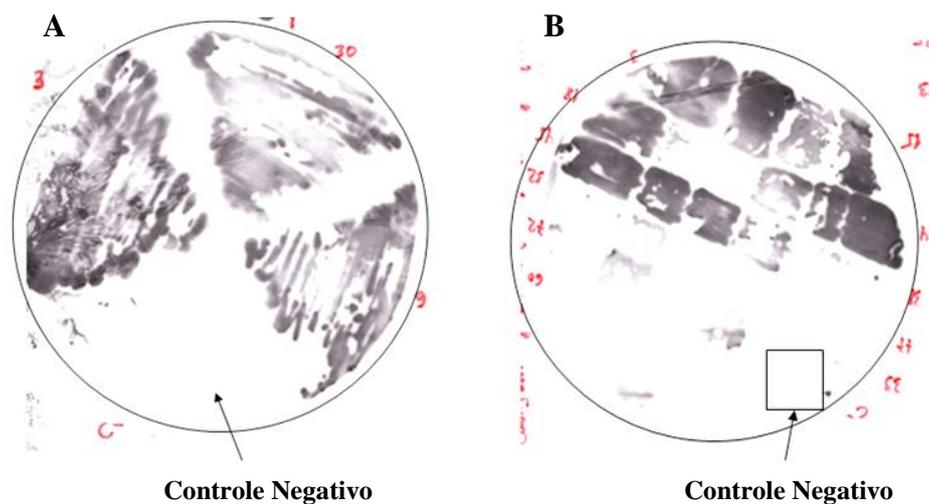


Figura 21. Colony Blot de clones X33/ PGK_L1H16ot. Ambas as placas A e B, apresentam reações específicas nos clones, assim como a ausência de reação nas estrias do clone negativo (X33/pPGK1). Semelhantemente ao dot blot, em certos clones (presentes na placa B) não foi detectada a expressão de L1.

6.1.7. Detecção da proteína L1H16 por Western Blot

Alguns clones foram selecionados para expressão em frasco, com base nos resultados provenientes do dot blot e do colony blot, para realização do Western blot. Neste último experimento foram utilizadas as amostras precipitadas (1ml do sobrenadante) por TCA. A figura 22 demonstra uma reação específica nas amostras dos clones, após incubação com anticorpo CamVir-1 (anti-L1 de HPV-16).

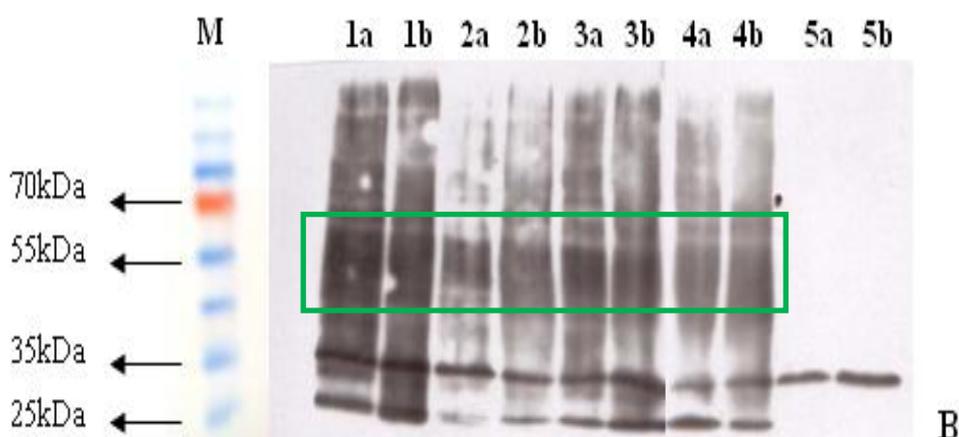


Figura 22. Western Blot da proteína L1H16. A figura mostra as proteínas precipitadas dos clones, M: marcador de peso molecular (*PageRuler Prestained Protein Ladder-Fermentas*); 1a e 1b: proteínas precipitadas nos tempos de 24 horas (T24) e de 72 horas (T72) do clone 1; 2a e 2b: proteínas precipitadas dos T24 e T72 do clone 2; 3a e 3b: proteínas precipitadas dos

T24 e T72 do clone 3; 4a e 4b: proteínas precipitadas dos T24 e T72 do clone 4; 5a e 5b: proteínas precipitadas dos T24 e T72 do controle negativo (X33/pPGK). Em cada poço foram aplicados 20µl de amostra. A área contornada em verde, mostra regiões mais intensas, correspondentes à proteína L1, de massa molecular de 55KDa.

6.2. Estratégia baseada em imunização genética: vacina de DNA

6.2.1. Obtenção do gene E5 de HPV-16 otimizado

O gene E5 de HPV-16 foi devidamente sintetizado pela empresa *Epoch Biolabs*, com os códons otimizados para expressão em células de mamífero. A sequência do gene otimizado (figura 23) foi alinhada com a sequência do gene E5 selvagem de HPV-16 para identificação do grau de modificação após a síntese do gene. A sequência otimizada apresentou 27% de diferença em relação à sequência selvagem. Esta análise foi realizada com a ferramenta *Nucleotide Blast* disponibilizada pelo NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

```
CTCGAGGCCACCATGGACACCTATCGCTATATA TACTGCATT CACAATATA ACCGGTGTCTGTTTCGCACTGCTC
TGCGTGCTCCTCTGCGTTTGTCTGCTGATACGGCCTCTCCTGCTGT CAGTGTCTACTTACACAAGTCTCATTATC
CTGGTGCTGCTGCTGTGGATCACAGCAGCCTCCGCTTTAGATGTTTTATCGTTTATATCATTTTCGTGTATATA
CCACTGTTTCTGATCCATACCCATGCAAGATTCTGATCACAtga GAATTCGGGCCGC
```

Figura 23. Sequencia do gene E5H16ot. Em azul são mostrados os nucleotídeos referentes aos sítios de restrição, à sequência Kozak, ao epítipo AU1 para detecção, e ao códon de parada. Em preto, a sequência do gene onde houve a troca de 27% dos nucleotídeos para os preferencialmente utilizados em mamíferos.

6.2.2. Clonagem do gene E5 de HPV-16 otimizado em vetor vacinal pCIneo

A digestão da construção pBSK_E5H16ot foi realizada para liberação e posterior purificação do inserto E5H16ot (figura 24).

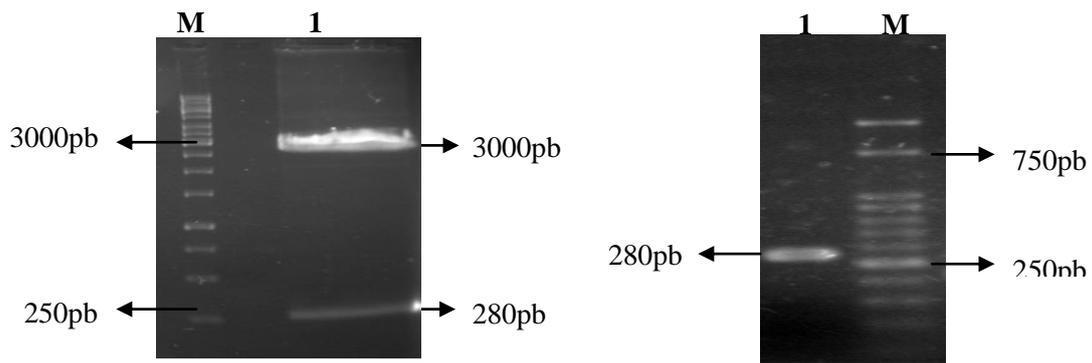


Figura 24. Purificação do gene E5H16ot. Em A, mega digestão do pBSK; M: marcador 1kb (Promega); 1: mega digestão com as enzimas XhoI e NotI. Em B, gene E5H16ot purificado; 1: gene E5H16ot; M: marcador 50pb (Ludwig). Gel de agarose 1%, corrida a 75V e 100V, respectivamente.

Para possibilitar a ligação do gene E5H16ot no vetor vacinal pCIneo, o mesmo foi purificado, após digestão com as mesmas enzimas (figura 25).

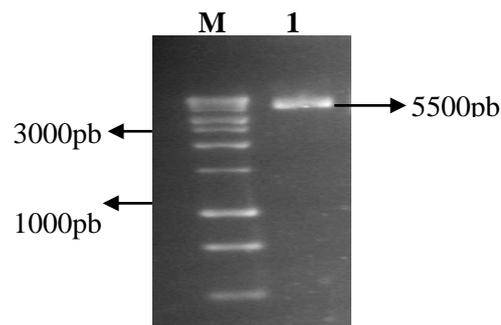


Figura 25. Vetor vacinal pCIneo purificado. M: Marcador 1kb (Promega); 1: vetor pCIneo visualizado em gel de agarose 2% e corrida a 100V.

Após obtenção do gene e do vetor purificados, os mesmos foram submetidos a reações de ligação. Os clones recombinantes de *E.coli* DH5 α foram obtidos e a primeira análise para confirmação foi feita através de digestão enzimática dos plasmídios extraídos que resultou na liberação do inserto de 280pb referente ao gene E5H16ot (figura 26).

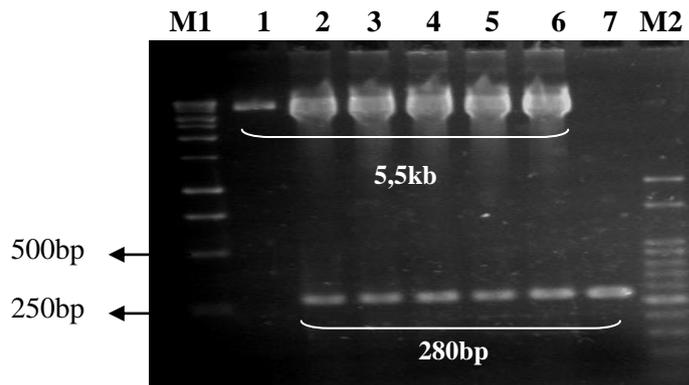


Figura 26. Detecção de clones pCI_E5H16ot por digestão enzimática. M1: marcador 1kb Promega; linha 1: vetor pCIneo linear utilizado como controle; linhas 2-6: construções pCI_E5H16ot digeridas, mostrando a liberação do inserto E5H16ot; linha 7: gene E5H16ot purificado, utilizado como controle; M2: marcador 50pb Ludwig. Corrida em gel de agarose 2%, a 100V.

O material genético dos clones positivos nas reações de digestão foi submetido à uma PCR (figura 27), tanto com os *primers* desenhados para a sequência otimizada de E5H16, quanto para as regiões que flanqueiam o gene, presentes no vetor pCIneo. Em uma mesma reação também foram utilizados os *primers Forward* para o vetor pCI e *Reverse* para o gene E5H16ot, no intuito de verificar a orientação correta do inserto.

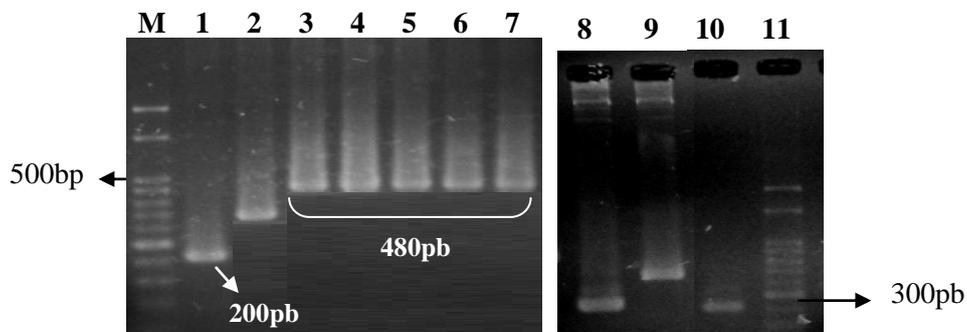


Figura 27. Detecção de clones pCI_E5H16ot por PCR. M: marcador 50pb Ludwig; 1: controle positivo da reação de PCR utilizando o vetor vazio pCIneo; 2: controle positivo da reação de PCR, utilizando uma construção conhecida com o gene E5 de BPV clonado em pCIneo; 3-7: amplificação do gene E5H16ot inserido no vetor pCIneo (480pb = região amplificada do vetor pCIneo de 200pb, adicionada da região de 280pb relativa ao gene E5otH16); 8: PCR do clone E5H16pCI com *primers* para o gene E5H16 otimizado; 9: PCR do clone com *primer Forward* para o vetor pCI e *primer Reverse* para o gene E5H16ot; 10: gene E5H16ot purificado; 11: marcador 50pb Ludwig. Corrida em gel de agarose 2%, a 100V.

6.2.3. Detecção da transcrição do gene E5H16ot em células HEK-293

A amplificação do gene E5H16ot através da RT-PCR mostrou que a sua transcrição estava ativa nas células HEK-293 transfectadas. Para os controles negativos da reação foram utilizados, tanto os cDNAs das células transfectadas com o vetor vazio pCI-neo, quanto das células 293 sem vetor. Além disso, para descartar a possibilidade de contaminação das amostras de RNA total com DNA, uma reação de síntese de cDNA sem a transcriptase reversa foi realizada (figura 28).

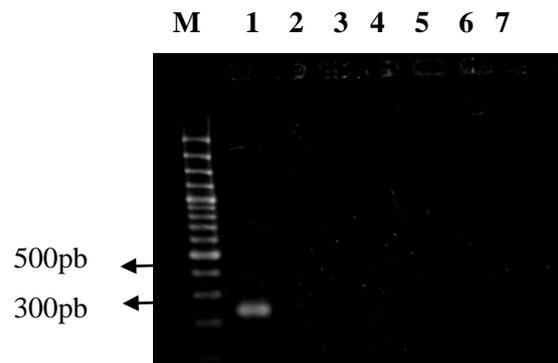


Figura 28. RT-PCR de células transfectadas com a construção pCI_E5H16ot. M: marcador GeneRuler™ 100 pb DNA Plus (Fermentas); 1: amplificação do cDNA do gene E5H16ot (280pb); 2: cDNA das células transfectadas apenas com o vetor pCIneo; 3: controle negativo com o cDNA de células 293 sem vetor; 4-6: controle sem transcriptase reversa dos poços 1,2 e 3 respectivamente; 7: controle negativo da reação de PCR (branco).

6.2.4. Western Blot da proteína E5 de HPV-16

O lisado das células transfectadas foi submetido à imunoprecipitação e Western blot (figura 29) para detecção da proteína E5 de aproximadamente 10-12kDa, através do anticorpo contra o epítipo AU1.

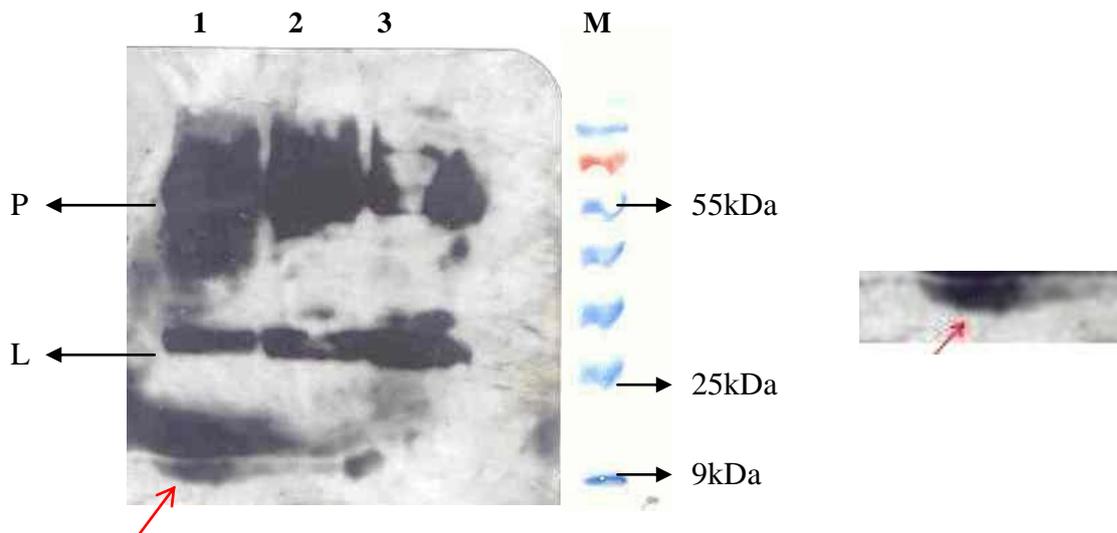


Figura 29. Western blot da proteína E5 de HPV-16. No poço 1: imunoprecipitação de extrato protéico (pós-transfecção da construção pCI_E5H16ot) proveniente de 2 placas (12 poços de 33,7mm, com 6×10^5 células cada). A seta vermelha, mostra revelação de uma banda na altura de aproximadamente 10kDa, correspondendo a proteína de interesse. Em 2: imunoprecipitação de extrato protéico pós-transfecção da construção pCI_E5H16ot proveniente de 1 placa (6 poços de 33,7mm, com 6×10^5 células cada); em 3: controle negativo da imunoprecipitação utilizando extrato protéico imunoprecipitado, pós transfecção com o vetor pCI-neo sem inserto; M: marcador de peso molecular (*PageRuler Prestained Protein Ladder-Fermentas*). P e L correspondem às cadeias pesada e leve do anticorpo primário AU-1 (presente no complexo imunoprecipitado), reconhecidas pelo anticorpo secundário (Lal *et al*, 2005).

7. DISCUSSÃO

Neste trabalho, o gene L1 de HPV-16 otimizado foi integrado no genoma de *Pichia pastoris*, através de um vetor de expressão não comercial, com objetivo de obtermos uma elevada produção da proteína e consequente formação das VLPs vacinais contra o HPV. Além disso, construímos um vetor vacinal de DNA baseada no oncogene E5 do mesmo tipo viral, como uma estratégia de terapia contra as infecções já estabelecidas e, portanto, contra o desenvolvimento do câncer cervical.

A prevenção contra a infecção pelo HPV através do uso de técnicas clássicas como a utilização de microrganismos mortos ou atenuados é uma tarefa bastante complexa, já que a montagem de um sistema *in vitro* para obtenção destes vírions é inviável (Stanley, 2001; Da Silva et al., 2001). Neste sentido, as pesquisas na área da biotecnologia focaram o desenvolvimento da vacina de subunidade recombinante para o papilomavírus, baseada na produção heteróloga da proteína imunodominante, L1 (Frazer, 1997). Deste modo, um dos focos deste trabalho foi o desenvolvimento de um sistema de produção desta proteína capsidial, capaz de se arranjar em VLPs que conferem proteção à infecção. A escolha de *P.pastoris* como sistema de expressão teve como base, sua capacidade em produzir vários tipos de proteínas, em níveis elevados, de modo relativamente simples e de baixo custo quando comparado a outros, fazendo deste, um dos sistemas mais atrativos para a produção industrial (Cregg et al, 2000; Cereghino e Cregg, 2000; Balamurugan et al, 2007). Esta levedura tem sido utilizada para a produção industrial de vacinas e terapêuticos, como o antígeno de superfície da hepatite B e a glicoproteína D de herpesvírus bovino (Cereghino e Cregg, 2000).

Embora a eficiência em expressar variados genes, alguns trabalhos relatam a necessidade de substituição de códons raros no gene heterólogo pelos preferencialmente utilizados (*codon usage*) em *P.pastoris* (Byrne et al, 2000; Valencik & McDonald, 2001; Massaer et al, 2001), o que garante uma tradução eficiente pela levedura, elevando para até 20 vezes os níveis de produção (Outchkourov et al, 2002; Teng et al, 2007). Alguns trabalhos demonstram a expressão do gene L1 de HPV-16 em *P.pastoris*, mas os resultados iniciais mostram baixos níveis de expressão, insuficientes para a formação das VLPs (Coimbra et al, 2007; Kotzé et al, 2011). Segundo Bazan et al. (2009) e Li et al. (2003), a expressão deste gene em *P.pastoris*, foi elevada após a otimização dos códons no gene viral. Neste trabalho, a otimização do gene L1 para expressão no sistema de *Pichia*, proporcionou um aumento na

produção da proteína, pois foi possível detectá-la não só por *dot blot* (Coimbra *et al*, 2011), mas por *colony blot* e *western blot*, demonstrando que a mesma foi secretada pelo sistema de expressão.

Contudo, no trabalho de Bazan *et al.*(2009), além da otimização dos códons no gene, é demonstrado que o aumento na produção de L1 só foi possível com o uso de vetores do tipo episomal. Sabe-se que para uma produção em larga escala, vetores episomais não são indicados, uma vez que eles podem ser perdidos após sucessivas divisões mitóticas, pois como não estão integrados no genoma da levedura, podem ser perdidos na ausência de pressão seletiva. A necessidade de antibióticos para a manutenção desses clones aumenta os custos de produção e pode não concordar com as regras impostas por agências reguladoras (Sreekrishna *et al*, 1997). Desta maneira, levando em consideração a necessidade de clones estáveis para a produção de L1 em escala industrial, o presente trabalho utilizou um vetor do tipo integrativo originando a construção pPGK_L1H16ot, a qual foi inserida no genoma de *Pichia pastoris*.

No trabalho de Li *et al*, (2003) e também de outros autores (Coimbra *et al*, 2007; Bazan *et al*, 2009; Kotzé *et al*, 2011, Coimbra *et al*, 2011) são utilizados vetores para a produção intracelular da proteína, sendo o promotor *AOXI* responsável pela expressão do gene heterólogo (Invitrogen, 2001). Este promotor é amplamente utilizado em vários vetores comerciais, pois ele é fortemente induzível pelo metanol, fonte de carbono opcional para a *P.pastoris* (Cereghino *et al*, 2002). No entanto, este reagente é tóxico e inflamável, o que oferece riscos, em se tratando de produção em larga escala (Potvin *et al*, 2010). Neste sentido, a utilização de promotores constitutivos independentes de indutores, pode ser mais adequada e eficiente para a expressão de certos genes. Promotores como o *GAP* e o *PGKI*, na presença de glicose como fonte de carbono, atingem níveis de expressão semelhantes ou mesmo superiores, aos observados com o promotor *AOXI* (Vassileva *et al*, 2001; de Almeida *et al*, 2005). Este trabalho é o primeiro a utilizar um vetor não-comercial, integrativo e com um promotor do tipo constitutivo, o *PGKI*, para a expressão de L1 de HPV-16 nas células de *P. pastoris*. Além disso, o vetor PGK possui a sequência do fator α de secreção (Cereghino e Cregg, 2000) para direcionar a proteína para o meio extracelular. Esta característica é bastante relevante, desde que *Pichia pastoris* secreta poucas proteínas nativas (Cregg *et al*, 1993) o que pode facilitar a purificação da proteína heteróloga, principalmente nos casos em que esta representa a maior parte do total das proteínas do meio (Barr *et al.*, 1992).

Neste trabalho, os western blots para detecção de L1, revelaram um perfil de bandas diferente do esperado, sugerindo algum tipo de degradação ou glicosilação sofrida pela

proteína. Sabe-se que *P.pastoris* produz poucas proteases extracelulares (Kang *et al.*, 2000), mas que em altas densidades de células, pode ocorrer lise das mesmas, liberando outras proteases do meio intracelular, o que facilitaria a proteólise (Zhang *et al.*, 2007). O método de precipitação por TCA/acetona também pode proporcionar a degradação de proteínas (Pessoa e Kilikian, 2005). Kohl *et al.* (2007) observou um padrão de degradação da proteína L1 produzida em tabaco (*Nicotiana tabacum*) e precipitada por TCA, no qual duas bandas mais intensas foram reveladas, uma de ~36kDa e outra de ~25kDa. Em nosso trabalho foi verificada a presença destas bandas, indicando que a proteína pode ter sofrido uma degradação. A banda de ~36kDa também foi observada no controle negativo, o que pode ser resultante de uma interação inespecífica do anticorpo secundário (Coimbra, 2007) com alguma proteína nativa, ou constituinte do meio de cultivo da levedura.

Alguns estudos documentam que a proteína L1 do papilomavírus pode ser glicosilada (Larsen *et al.*, 1987; Pfister e Fuchs, 1994), quando expressa em células de mamífero (Browne *et al.*, 1988) e de inseto (Xi e Lawrence, 1991). São documentados quatro sítios de glicosilação na região N-terminal de L1 (Browne *et al.*, 1988; Zhou *et al.*, 1991), no entanto, ainda não é bem esclarecida a função desta modificação pós-traducional na formação da partícula viral. Um trabalho que utiliza o sistema de expressão em células de mamíferos observa que os monômeros de L1 do HPV-16, incorporados nas partículas virais, não são glicosilados (Zhou *et al.*, 1993). Por outro lado, vírions do BPV (isolados de papilomas de bezerros) apresentam pequenas quantidades de L1 glicosilada (Larsen *et al.*, 1987). No trabalho de Li *et al.*, (2003), no qual L1 de HPV-16 é expressa intracelularmente em *Pichia pastoris*, existem evidências de glicosilação na mesma. Portanto, no presente estudo, é possível que o aspecto difuso da reação revelada pelo *western blot* esteja relacionado a alguma glicosilação adicionada pela levedura. Outra hipótese para explicar este padrão poderia estar relacionada à alta concentração de proteína L1, como observado no estudo de Silva (2010); sendo, portanto, necessária a padronização da concentração através de dosagens e diluições para diminuir o “background” da reação. Mesmo assim, os resultados apresentados neste trabalho são válidos, pois o controle negativo não apresentou reação nos testes realizados com o anticorpo CamVir-1 (*dot blot*, *colony blot* e *western blot*), assegurando a eficiência do sistema de expressão utilizado.

Este estudo se encaixa numa das várias tentativas que vêm sendo realizadas no intuito de estabelecer plataformas biotecnológicas para produção de VLPs de HPVs como estratégias profiláticas que atendam, às necessidades e demandas regionais (Bimelt *et al.*, 2003; Varsani *et al.*, 2003). Estes esforços devem ser empregados para que existam vacinas contra o HPV,

alternativas às existentes, forçando assim, a queda do alto custo das que são licenciadas e aumentando sua penetração global (Karanam *et al*, 2009).

Além desta vertente, é preciso focar no desenvolvimento de vacinas com capacidade terapêutica para aqueles que já foram afetados (Stanley *et al*, 2006) e que se encontram, principalmente nos países em desenvolvimento, como o Brasil. Mais de 80% dos novos diagnósticos de câncer cervical ocorrem nestes países e estima-se que essa percentagem aumente para 90% em 2020 (WHO, 2010).

As análises deste trabalho, em relação ao desenvolvimento de uma vacina de DNA para o tratamento do câncer cervical baseada no gene E5 do HPV-16, ainda são bem iniciais. Mas os resultados *in vitro*, demonstram sua funcionalidade no que diz respeito à produção do antígeno. A necessidade de otimização dos códons no gene E5, assim como em L1, também foi uma estratégia utilizada. Segundo Disbrow *et al* (2003) dentre os 83 aminoácidos da proteína E5, 33 são codificados por códons raramente utilizados na tradução em mamíferos. Este último trabalho ainda relata que a expressão de E5 aumentou em mais de seis vezes após a otimização. Portanto, em nosso estudo, para que este gene fosse expresso com sucesso, foi realizada a síntese da sequência com a substituição dos códons por outros mais frequentemente utilizados nos mamíferos.

Após a construção do vetor vacinal pCI_E5H16ot, o mesmo foi inserido em células HEK-293, onde o RNAm do gene E5 foi detectado, por RT-PCR, evidenciando a transcrição ativa do gene heterólogo. Este resultado sustenta a presença da proteína E5 no meio intracelular, a qual foi detectada através de western blot, após a imunoprecipitação com o anticorpo primário direcionado ao epítipo AU1 (Lim *et al*, 1990). Como E5 é uma proteína de membrana, é fundamental a presença de detergentes não-iônicos no tampão de lise, no intuito de solubilizar as biomembranas e formar complexos lipídicos para facilitar a sua recuperação do meio intracelular. À esta etapa, foi adicionada a de imunoprecipitação para concentrar E5 do extrato obtido (Disbrow *et al*, 2003; Suprynowicz *et al*, 2005; Gieswein *et al*, 2003; Gruener *et al*, 2007), aumentando a sensibilidade do western blot (Trieu *et al*, 2009).

8. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os testes iniciais para as estratégias vacinais, profilática e terapêutica, mostraram resultados positivos no que diz respeito à expressão das proteínas L1 e E5 de HPV-16 nos sistemas de expressão com células de *Pichia pastoris* e de mamíferos, respectivamente.

Metodologias para purificação de L1 e obtenção das VLPs, como a cromatografia por troca iônica (através da cauda de histidina fusionada à proteína heteróloga) e a ultracentrifugação em gradientes de sacarose já estão sendo estudadas. Após a purificação das VLPs, a sua funcionalidade na ativação da resposta imune humoral deve ser avaliada em modelo animal.

Em relação à construção vacinal baseada no gene E5, experimentos em modelo animal são necessários para confirmar sua viabilidade e eficiência, principalmente no que diz respeito à ativação da resposta imune celular associada com a regressão das lesões cervicais pré-invasivas.

9. REFERÊNCIAS

af Geijersstam V, Kibur M, Wang Z, Koskela P, Pukkala E, Schiller J, et al (1998) Stability over time of serum antibody levels to human papillomavirus type 16. *J Infect Dis*, 177:1710-1714.

Andre S, Seed B, Eberle J, Schraut W, Bultmann A and Haas J (1998) Increased immune response elicited by DNA vaccination with a synthetic gp120 sequence with optimized codon usage. *J. Virol.* 72:1497–1503.

Arias-Pulido H, Peyton CL, Joste NE, Vargas, H. & Wheeler CM (2006) Human papillomavirus type 16 integration in cervical carcinoma in situ and in invasive cervical cancer. *J. Clin. Microbiol.* 44, 1755–1762.

Ashrafi GH, Haghshenas M, Marchetti B, Campo MS (2006) E5 protein of human papillomavirus 16 downregulates HLA class I and interacts with the heavy chain via its first hydrophobic domain. *Int. J. Cancer* 119, 2105–2112.

Ault KA (2007). Effect of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like-particle vaccine on risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2, grade 3, and adenocarcinoma in situ: a combined analysis of four randomised clinical trials *Lancet* 369 pp. 1861–1868.

Balamurugan V, Reddy GR, Suryanarayana VVS (2007) *Pichia pastoris*: A notable heterologous expression system for the production of foreign proteins—Vaccines, *IJBT*, 6:175-186.

Baldez da Silva MF, Chagas BS, Guimarães V, Katz LM, Felix PM, Miranda PM, Lima AA, Arraes LC, Martins DB, Lima Filho JL, Stocco RC, Crovella S, Freitas AC, Beçak W (2009) HPV31 and HPV33 incidence in cervical samples from women in Recife, Brazil. *Genet Mol Res.* Dec 1;8(4):1437-43.

Barr KA, Hopkins SA and Sreekrishna K (1992) Protocol for efficient secretion of HSA developed from *Pichia pastoris*. *Pharm. Eng.* 12:48-51.

Bazan SB, de Alencar Muniz Chaves A, Aires KA, Cianciarullo AM, Garcea RL, Ho PL (2009) Expression and characterization of HPV-16 L1 capsid protein in *Pichia pastoris*. *Arch Virol*. 154(10):1609-17.

Bergquist c, Johansson eL, Lagergard T, Holmgren J, Rudin A (1997) Intranasal vaccination of humans with recombinant cholera toxin B subunit induces systemic and local antibody responses in the upper respiratory tract and the vagina. *Infect Immun* 65: 2676-2684.

Bimelt S, Sonnewald U, Galmbachar P, Willmitzer L, Muller M (2003) Production of Human Papillomavirus Type 16 Virus-Like Particles in Transgenic Plants. *J Virol* 77:9211-20.

Bishop B, Dasgupta J and Chen XS (2007) Structure-based engineering of papillomavirus major capsid 11:controlling particle assembly. *Virology Journal* 4:3.

Bodles-Brakhop AM, Draghia-Akli R (2008) DNA vaccination and gene therapy: optimization and delivery for cancer therapy. *Expert Rev Vaccines*, 7: 1085-1101.

Bolhassani A, Mohit E, Rafati S (2009) Different spectra of therapeutic vaccine development against HPV infections. *Human Vaccines*, 5: 671-689.

Bosch FX, Muñoz N, Shah KV and Meheus A (1992) Second International Workshop on the epidemiology of cervical cancer and human papillomavirus. *Int J Cancer* 52:171-173.

Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, et al (1995) Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J Natl Cancer Inst*. 87: 796-802.

Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ and Shah KV (2002) The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 55:244–265.

Bosh FX and de Sanjose S (2003) Chapter 1: human papillomavirus and cervical cancer-burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst Monogr* 3-13.

Bottley G, Watherston OG, Hiew YL, Norrild B, Cook GP, Blair GE (2008) High-risk human PV E7 expression reduces cell-surface MHC class I molecules and increases susceptibility to natural killer cells. *Oncogene* 27 (12), 1794–1799.

Breitbart F, Kirnbauer R, Hubbert NL, Nonnenmacher B, Trin-Dinh-Desmarquet C, Orth G, Schiller JT and Lowy DR (1995) Immunization with virus-like particles from cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) can protect against experimental CRPV infection. *J Virol* 69:3959–3963.

Browne HM, Churcher MJ, Stanley MA, Smith GL, Minson AC (1988) Analysis of the L1 gene product of human papillomavirus type 16 by expression in a vaccinia virus recombinant. *J Gen Virol* 1263-73

Brun JL, Dalstein V, Leveque J, Mathevet P, Raulic P, Baldauf JJ, Scholl S, Huynh B, Douvier S, Riethmuller D, Clavel C, Birembaut P, Calenda V, Baudin M, Bory JP (2011) Regression of high-grade cervical intraepithelial neoplasia with TG4001 targeted immunotherapy. *Am J Obstet Gynecol.* Feb;204(2):169.e1-8.

Byrne MP, Titball RW, Holley J and Smith LA (2000) Fermentation, purification, and efficacy of a recombinant vaccine candidate against botulinum neurotoxin type F from *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif.* 18: 327-337.

Candido AL, Resende M e Bessa LRG (2003) Resposta sorológica de ovinos inoculados com plasmídeos codificando a glicoproteína D do herpesvírus bovino 1 (BHV-1). *Arq Bras Med Vet Zootec* 55:256-261.

Carter JJ, Koutsky LA, Hughes JP, Lee SK, Kuypers J, Kiviat N, et al (2002) Comparison of human papillomavirus types 16, 18, and 6 capsid Castle Pe, Hildesheim A, Bowman FP, strickler HD, Walker JL, Pustilnik T, edwards RP, crowley-nowick PA cervical concentrations of interleukin-10 and interleukin-12 do not correlate with plasma levels. *J Clin Immunol* 22: 23-27.

Cavalcanti SM, Frugulhetti IC, Passos MR, Fonseca MF, et al. (1994) Prevalence of human papillomavirus DNA in female cervical lesions from Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 89: 575-580.

Cereghino JL, Cregg JM (2000) Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology* 24: 45-66.

Chandrachud LM, Grindlay GJ, McGarvie GM, O'Neil BW, Wagner ER, Jarrett WF, Campo MS (1995) Vaccination of cattle with the N-terminus of L2 is necessary and sufficient for preventing infection by bovine papillomavirus-4. *Virology*. 211(1):204-8.

Chang JL, Tsao YP, Liu DW, Huang SJ, LeeWH, Chen SL (2001) The expression of HPV-16 E5 protein in squamous neoplastic changes in the uterine cervix. *Journal of Biomedical Science*;8:206–13.

Chell SD, Witherden IR, Dobson RR, Moorghen M, Herman AA, Qualtrough D, et al (2006) Increased EP4 receptor expression in colorectal cancer progression promotes cell growth and anchorage independence. *Cancer Research*;66:3106–13.

Chen SL, Huang CH, Tsai TC, Lu KY, Tsao YP (1996) The regulation mechanism of c-jun and junB by human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein. *Archives of Virology*;141:791–800.

Chen XS, Garcea RL, Goldberg I, Casini G, Harrison SC (2000) Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. *Mol Cell*,5:557-56.

Chen YF, Lin CW, Tsao YP, Chen SL (2004) Cytotoxic-T lymphocyte human papillomavirus type 16 E5 peptide with CpG-oligodeoxynucleotide can eliminate tumor growth in C57BL/6 mice. *J Virol*;78:1333-43.

Clifford M, Smith JS, Plummer M, Muñoz N and Franceschi S (2003) Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer* 88:63–73.

Cohen SN, Chang AC, Boyer HW, Helling RB (1973) Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*, 70(11):3240-3244.

Conger KL, Liu JS, Kuo SR, Chow LT and Wang TS (1999) Human papillomavirus DNA replication. Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human DNA polymerase alpha/primase. *J Biol Chem* 274:2696-2705.

Conrad M., Bubb VJ, Schlegel R (1993) The human papillomavirus type 6 and 16 E5 proteins are membrane-associated proteins which associate with the 16-kilodalton pore-forming protein. *J. Virol.* 67, 6170–6178.

Coimbra EC, Souza HM, Leitão MCG, Santos JF, Beçak W, Stocco Dos Santos RC, Freitas AC (2007) Virus-Like Particles as a vaccinal strategy against tumors induced by papillomavirus infection. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, v. II, p. 689-696.

Coimbra EC, Gomes FB, Campos JF, Costa MDF, Mariz FC, Jesus ALS, Stocco RC, Beçak W, Freitas AC (2011) Production of L1 protein from different types of HPV in *Pichia pastoris* using an integrative vector. *Braz J med biol res* -on line.

Coimbra EC. Avaliação do uso de células da levedura *Pichia pastoris* para expressão do gene L1 do papilomavírus humano tipo 16. 2007. 104p. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

Connor JP, Ferrer K, Kane JP and Goldberg JM (1999) Evaluation of Langerhans' cells in the cervical epithelium of women with cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol* 75:130-135.

Cook JC, Joyce JG, George HA, Schultz LD, Hurni WM, Jansen KU, Hepler RW, Ip C, Lowe RS, Keller PM, Lehman ED (1999) Purification of virus-like particles of recombinant human papillomavirus type 11 major capsid protein L1 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expr Purif.* ;17(3):477-84.

Cregg JM, Vedvick TS, Raschke WC (1993) Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Bio/Technology*;11:905–10.

Cregg JM, Cereghino JL, Shi J. and Higgins DR. (2000) Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol Biotechnol.* 16: 23-52.

Crook T, Morgenstern JP, Crawford L and Banks L (1989) Continued expression of HPV-16 E7 protein is required for maintenance of the transformed phenotype of cells co-transformed by HPV-16 plus EJ-ras. *Embo J*; 8: 513-519.

Crusius K, Auvinen E, Steuer B, Gaissert H, Alonso A (1998) The human papillomavirus type 16 E5-protein modulates ligand-dependent activation of the EGF receptor family in the human epithelial cell line HaCaT. *Experimental Cell Research*;241:76–83.

Cubas R, Zhang S, Kwon S, Sevick-Muraca EM, Li M, Chen C, Yao Q (2009) Virus-like particle (VLP) lymphatic trafficking and immune response generation after immunization by different routes. *J immunother*, 32: 118-128.

Da Silva DM, Eiben GL, Fausch SC, Wakabayashi MT, Rudolf MP, Velders MP and Kast WM (2001) Cervical cancer vaccines: emerging concepts and developments. *J Cell Physiol* 186:169-182.

Dale C, Allen A, Fogarty S (1999) *Pichia pastoris*: a eukaryotic system for the large-scale production of biopharmaceuticals. *Biopharm*;12(11):36–42.

Daly R, Hearn MT: Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris* (2005) A useful experimental tool in protein engineering and production. *JMol Recognit*, 18(2):119-138.

Dannenber AJ, Lippman SM, Mann JR, Subbaramaiah K, DuBois RN (2005) Cyclooxygenase-2 and epidermal growth factor receptor: pharmacologic targets for chemoprevention. *Journal of Clinical Oncology*;23:254–66.

de Almeida JR, de Moraes LM, Torres FA (2005) Molecular characterization of the 3-phosphoglycerate kinase gene (PGK1) from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Yeast*. 22(9):725-37.

de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H (2004) Classification of papillomaviruses. *Virology* 324(1):17-27.

Dimaio D and Mattoon D (2001) Mechanisms of cell transformation by papillomavirus E5 proteins. *Oncogene* 20:7866-73.

Disbrow GL, Sunitha I, Baker CC, Hanover J, Schlegel R (2003) Codon optimization of the HPV-16 E5 gene enhances protein expression. *Virology* 311, 105–114.

Disbrow GL, Hanover JA, Schlegel R (2005) Endoplasmic reticulum-localized human papillomavirus type 16 E5 protein alters endosomal pH but not transGolgi pH. *J. Virol.* 79, 5839–5846.

Donnelly JJ, Ulmer JB, Shiver JW and Liu MA (1997) DNA vaccines. *Annu Rev Immunol*; 15: 617-648.

Donnelly JJ, Ulmer JB (1999) DNA vaccines for viral diseases. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 32: 215-222.

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

Doorbar J (2005) The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol* 32:7-15.

Doorbar J (2006) Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)*. May;110(5):525-41.

Duensing S, Munger K (2002) The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins independently induce numerical and structural chromosome instability. *Cancer Res.* 62, 7075–7082.

Duensing S, et al (2000) The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97, 10002–10007.

Duensing A, et al (2007) Centriole overduplication through the concurrent formation of multiple daughter centrioles at single maternal templates. *Oncogene* 26, 6280–6288.

Dunham SP (2002) The application of nucleic acid vaccines in veterinary medicine. *Res Vet Sci*, v. 73, n. 1, p. 9-16.

Dupuy C, Buzoni-Gatel D, Touzé A, Bout D and Coursaget P (1999) Nasal immunization of mice with human papillomavirus type 16 (HPV-16) virus-like particles or with the HPV-16 L1 gene elicits specific cytotoxic T lymphocytes in vaginal draining lymph nodes. *J Virol* 73 (11):9063-71.

Dyson N, Howley PM, Munger K & Harlow E (1989) The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 243, 934–937.

Eichten A, et al (2004) Molecular pathways executing the “trophic sentinel” response in HPV-16 E7-expressing normal human diploid fibroblasts upon growth factor deprivation. *Virology* 319, 81–93.

Eluf-Neto J, Booth M, Munõz N, Bosch FX, et al. (1994) Human papillomavirus and invasive cervical cancer in Brazil. *Br J Cancer.* 69: 114-119.

Favre M, Ramoz N and Orth G (1997) Human papillomaviruses: general features. *Clin Dermatol* 15(2):181-98.

Ferrandina G, Lauriola L, Distefano MG, Zannoni GF, Gessi M, Legge F, et al (2002) Increased cyclooxygenase-2 expression is associated with chemotherapy resistance and poor survival in cervical cancer patients. *Journal of Clinical Oncology*; 20:973–81.

Finzer P, Aguilar-Lemarroy A, Rosl F (2002) The role of human papillomavirus oncoproteins E6 and E7 in apoptosis. *Cancer Lett*; 188 : 15-24.

Fraenkel DG (1982) Carbohydrate metabolism. In *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Metabolism and Gene Expression*, Strathern JN, Jones EW, Broach JR (eds). Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY1–37.

Frattoni MG, Laimins, LA (1994) Binding of the human papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer-binding protein. *Proc Natl Acad Sci* 91:12398-12402.

Frazer IH (1997) Strategies for immunoprophylaxis and immunotherapy of papillomaviruses. *Clin Dermatol*;15:285-97.

Frazer IH (2004) Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nat Rev Immunol* 4(1):46-54.

Freitas AC (1997) Transferência do gene *bsr* (gene de resistência a blasticidina-S) por meio de vetor retroviral: mutações na região do códon de iniciação levaram a superexpressão. DISSERTAÇÃO apresentada a Universidade Federal de São Paulo.

Freitas AC, Bento FM, Ramesh N, Osborne WRA, Han SW (2002) Modified blasticidin S resistance gene (*bsrm*) as a selectable marker for construction of retroviral vectors. *Journal of Biotechnology*, v. 95, n.6, p. 57-62.

Freivalds J, Dislers A, Ose V, Skrastina D, Cielens I, Pumpens P, Sasnauskas K, Kazaks AJ (2006) Assembly of bacteriophage Q beta virus-like particles in yeast *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*. *Biotechnol.* May 29;123(3):297-303. Epub .

Gaffney DK, Holden J, Davis M, Zempolich K, Murphy KJ, Dodson M (2001) Elevated cyclooxygenase-2 expression correlates with diminished survival in carcinoma of the cervix treated with radiotherapy. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*;49:1213–7.

Garcia F, Petry KU, Muderspach L, Gold MA, Braly P, Crum CP, Magill M, Silverman M, Urban RG, Hedley ML and Beach KJ (2004) ZYC101a for treatment of high-grade cervical intraepithelial neoplasia: a randomized controlled trial. *Obstet Gynecol*; 103: 317-326.

Garland SM, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, Perez G, Harper DM and Leodolter S et al (2007) Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent anogenital diseases, *N Engl J Med* 356 pp. 1928–1943.

Garnett TO, Filippova M & Duerksen-Hughes PJ (2006) Accelerated degradation of FADD and procaspase 8 in cells expressing human papilloma virus 16 E6 impairs TRAIL-mediated apoptosis. *Cell Death Differ.* 13, 1915–1926.

Garnett TO & Duerksen-Hughes PJ (2006) Modulation of apoptosis by human papillomavirus (HPV) oncoproteins. *Arch. Virol.* 151, 2321–2335.

Gasparic M, Rubio I, Thönes N, Gissmann L, et al. (2007) Prophylactic DNA immunization against multiple papillomavirus types. *Vaccine.* 25: 4540-4553.

Genther Williams SM, Disbrow GL, Schlegel R, Lee D, Threadgill DW, Lambert PF (2005) Requirement of epidermal growth factor receptor for hyperplasia induced by E5, a high-risk human papillomavirus oncogene. *Cancer Research*;65:6534–42.

Gerdt V, Jons A e Makoschey B (1997) Protection of pigs against Aujeszky's disease by DNA vaccination. *J Gen Virol* 78:2139-2146.

Gieswein CE, Sharom FJ, Wildeman AG (2003) Oligomerization of the E5 protein of human papillomavirus type 16 occurs through multiple hydrophobic regions. *Virology.* Sep 1;313(2):415-26.

GlaxoSmithKline UK (2007) Cervarix suspension for injection in pre-filled syringe Human Papillomavirus vaccine [Types 16, 18] (Recombinant, adjuvanted, adsorbed) Disponível em: <<http://www.medicines.org.uk/emc/medicine/20204/SPC/Cervarix/>> acesso em: 31/03/2011.

Goés LGB, Freitas AC, Ferraz OP, Rieger TT, et al. (2008) Bovine papillomavirus type 4 L1 gene transfection in a *Drosophila* S2 cell expression system: absence of L1 protein expression. *Braz. J. Microbiol.* 39: 1-4.

Gollob JA, Mier JW, Veenstra K (2000) Phase I trial of twice-weekly intravenous interleukin 12 in patients with metastatic renal cell cancer or malignant melanoma: ability to maintain IFN- α induction is associated with clinical response. *Clin Cancer Res* 6:1678–1694.

Gonçalves MA, Massad E, Burattini MN and Villa LL. (1999) Relationship between human papillomavirus (HPV) genotyping and genital neoplasia in HIV-positive patients of Santos City, São Paulo, Brazil. *Int J STD AIDS.* 10: 803-807.

Greenhough A, Smartt HJ, Moore AE, Roberts HR, Williams AC, Paraskeva C, et al (2009) The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis*;30:377–86.

Grinna LS, Tschopp JF (1989) Size distribution and general structural features of N-linked oligosaccharides from the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Yeast.* Mar-Apr;5(2):107-15.

Gruener M, Bravo IG, Momburg F, Alonso A, Tomakidi P (2007) The E5 protein of the human papillomavirus type 16 down-regulates HLA-I surface expression in calnexin-expressing but not in calnexin-deficient cells. *Virol J.* Oct 30;4:116.

Grujic M, Holst PJ, Christensen JP, Thomsen AR (2009) Fusion of a viral antigen to invariant chain leads to augmented T-cell immunity and improved protection in gene-gun DNA-vaccinated mice. *J Gen Virol* 90:414–422.

Guimarães V, Guimarães R, Brandão L, Silva MFPTB, et al. (2008) Association between *MBL2* gene functional polymorphisms and high-risk human papillomavirus infection in Brazilian women. *Hum Immunol.* 69: 273-278.

Gurunathan S, Klinman DM and Seder RA (2000) DNA vaccines: immunology, application, and optimization. *Annu Rev Immunol*; 18: 927-974.

Haller K, Stubenrauch F and Pfister H (1995) Differentiation-dependent transcription of the epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus type 5 in benign lesions. *Virology* 214:245–255.

Han R, Reed CA, Cladel NM, Christensen ND (1999) Intramuscular injection of plasmid DNA encoding cottontail rabbit papillomavirus E1, E2, E6 and E7 induces T cell-mediated but not humoral immune responses in rabbits. *Vaccine* 17:1558-1566.

Harper DM Franco EL, Wheeler CM, Moscicki AB, Romanowski B and Roteli-Martins CM et al (2006) Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial, *Lancet* 367 pp. 1247–1255.

Hasan UA, Bates E, Takeshita F, Biliato A, Accardi R, Bouvard V, Mansour M, Vincent I, Gissmann L, Iftner T, Sideri M, Stubenrauch F, Tommasino M (2007) TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human PV type 16. *J. Immunol.* 178 (5), 3186–3197.

Henderson DA. Edward Jenner's Vaccine (1997) *Public Health Reports* (1974-), Vol. 112, No. 2 (Mar. - Apr.), pp. 116-121.

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

Herdman MT, Pett MR., Roberts I, Alazawi WO, Teschendorff AE, Zhang XY, Stanley MA, Coleman N (2006) Interferon-beta treatment of cervical keratinocytes naturally infected with

human PV 16 episomes promotes rapid reduction in episome numbers and emergence of latent integrants. *Carcinogenesis* 27 (11), 2341–2353.

Hou L, Wu H, Xu L, Yang F (2009) Expression and self-assembly of virus-like particles of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in *Escherichia coli*. *Arch. Virol.* 154: 547-553.

Hu J, Han R, Cladel NM, Pickel MD, Christensen ND (2002) Intracutaneous DNA Vaccination with the E8 Gene of Cottontail Rabbit Papillomavirus Induces Protective Immunity against Virus Challenge in Rabbits. *J Virol* 76:6453-6459.

Huang CF, Monie A, Weng WH, Wu T (2010) DNA vaccines for cervical cancer. *Am J Transl Res.* Jan 2;2(1):75-87.

Huibregtse JM, Scheffner M. & Howley PM (1991) A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *EMBO J.* 10, 4129–4135

INCA (2009) Estimativa 2010: Incidência de cancer no Brasil. Rio de Janeiro, Ministério da Saúde, Instituto Nacional do Câncer, Brasil. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/>> Acesso em: 30/03/2011.

Innis MA (1989) Glycosylation of heterologous proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology.* ;13:233-46.

Invitrogen (2001) Pichia expression kit, “Protein Expression: A manual of Methods for expression of Recombinant Proteins using pPICZ and pPICZ α in *Pichia pastoris*”. Invitrogen, Carlsbad, Version G; p 1-74.

Jayshree RS, Sreenivas A, Tessy M, Krishna S (2009) Cell intrinsic & extrinsic factors in cervical carcinogenesis. *Indian J Med Res.* Sep;130 (3):286-95.

Jeon S, Allen-Hoffmann BL, Lambert PF (1995) Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *J Virol*; 69 : 2989-97.

Johansson M, Lycke NY (2003) Immunology of the human genital tract *Curr Opin Infect Dis* 16: 43-49.

Kadish AS, Timmins P, Wang Y, Ho GY, Burk RD, Ketz J, He W, Romney SL, Johnson A, Angeletti R, Abadi M (2002) Regression of cervical intraepithelial neoplasia and loss of human papillomavirus (HPV) infection is associated with cell-mediated immune responses to an HPV type 16 E7 peptide. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 11 (5) May 483-8.

Kalil J, Cunha-Neto E, Guilherme L (2008) Novas estratégias de vacinas. *Gazeta Médica da Bahia*, v. 78, p. 65-71.

Kang HA, Choi ES, Hong WK, Kim JY, Ko SM, Sohn JH, Rhee SK (2000) Proteolytic stability of recombinant human serum albumin secreted in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 53: 575-582.

Kanodia S, Fahey LM and Kast WM (2007) Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. *Curr Cancer Drug Targets* 7(1):79-89.

Karanam B, Jagu S, Huh WK, Roden RBS (2009) Developing vaccines against minor capsid antigen L2 to prevent papillomavirus infection. *Immunol Cell Biol* 87:287-299.

Kim S, Yang J (2006) Human papillomavirus type 16 E5 protein as a therapeutic target. *Yonsei Medical Journal* 47: 1-14.

Kim SH, Oh JM, No JH, Bang YJ, Juhn YS, Song YS (2009) Involvement of NF-kappaB and AP-1 in COX-2 upregulation by human papillomavirus 16 E5 oncoprotein. *Carcinogenesis*; 30:753-7.

Kim MK, Kim HS, Kim SH, Oh JM, Han JY, Lim JM, Juhn YS, Song YS (2010) Human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein as a new target for cervical cancer treatment. *Biochem Pharmacol.* Dec 15;80(12):1930-5.

Kirnbauer R, Booy F, Cheng N, Lowy DR, Schiller JT (1992) Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89:12180-12184.

Kirnbauer R, Chandrachud LM, O'Neil BW, Wagner ER, Grindlay GJ, Armstrong A, McGarvie GM, Schiller JT, Lowy DR and Campo MS (1996) Virus-like particles of bovine papillomavirus type 4 in prophylactic and therapeutic immunization. *Virology* 219:37-44.

Kjaer SK, Sigurdsson K, Iversen OE, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, Perez G, et al (2009) A pooled analysis of continued prophylactic efficacy of quadrivalent human papillomavirus (Types 6/11/16/18) vaccine against high-grade cervical and external genital lesions. *Cancer Prev Res (Phila Pa)*;2:868-78.

Ko, Hyun-Jeong; Ko, Sung-Youl; Kim, Yeon-Jeong; Lee, Eun-Gae; Cho, Sang-Nae; Kang, Chang-Yuil (2005) Optimization of Codon Usage Enhances the Immunogenicity of a DNA Vaccine Encoding Mycobacterial Antigen Ag85B. *Infection and Immunity*, 73: 5666-5674.

Kobayashi A, Darragh T, Herndier B, Anastos K, Minkoff H, Cohen M, et al (2002) Lymphoid follicles are generated in high-grade cervical dysplasia and have differing characteristics depending on HIV status. *Am J Pathol*; 160 : 151-64.

Kohl TO, Hitzeroth II, Christensen ND, Rybicki EP (2007) Expression of HPV-11 L1 protein in transgenic *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana tabacum*. *BMC Biotechnol* 7:56.

Kotzé L, Smith JJ, Haan R den, van Zyl WH and Görgens JF (2011) Expression of human papillomavirus type 16 (HPV16) L1 protein in *Pichia pastoris*. *African Journal of Biotechnology* Vol. 10 (2), pp. 214-219.

Koutsky L (1997) Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med*, 102:3-8.

Krieg AM (2002) CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* 20:709-60.

Kristiansen E, Jenkins A, & Holm R (1994) Coexistence of episomal and integrated HPV16 DNA in squamous cell carcinoma of the cervix. *J Clin Pathol* 47, 253–256.

Kupper TS and Fuhlbrigge RC (2004) Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. *Nat Rev Immunol* 4:211–222.

Kurjan J, Herskowitz I (1982) Structure of a yeast pheromone gene (MF alpha): a putative alpha-factor precursor contains four tandem copies of mature alpha-factor. *Cell*, 30, 933-943.

Kutzler MA, Weiner DB (2008) DNA vaccines: ready for prime time? *Nat Rev* 9: 776-788.

Lal A, Haynes SR, Gorospe M (2005) Clean Western blot signals from immunoprecipitated samples. *Mol Cell Probes* 19:385-8.

Larsen PM, Storgaard L, Fey SJ (1987) Proteins present in bovine papillomavirus particles. *J Virol*. November; 61: 3596–3601.

Lee BN, Follen M, Shen DY, Malpica A, Adler-Storthz K, Shearer WT and Reuben JM (2004) Depressed type 1 cytokine synthesis by superantigen-activated CD4+ T cells of women with human papillomavirus-related high-grade squamous intraepithelial lesions. *Clin Diagn Lab Immunol* 11:239-44.

Lehtinen M, Rantala I, Toivonen A, Luoto H, Aine R, Lauslahti K, Yla-utinen A, Romppanen U and Paavonen J (1993) Depletion of Langerhans cells in cervical HPV infection is associated with replication of the virus. *Apmis* 101:833-837.

Li PC, Zhang XG, Zhou L, Zeng Y (2003) Gene optimization is necessary to express HPV type 6 L1 protein in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi*, 17: 310-314.

Lim PS, Jenson AB, Cowsert J, Nakai Y, Lim LY, Jin XW, Sunberg JP (1990). Specific interaction of papillomavirus major capsid protein epitopes by immunocytochemistry and epitope scanning of synthetic peptides. *J. Infect. Dis.* 162, 1263–1269.

Lima YAR, Alves MFC (2008) O sistema imune da mucosa do trato genital feminino e o impacto das doenças sexualmente transmissíveis. *Rev Patol Tropic* 37(4):295-309.

Lin CT, Tsai YC, He L, Calizo R, Chou HH, Chang TC, Song YK, Hung CF, Lai CH (2006) A DNA vaccine encoding a codon-optimized Human Papillomavirus Type 16 E6 gene enhances CTL response and anti-tumor activity. *Journal of Biomedical Science* 13: 481-488.

Lin CT, Tsai YC, He L, Yeh CN, Chang TC, Soong YK, Monie A, Hung CF, Lai CH (2007) DNA vaccines encoding IL-2 linked to HPV-16 E7 antigen generate enhanced E7-specific CTL responses and antitumor activity. *Immunol Lett.* 15;114(2):86-93.

Lin-Cereghino GP, Godfrey L, de la Cruz BJ, Johnson S, Khuongsathiene S, Tolstorukov I, Yan M, Lin-Cereghino J, Veenhuis M, Subramani S, Cregg JM (2006) Mxr1p, a key regulator of the methanol utilization pathway and peroxisomal genes in *Pichia pastoris*. *Mol Cell Biol.* Feb;26(3):883-97.

Liu MA (2010) DNA vaccines: a review. *Journal of Internal Medicine* 2003; 253: 402–410.

Liu DW, Tsao YP, Hsieh CH, Hsieh JT, Kung JT, Chiang CL, et al (2000) Induction of CD8 T cells by vaccination with recombinant adenovirus expressing human papillomavirus type 16 E5 gene reduces tumor growth. *J Virol*;74:9083-9.

Liu DW, Zhang Yu, Yu X-h, Jiang CL, Chen Y, Wu Y-ge, Jin Y-h, Niu J, Qu N, Liu M, Kong W (2007) Assembly and Immunogenicity of Human Papillomavirus Type 16 Major Capsid Protein (HPV16 L1) in *Pichia pastoris*. *Chemical Research in Chinese Universities* ;23(2):200-203.

Lorenzato F, Ho L, Terry G, Singer A, et al. (2000) The use of human papillomavirus typing in detection of cervical neoplasia in Recife (Brazil) *Int J Gynecol Cancer.* 10: 143-150.

Lowndes CM (2006) Vaccines for cervical cancer. *Epidemiol Infect* 134:1-12.

Luo D, Saltzman WM (2000) Synthetic DNA delivery systems. *Nat Biotechnol* 18:33–37.

Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B and Harvey LM (2005) Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast* 22: 249–270.

Malboeuf CM, Simon DAL, Lee YEE, Lankes HA, Dewhurst S, Frelinger JG, Rose RC (2007) Human papillomavirus-like particles mediate functional delivery of plasmid DNA to antigen presenting cells in vivo. *Vaccine*, 25: 3270-3276.

Massaer M, Mazzu P, Haumont M, Magi M, et al. (2001) High-level expression in mammalian cells of recombinant house dust mite allergen ProDer p 1 with optimized codon usage. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 125: 32-43.

Matthews K, Leong CM, Baxter L, Inglis E, Yun K, Bäckström BT, Doorbar J, Hibma M (2003) Depletion of Langerhans cells in human papillomavirus type 16-infected skin is associated with E6-mediated down regulation of E-cadherin. *J Virol.* Aug;77(15):8378-85.

Maufort JP, Williams SM, Pitot HC, Lambert PF (2007) Human papillomavirus 16 E5 oncogene contributes to two stages of skin carcinogenesis. *Cancer Research*;67:6106–12.

Maufort JP, Shai A, Pitot HC, Lambert PF (2010) A role for HPV16 E5 in cervical carcinogenesis. *Cancer Research*;70:2924–31.

McBride AA, Romanczuk H, Howley PM (1991) The papillomavirus E2 regulatory proteins. *J Biol Chem* 266:18411-4.

McLaughlin-Drubin, ME & Munger, K (2009) Oncogenic activities of human papillomaviruses. *Virus Res.* 143, 195–208

Merck & Co., Inc (2006) GARDASIL, Human Papillomavirus Quadrivalent (Types 6, 11, 16, and 18) Vaccine, Recombinant Suspension for intramuscular injection. Disponível <http://www.merck.com/product/usa/pi_circulars/g/gardasil/gardasil_pi.pdf> acesso em 31/03/2011.

Modis Y, Trus BL & Harrison SC (2002) Atomic model of the papillomavirus capsid. *EMBO J* 21, 4754–4762.

Mohr IJ, Clark R, Sun S, Androphy EJ, MacPherson P and Botchan MR (1990) Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator. *Science* 250:1694-1699.

Montgomery DL, Donnelly JJ, Shiver JW, Liu MA, Ulmer JB (1994) Protein expression in vivo by injection of polynucleotides. *Curr Opin Biotechnol* 5:505–510.

Moody CA, Laimins LA (2010) Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer*. 10:550-60.

Moscicki AB, Schiffman M, Kjaer S, Villa LL (2006) Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. *Vaccine*, 24(Suppl 3):S3-42-S3/51.

Motoyama S, Ladrines-Llave CA, Villanueva SL and Maruo T (2004) The Role of Human Papilloma Virus in the Molecular Biology of Cervical Carcinogenesis. *Kobe J Med Sciv* 50:9-19.

Munoz N (2000) Human papillomavirus and cancer: The epidemiological evidence. *J Clin Virol* 19:1-5.

Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ and Meijer CJ (2003) Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 348(6):518-27.

Muñoz N, Bosch FX, Castellsague X, Diaz M, de Sanjose S, Hammouda D, Shah KV, Meijer CJ (2004) Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *Int. J. Cancer*, 111: 278-285.

Munoz N, Castellsague X, de Gonzalez AB, Gissmann L (2006) Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*, 24(Suppl 3):S3-1-S310.

Myers G, Lu H, Calef C and Leitner T (1996) Heterogeneity of papillomaviruses. *Semin Cancer Biol* 7:349-358.

Nakauchi M, Kariwa H, Kon Y, Yoshii K, Maeda A, Takashima I (2008) Analysis of severe acute respiratory syndrome coronavirus structural proteins in virus-like particle assembly. *Microbiol. Immunol.* 52: 625-630.

Nobel_Foundation. The 2008 Nobel Prize in Physiology or Medicine - Illustrated Presentation. Disponível em:<<http://www.thebody.com/content/art48915.html>>Acesso em: 30/03/2011.

Noronha V, Mello W, Villa L, Brito A, et al. (1999) Human papillomavirus associated with uterine cervix lesions. *Rev Soc Bras Med Trop.* 32: 235-40.

Oh JM, KimSH, Lee YI, SeoM, KimSY, Song YS, et al (2009) Human papillomavirus E5 protein induces expression of the EP4 subtype of prostaglandin E2 receptor in cyclic AMP response element-dependent pathways in cervical cancer cells. *Carcinogenesis*;30:141–9.

Olsson SE, Kjaer SK, Sigurdsson K, Iversen OE, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, et al (2009) Evaluation of quadrivalent HPV 6/11/16/18 vaccine efficacy against cervical and anogenital disease in subjects with serological evidence of prior vaccine type HPV infection. *Hum Vaccine*, 5:696-704.

Outchkourov NS, Stiekema WJ and Jongsma MA. (2002) Optimization of the Expression of Equistatin in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif.* 24: 18-24.

Palena C, Abrams SI, Schlom J, Hodge JW (2006) Cancer vaccines: Preclinical studies and novel strategies. *Advances in Cancer Research*, 115-137.

Paavonen J, Naud P, Salmeron J, Wheeler C, Chow SN, Apter D, et al (2009) Efficacy of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by oncogenic HPV types (PATRICIA): final analysis of a double-blind, randomised study in young women. *Lancet*; 374:301–14.

Paavonen J, Jenkins D, Bosch FX, Naud P, Salmeron J and Wheeler CM et al (2007) Efficacy of a prophylactic adjuvanted bivalent L1 virus-like-particle vaccine against infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: an interim analysis of a phase III double-blind, randomised controlled trial, *Lancet* 369 (9580) pp. 2135–2137.

Palker TJ, Monteiro JM, Martin MM, Kakareka C, Smith JF, Cook JC, Joyce JG and Jansen KU (2001) Antibody, cytokine and cytotoxic T lymphocyte responses in chimpanzees immunized with human papillomavirus virus-like particles. *Vaccine* 19(27):3733-43.

Palmer KE, Jenson AB, Kouokam JC, Lasnik AB, Ghim SJ (2009) Recombinant vaccines for the prevention of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Exp Mol Pathol.* Jun;86(3):224-33.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2005) Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 55(2):74–108

Parkin DM (2006) The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer* 118(12):3030-44.

Pedroza-Saavedra A, Lam EW, Esquivel-Guadarrama F, Gutierrez-Xicotencatl L (2010) The human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein synergizes with EGF-receptor signaling to enhance cell cycle progression and the down-regulation of p27(Kip1). *Virology*; 400:44–52.

Perales MA, Yuan J, Powel S et al (2008) Phase I/II study of GMCSF DNA as an adjuvant for a multi-peptide cancer vaccine in patients with advanced melanoma. *Mol Ther* 16:2022–2029.

Pessoa A, Kilikian, BV. *Purificação de Produtos Biotecnológicos*. 1. ed. Barueri/SP: Editora Manole Ltda, 2005. v. 1. 444 p.

Peto J, Gilham C, Deacon J, Taylor C, Evans C, Binns W, et al (2004) Cervical HPV infection and neoplasia in a large population-based prospective study: the Manchester cohort. *Br J Cancer*, 91:942-953.

Petti L, Nilson LA, DiMaio D (1991) Activation of the platelet-derived growth factor receptor by the bovine papillomavirus E5 transforming protein. *EMBO J.* 10,845–855.

Pfister H, Fuchs PG (1994) Anatomy, taxonomy and evolution of papillomaviruses. *Intervirology*, 37:143-149.

Potvin G, Ahmad A, Zhang Z (2010) Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: A review. *Biochem Eng J* doi:10.1016/j.bej.2010.07.017

Pudney J, Quayle AJ, Anderson DJ (2005) Immunological microenvironments in the human vagina and cervix: mediators of cellular immunity are concentrated in the cervical transformation zone. *Biol Reprod*; 73: 1253-63.

Ramdass B, Maliekal TT, Lakshmi S, Rehman M, Rema P, Nair P, et al (2007) Coexpression of Notch1 and NF-kappaB signaling pathway components in human cervical cancer progression. *Gynecol Oncol*; 104 : 352-61.

Rees GS, Gee CK, Ward HL, Ball C, Tarrant GM, Poole S and Bristow AF (1999) Rat tumour necrosis factor-alpha: expression in recombinant *Pichia pastoris* purification, characterization and development of a novel ELISA. *Eur Cytokine Netw* 10:383–392.

Regan JA & Laimins LA (2008) Bap31 is a novel target of the human papillomavirus E5 protein. *J. Virol.* 82, 10042–10051.

Rinaldi M, Ria F, Parrella P, Signori E et al (2001) Antibodies elicited by naked DNA vaccination against the complementary-determining region 3 hypervariable region of immunoglobulin heavy chain idiotypic determinants of B lymphoproliferative disorders specifically react with patients' tumor cells. *Cancer Res* 61:1555–1562.

Roberts JN, Buck CB, Thompson CD, Kines R, Bernardo M, Choyke PL, Lowy, D.R. Schiller JT (2007) Genital transmission of HPV in a mouse model is potentiated by nonoxynol-9 and inhibited by carrageenan. *Nat. Med.* 13 (7), 857–861.

Rombaldi RL, Serafini EP, Mandelli J, Zimmermann E, Losquiavo KP (2009) Perinatal transmission of human papillomavirus DNA. *Virology*. Jun 21;6:83.

Roy P, Noad R (2008) Virus-like particles as a vaccine delivery system. *Human Vaccines*, 4: 5-12.

Sambrook, J, Fritsch EF (1989) Maniatis T “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”. Second Edition, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sandal T (2002) Molecular aspects of the mammalian cell cycle and cancer. *The Oncologist* 7:73-81.

Sapp M, Bienkowska-Haba M (2009) Viral entry mechanisms: human papillomavirus and a long journey from extracellular matrix to the nucleus. *FEBS J.* Dec;276(24):7206-16.

Schafer K, Muller M, Faath S, Henn A, Osen W, Zentgraf H (1999) Immune response to human papillomavirus 16L1E7 chimeric virus-like particles: induction of cytotoxic T cells and specific tumor protection. *Int J Cancer*, 81: 881-888

Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ & Howley PM (1990) The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 63, 1129–1136.

Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD & Howley PM (1993) The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 75, 495–505.

Scheurer ME, Tortolero-Luna G and Adler-Storthz K (2005) Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. *Int J Gynecol Cancer* 15:727-746.

Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S (2007) Human PV and cervical cancer. *Lancet* 370 (9590), 890–907.

Seo SH, Jin HT, Park SH, Youn JI, Sung YC (2009) Optimal induction of HPV DNA vaccine-induced CD8+ T cell responses and therapeutic antitumor effect by antigen engineering and electroporation. *Vaccine*. 25;27(42):5906-12.

Sheets EE, Urban RG, Crum CP, Hedley ML, Politch JA, Gold MA, Muderspach LI, Cole GA and Crowley-Nowick PA (2003) Immunotherapy of human cervical high-grade cervical intraepithelial neoplasia with microparticle-delivered human papillomavirus 16 E7 plasmid DNA. *Am J Obstet Gynecol*; 188: 916-926.

Silva JRSN. Construção de vetores para superexpressão da proteína L1 do HPV16 em *Pichia pastoris*. 2010. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo.

Sreekrishna K, Brankamp RG, Kropp KE, Blankenship DT, Tsay JT, Smith PL, et al (1997) Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene* 190: 55-62.

Sørensen HP (2010) Towards universal systems for recombinant gene expression *Microb Cell Fact*. 30;9:27.

Souto R, Falhari JPB & Cruz AD (2005) O papilomavírus Humano: um fator relacionado com a formação de neoplasias. *Rev Br Cancerol* 51 (2):155-160.

Stanley MA (2001) Human papillomavirus and cervical carcinogenesis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 15(5): 663-76.

Stanley M (2003) Genital human papillomavirus infection-current and prospective therapies. *J Natl Cancer Inst Monogr*;31 : 117-24.

Stanley M, Gissmann L, Nardelli-Haeffliger D (2008) Immunobiology of human papillomavirus infection and vaccination - implications for second generation vaccines. *Vaccine*. 19;26 Suppl 10:K62-7.

Stanley M (2006) Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine*. 30;24 Suppl 1:S16-22.

Stanley M, Lowy DR, Frazer I (2006) Prophylactic HPV vaccine: underlying mechanisms. *Vaccine* 24:106-13.

Stanley MA, Coleman N (2006) Interferon-beta treatment of cervical keratinocytes naturally infected with human PV 16 episomes promotes rapid reduction in episome numbers and emergence of latent integrants. *Carcinogenesis* 27 (11), 2341–2353.

Stanley MA, Pett MR, Coleman N (2007) HPV: from infection to cancer. *Biochem. Soc. Trans.* 35 (Pt 6), 1456–1460.

Stanley M (2010a) HPV - immune response to infection and vaccination. *Infect Agent Cancer*. Oct 20;5:19.

Stanley M (2010b) Potential mechanisms for HPV vaccine-induced long-term protection. *Gynecol Oncol*. Jun;118(1 Suppl):S2-7.

Steenbergen RDM, Wilde J, Wilting SM, Brink AATP, Snijders PJF and Meijer CJLM (2005) HPV-mediated transformation of the anogenital tract. *J Clin Virol* 32:25-33.

Sterling JC (2005) Human papillomaviruses and skin cancer. *J Clin Virol* 32:67-71.

Stoler MH, Wolinsky SM, Whitbeck A, Broker TR and Chow LT (1989) Differentiation-linked human papillomavirus types 6 and 11 transcription in genital condylomata revealed by in situ hybridization with message-specific RNA probes. *Virology* 172(1): 331–340.

Straight SW, Hinkle PM, Jewers RJ, McCance DJ (1993) The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 transforms fibroblasts and effects the downregulation of the epidermal growth factor receptor in keratinocytes. *Journal of Virology*;67:4521–32.

Straight SW, Herman B, McCance DJ (1995) The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 inhibits the acidification of endosomes in human keratinocytes. *Journal of Virology*;69:3185–92.

Storey A, Pim D, Murray A, Osborn K, Banks L and Crawford L (1988) Comparison of the in vitro transforming activities of human papillomavirus types. *Embo J* 7:1815-1820.

Sundaram P, Tigelaar RE e Brandsma JL (1997) Intracutaneous vaccination of rabbits with the cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) L1 gene protects against virus challenge. *Vaccine* 15:664-671.

Supryniewicz FA, Sparkowski J, Baega A, Schlegel R (2000) E5 oncoprotein mutants activate phosphoinositide 3-kinase independently of platelet-derived growth factor receptor activation. *J. Biol. Chem.* 275, 5111 – 5119.

Suzich JA, Ghim SJ, Palmer-Hill FJ, White WI, Tamura JK, Bell JA, Newsome JA, Jenson AB and Schlegel R (1995) Systemic immunization with papillomavirus L1 protein completely prevents the development of viral mucosal papillomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:11553–11557.

Syrjanen S (2005) Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *J Clin Virol* 32:59-66.

Teng D, Fan Y, Yang Y, Tian Z, et al. (2007) Codon optimization of *Bacillus licheniformis* β -1,3-1, 4-glucanase gene and its expression in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 74: 1074-1083.

Trieu EP, Gross JK, Targoff IN (2009) Immunoprecipitation-western blot for proteins of low abundance. *Methods Mol Biol* 536:259-75.

Trimble CL, Peng S, Kos F, Gravitt P, Viscidi R, Sugar E, Pardoll D and Wu TC (2009) A phase I trial of a human papillomavirus DNA vaccine for HPV16+ cervical intraepithelial neoplasia 2/3. *Clin Cancer Res*; 15: 361-367.

Tsao YP, Li LY, Tsai TC, Chen SL. Human papillomavirus type 11 and 16 E5 represses p21(Waf1/Sdi1/Cip1) gene expression in fibroblasts and keratinocytes (1996) *Journal of Virology*;70:7535–9.

Ueda Y, Enomoto T, Miyatake T, Ozaki K, Yoshizaki T, Kanao H, Ueno Y, Nakashima R, Shroyer KR, Murata Y (2003) Monoclonal expansion with integration of high-risk type human papillomavirus is an essential step for cervical carcinogenesis: association of clonal status and human papillomavirus infection with clinical outcome in cervical intraepithelial neoplasia. *Lab Invest*, 83:1517-1527.

Ulmer JB, Wahren B, Liu MA (2006) Gene-based vaccines: recent technical and clinical advances. *Trends in Molecular Medicine*, 12: 216-222.

Valle GF, Banks L (1995) The human papillomavirus (HPV)-6 and HPV-16 E5 proteins cooperate with HPV-16 E7 in the transformation of primary rodent cells. *The Journal of General Virology*;76(Pt 5):1239–45.

Valencik ML and McDonald JA. (2001) Codon optimization markedly improves doxycycline regulated gene expression in the mouse heart. *Transgenic Res*. 10: 269-275.

van Muyden RC, ter Harmsel BW, Smedts FM, Hermans J, Kuijpers JC, Raikhlin NT, Petrov S, Lebedev A, Ramaekers FC, Trimbos JB, Kleter B and Quint WG (1999) Detection and typing of human papillomavirus in cervical carcinomas in Russian women: a prognostic study. *Cancer* 85:2011–2016.

Venuti A, Salani D, Poggiali F, Manni V, Bagnato A (1998) The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 enhances endothelin-1-induced keratinocyte growth. *Virology*;248:1–5.

Varsani A, Williamson AL, Rose RC, Jaffer M, Rybicki EP (2003) Expression of Human papillomavirus type 16 major capsid protein in transgenic *Nicotiana tabacum* cv Xanthi. *Arch. Virol*. 148: 1771-1786.

Vassileva A, Chugh DA, Swaminathan S, Khanna N (2001) Effect of copy number on the expression levels of Hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein. Expres. Purif.* 21: 71-80.

Villa LL, Costa RL, Petta CA, Andrade RP, Ault KA, Giuliano AR, Wheeler CM, Koutsky LA, Malm C, Lehtinen M 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. *Lancet Oncol* 2005, 6:271-278.

Vousden K (1993) Interactions of human papillomavirus transforming proteins with the products of tumor suppressor genes. *The FASEB Journal* 7:872-879.

Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM, Bosh FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ and Munoz N (1999) Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 189:12-19.

Wang Y, Liang Z-H, Zhang Y-S, Yao S-Y, Xu Y-G, et al (2001) Human insulin from a precursor overexpressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and a simple procedure for purifying the expression product. *Biotech Bioeng*;73:74-9.

Wang QM, Sun SH, Hu ZL et al (2004) Epitope DNA vaccines against tuberculosis: spacers and ubiquitin modulates cellular immune responses elicited by epitope DNA vaccine. *Scand J Immunol* 60:219-225.

Waterham HR, Digan ME, Koutz PJ, Lair SV and Cregg JM (1997) Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. *Gene* 186:37-44.

Welters MJP, de Jong A, van den Eeden SJF, van der Hulst JM, Kwappenberg KMC, Kadish AS, Timmins P, Wang Y, Ho GY, Burk RD, Ketz J, He W, Romney SL, Johnson A, Angeletti R and Abadi M (2002) Regression of cervical intraepithelial neoplasia and loss of human papillomavirus (HPV) infection is associated with cell-mediated immune responses to an HPV type E7 peptide. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11:483-488.

Werness BA, Levine AJ and Howley PM (1990) Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 248:76-79.

WHO/ICO (2010) Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Cancers in World. Summary Report. [09/26/2011]. Available from <www.who.int/hpvcentre>

Woo YL, van den Hende M, Sterling JC, Coleman N, Crawford RA, Kwappenberg KM, et al (2010) A prospective study on the natural course of low-grade squamous intraepithelial lesions and the presence of HPV16 E2-, E6- and E7-specific T-cell responses. *Int J Cancer*, 126:133-141.

Woodman CB, Collins SI and Young LS (2007) The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 7(1):11-22.

Wolkers MC, Toebes M, Okabe M, Haanen JB, Schumacher TN (2002) Optimizing the efficacy of epitope-directed DNA vaccination. *J Immunol*. 168:4998-5004.

Woo MK, An JM, Kim JD, Park SN, Kim HJ (2008) Expression and purification of human papillomavirus 18 L1 virus-like particle from *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Pharm Res* 31:205-9.

Xi SZ, Banks LM (1991) Baculovirus expression of the human papillomavirus type 16 capsid proteins: detection of L1-L2 protein complexes. *J Gen Virol* 72: 2981-88.

Xu W, Chu Y, Zhang R, Xu H, Wang Y, Xiong S (2005) Endoplasmic reticulum targeting sequence enhances HBV-specific cytotoxic T lymphocytes induced by a CTL epitope-based DNA vaccine. *Virology* 334:255–263.

Zhang Y, Liu R, Wu X (2007) The proteolytic systems and heterologous proteins degradation in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Annals of Microbiol* 57: 553-560.

Zhou J, Sun XY, Stenzel DJ and Frazer IH (1991a) Expression of vaccinia recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles. *Virology* 185:251–257.

Zhou J, Doorbar J, Sun XY, Crawford LV, McLean CS, and Frazer IH (1991b) Identification of the nuclear localization signal of human papillomavirus type 16 L1 protein. *Virology*, 185:625-32.

Zhou J, Sun XY, and Frazer IH (1993) Glycosylation of human papillomavirus type 16 L1 protein. *Virology* 194: 210-8.

Zhou X, Qian X, Zhao Q, Lu Y, Xiong M (2004) Efficient expression of modified human papillomavirus 16 e6/e7 fusion protein and the antitumor efficacy in a mouse model. *Biol Pharm Bull.* Mar;27(3):303-7.

Zielinski GD, Snijders PJ, Rozendaal L, Daalmeijer NF, Risse EK, Voorhorst FJ, Jiwa NM, Linden HC, van der, Schipper FA de, Runsink AP, Meijer CJLM (2003) The presence of high-risk HPV combined with specific p53 and p16INK4a expression patterns points to high-risk HPV as the main causative agent for adenocarcinoma in situ and adenocarcinoma of the cervix. *J Pathol* 201:535–543.

Zur MJ, Chen MC, Doe B, Schaefer M, Greer CE, Selby M, Otten GR, and Barnett SW (2000) Increased expression and immunogenicity of sequence-modified human immunodeficiency virus type 1 gag gene. *J. Virol.* 74:2628–2635.

zur Hausen H (1999) Papillomaviruses in human cancers. *Proc Assoc Am Physicians*; 111 : 581-7.

zur Hausen H (2002) Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2:342-350.

10. ANEXO

10.1. Artigo Científico Publicado 1: *Brazilian Journal of Medical e Biological Research*

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

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

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

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

Abstract

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

Key words: Human papillomavirus; Cervical cancer; *Pichia pastoris*; L1

Introduction

Human papillomavirus (HPV) infection is the most common sexually transmitted disease in the world and is related to the etiology of cervical cancer. Approximately 500,000 new cases of cancer are diagnosed each year, with a mortality rate of 50% (1). Latin America, Sub-Saharan Africa and Asia (South and Southeast) are the regions with the highest incidence (2). Among more than 120 types, 16 and 18 are the most prevalent HPV types responsible for 70% of cervical cancer cases (3). However, the prevalence of HPV types found in cervical cancer shows geographical variations worldwide (4). In Brazil, HPV type 16 is also the most frequent, but there are regional variations regarding the second most frequent type. In the Northeast and Midwest, HPV types 31 and 33 have the higher incidence (5), while in

other regions such as the Southeast, HPV-18 is the second most frequent type among cervical cancer cases (6).

Studies indicate that vaccines based on virus-like particles (VLP), built with the L1 capsid protein, are more effective against infection because they induce high neutralizing antibody titers directed at conformational epitopes of this protein, which composes 90% of the capsid structure (7). VLP can be obtained through the production of HPV L1 protein in heterologous expression systems using mammalian cells (8), plants (9), bacteria (10), insect cells (11), and yeast (12).

The methylotrophic yeast *Pichia pastoris* is an efficient and inexpensive expression system used to produce high levels of heterologous proteins. More than 550 proteins

Correspondence: A.C. Freitas, LEMTE, Departamento de Genética, CCB, UFPE, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, 50670-901 Recife, PE, Brasil. E-mail: acf_ufpe@yahoo.com.br

Received June 6, 2011. Accepted October 10, 2011. Available online October 28, 2011. Published November 28, 2011.

10.2. Artigo Científico Publicado 2: *Journal of Clinical and Cellular Immunology*



Clinical & Cellular
Immunology

de Freitas et al., J Clin Cell Immunol 2012, S4
<http://dx.doi.org/10.4172/2155-9899.S4-004>

Review Article

Open Access

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

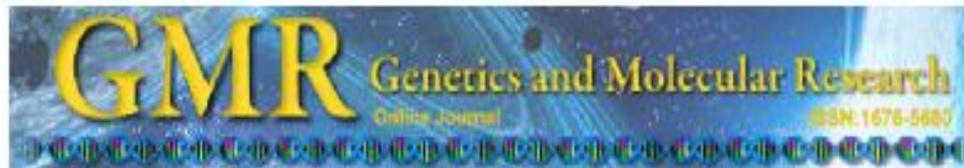
Antonio Carlos de Freitas*, Filipe Colaço Mariz, Eliane Campos Coimbra, Marcelo Nazário Cordeiro and André Luiz Santos de Jesus

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

Abstract

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

10.3. Artigo Científico Publicado 3: *Genetics and Molecular Research*



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

A.L.S. Jesus¹, F.C. Mariz¹, H.M. Souza¹, M.N. Cordeiro¹, E.C. Coimbra¹, M.C.G. Leitão¹, L.M. Nascimento², R.C. Stocco², W. Beçak² and A.C. Freitas¹

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

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

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

Corresponding author: A.C. Freitas

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

Genet. Mol. Res. (2012) Ahead of Print

Received

Accepted

Published

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

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

10.4. Artigo Científico Publicado 4: *Gynecologic Oncology*

Gynecologic Oncology 126 (2012) 304–311



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Gynecologic Oncology

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



Review

Susceptibility to cervical cancer: An overview

Antonio Carlos de Freitas ^{a,b,*}, Ana Pavla Almeida Diniz Gurgel ^{a,b}, Bárbara Simas Chagas ^a,
Eliane Campos Coimbra ^b, Carolina Maria Medeiros do Amaral ^a

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

^b Post-Graduation Program of Therapeutic Innovation, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 December 2011

Accepted 29 March 2012

Available online 4 April 2012

Keywords:

Human Papillomavirus (HPV)

Cervical cancer

Susceptibility to cervical cancer

ABSTRACT

Cervical cancer is the second most common cancer in females worldwide. It is well-established that Human Papillomavirus (HPV) infections play a critical role in the development of cervical cancer. However, a large number of women infected with oncogenic HPV types will never develop cervical cancer. Thus, there are several external environment and genetic factors involved in the progression of a precancerous lesion to invasive cancer. In this review article, we addressed possible susceptible phenotypes to cervical cancer, focusing on host genome and HPV DNA variability, multiple HPV infections, co-infection with other agents, circulating HPV DNA and lifestyle.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

Contents

| | |
|--|-----|
| Introduction | 304 |
| Cervical cancer epidemiology | 305 |
| HPV infection and cervical cancer | 305 |
| HPV infection | 305 |
| HPV infection in non-epithelial tissue | 306 |
| Susceptibility to cervical cancer | 306 |
| Genetic epidemiological evidences | 306 |
| Association studies with candidate gene | 307 |
| Lifestyle and co-infection in cervical cancer | 307 |
| HPV DNA variability | 307 |
| Intratype HPV-16 sequence variation | 308 |
| Intratype HPV-18 sequence variation | 308 |
| Intratype HPV-31 sequence variation | 308 |
| Intratype HPV-33 and HPV-58 sequence variation | 308 |
| Conclusions and perspectives | 309 |
| Conflict of interest statement | 309 |
| Acknowledgments | 309 |
| References | 309 |