

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

**EXPRESSÃO DO GENE L1 DE HPV-16 EM *Pichia pastoris*
EMPREGANDO PROMOTOR INDUZÍVEL P_{AOX1} E PROMOTOR
CONSTITUTIVO P_{PGK1} VISANDO DESENVOLVIMENTO DE UM
SISTEMA PARA PRODUÇÃO VACINAL**

Filipe Colaço Mariz

Recife/ Pernambuco

Fevereiro de 2012

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

Filipe Colaço Mariz

**EXPRESSÃO DO GENE L1 DE HPV-16 EM *Pichia pastoris*
EMPREGANDO PROMOTOR INDUZÍVEL P_{AOX1} E PROMOTOR
CONSTITUTIVO P_{PGK1} VISANDO DESENVOLVIMENTO DE UM
SISTEMA PARA PRODUÇÃO VACINAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre em Inovação Terapêutica.

Área de Concentração: Desenvolvimento Pré-clínico de Produtos Bioativos.

Orientador:

Prof. Dr Antonio Carlos de Freitas, Depto. De Genética, Centro de Ciências Biológicas, UFPE.

Recife/ Pernambuco

Fevereiro de 2012

Mariz, Filipe Colaço

Expressão do gene L1 de HPV-16 em *Pichia pastoris* empregando promotor induzível Paox1 e promotor constitutivo Ppgk1 visando desenvolvimento de um sistema para produção vacinal/ Filipe Colaço Mariz. – Recife: O Autor, 2012.

115 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Antonio Carlos de Freitas

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Inovação Terapêutica, 2012.

Inclui bibliografia e anexo

- 1. Papilomavírus humano 2. Genética molecular 3. Vacinas virais I. Freitas, Antonio Carlos de II. Título.**

599.276

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2012-121

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

PARECER DA COMISSÃO EXAMINADORA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

“EXPRESSÃO DO GENE L1 DE HPV-16 EM *Pichia pastoris*
EMPREGANDO PROMOTOR INDUZÍVEL P_{AOX1} E PROMOTOR
CONSTITUTIVO P_{PGK1} VISANDO DESENVOLVIMENTO DE UM
SISTEMA PARA PRODUÇÃO VACINAL”

por
Filipe Colaço Mariz

A comissão examinadora, composta pelos professores abaixo, sob a presidência do primeiro,
considera o candidato APROVADO

Recife/Pernambuco

29 de fevereiro de 2012.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas (Depto de Genética – UFPE)

Membro Externo: Prof. Dr. Fernando Araripe Gonçalves Torres (Centro de Biotecnologia – UnB)

Membro Externo: Prof. Dr. Paulo Lee Ho (Instituto Butantan)

Membro Interno: Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas (Depto de Genética – UFPE)

Coordenadora do Programa: Profa. Dra. Suely Lins Galdino

“É hora de a ciência brasileira assumir definitivamente um compromisso mais central perante toda a sociedade e oferecer o seu poder criativo e capacidade de inovação para erradicar a miséria, revolucionar a educação e construir uma sociedade justa e verdadeiramente inclusiva. É hora de agarrar com todas as forças a oportunidade de contribuir para a construção da nação que sonhamos um dia ter, mas que por muitas décadas pareceu escapar pelos vãos dos nossos dedos.”

Manifesto da Ciência Tropical – Miguel Nicolelis

“É sempre bom lembrar
Que um copo vazio
Está cheio de ar.

...

“É sempre bom lembrar
Guardar de cor
Que o ar vazio de um rosto sombrio
Está cheio de dor.”

Gilberto Gil

A minha mãe Waldêny, que por duas vezes
(ou mais) abriu mão de sonhos pela
realidade da família.

AGRADECIMENTOS

A Larissa, minha companheira de conquistas, pelo suporte familiar fundamental e precioso; a Haydée, pela alegria imensa e por me transformar a cada dia.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas, pela oportunidade, apoio e confiança sem iguais.

A Prof^a Dr^a Suely Lins Galdino, pela preciosa atenção, dedicação e estímulo profissional ao longo desse período.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro concedido.

Aos professores Dr. Fernando Araripe Gonçalves Torres (Centro de Biotecnologia/UnB) e Dr. Marcos Antonio de Moraes Junior (LABEM/LGM), pelas colaborações técnicas e sugestões na realização desse projeto.

A Eliane Coimbra e André de Jesus (GEMAP), pelo essencial suporte técnico e inestimável companheirismo durante o desenvolvimento do projeto.

Ao Prof. Osvaldo Pompílio de Melo Neto (Departamento de Microbiologia/CPqAM) e a Larissa (de novo) pela gentileza e importante colaboração durante os ensaios de imunodeteção.

A Fernanda Leite (LABEM), pelas incalculáveis colaborações de urgência.

Aos amigos do grupo (GEMAP), pelas valiosas contribuições corriqueiras e pelo prazeroso ambiente de trabalho.

Aos colegas do Grupo de Estudos Aplicados a Biologia Molecular de Tripanossomatídeos do CPqAM e a Dr^a Sílvia Boschi Bazan, pelas sugestões e discussões técnicas durante os imunoenaios

A Dona Zizi e Seu Romildo, funcionários do Departamento de Genética/UFPE, e Dona Yara, técnica do Departamento de Microbiologia/CPqAM, pela gentileza e significativo apoio durante o andamento deste trabalho.

A Paulo Germano, secretário do PPGIT, pela atenção e prestatividade.

A minha mãe e meus sogros, pelas orações e amparo.

LISTA DE FIGURAS

Página

Revisão de Literatura

Figura 1	Estrutura genômica do HPV-16.	21
Figura 2	Árvore filogenética da família <i>Papillomaviridae</i> .	22
Figura 3	Classificação do HPV quanto ao tropismo tecidual e potencial carcinogênico.	23
Figura 4	Diagrama esquemático da expressão gênica do HPV durante infecção produtiva.	24
Figura 5	Ilustração da evolução da lesão cervical pré-maligna a câncer invasivo.	25
Figura 6	Ilustração dos principais eventos envolvidos na progressão do câncer cervical.	27
Figura 7	Incidência mundial do câncer cervical.	28
Figura 8	A incidência do câncer cervical no Brasil e na América do Sul.	29
Figura 9	O capsídeo viral e a proteína L1	32
Figura 10	A proteína L1 e a estabilização do capsídeo viral.	34
Figura 11	Modelo da interação entre a proteína L2, pentâmeros de L1 e o DNA viral do HPV.	35
Figura 12	Modelo da infecção <i>in vivo</i> pelo papilomavírus.	36
Figura 13	Metabolização do metanol em <i>P. pastoris</i> .	41

Resultados

Figura 14	Representação esquemática da sequência do gene L1 sintético de HPV-16 e análises <i>in silico</i> .	71
Figura 15	Ilustração esquemática da estratégia de construção do cassete de expressão pPICZA α -L1H16.	73

Figura 16	Construção do cassete de expressão pPICZA α -L1H16.	74
Figura 17	Extração plasmidial dos cassetes de expressão pPICZA α -L1H16 e pPGK Δ 3-L1H16, linearização e purificação para eletroporação de <i>P. pastoris</i> .	76
Figura 18	Seleção e varredura dos clones de <i>P. pastoris</i> com múltiplas cópias do cassete de expressão pPICZA α -L1H16.	77
Figura 19	Seleção e varredura dos clones de <i>P. pastoris</i> com múltiplas cópias do cassete de expressão pPGK Δ 3-L1H16.	78
Figura 20	Varredura dos clones de <i>P. pastoris</i> com múltiplas cópias do cassete de expressão pPGK Δ 3-L1H16 por <i>Dot blotting</i> .	78
Figura 21	<i>Western blotting</i> dos sobrenadantes provenientes das mini induções com os clones de <i>P. pastoris</i> .	80
Figura 22	<i>Western blotting</i> dos sobrenadantes provenientes das induções em média escala com os clones de <i>P. pastoris</i> de ambos os sistemas, precipitados com TCA e acetona.	80
Figura 23	<i>Western blotting</i> das alíquotas de sobrenadantes coletadas durante a indução em maior escala dos clones de <i>P. pastoris</i> e precipitadas com TCA e acetona.	81
Figura 24	Análise por SDS-PAGE dos sobrenadantes provenientes das induções em maior escala.	82
Figura 25	Análise por SDS-PAGE e <i>Western blotting</i> das eluições da purificação com resina de afinidade.	83

LISTA DE TABELAS

	Página
Métodos	
Tabela 1	
Seqüências dos <i>primers</i> utilizados para amplificação do gene L1 de HPV-16.	59
Tabela 2	
Seqüências dos <i>primers</i> AOX1 e fator- α utilizados para confirmação da obtenção do cassete de expressão pPICZA α -L1H16.	61

LISTA DE ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
AOX	Álcool oxidase
<i>AOX1</i> e <i>AOX2</i>	Genes codificantes da enzima álcool oxidase isoformas 1 e 2
<i>ARG4</i>	Gene codificante da enzima arginosuccinato liase
BLAST	B asic L ocal A lignment S earch T ool
BPV	Papilomavírus bovino
COPV	Papilomavírus oral canino
CRPV	Papilomavírus do coelho <i>cottontail</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DO ₆₀₀	Densidade óptica a 600 nm
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
<i>FLD1</i>	Gene codificante da enzima formaldeído desidrogenase
<i>GAP</i>	Gene codificante da enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
HBsAg	H epatitis B A ntigen (Antígeno de superfície da hatite B)
<i>HIS4</i>	Gene codificante da enzima histidinol desidrogenase
HPV	Papilomavírus humano
kb	Kilobase
kDa	kilodalton
L1 e L2	Genes de expressão tardia

LCR	L ong R egion C ontrol (Longa região de controle)
MHC-I/II	M ajor H istocompatibility C omplex class I/II (Complexo de histocompatibilidade principal classe I/II)
Mut ⁺	M ethanol u tilization plus (Fenótipo quanto à utilização do metanol)
Mut ⁻	M ethanol u tilization minus (Fenótipo quanto à utilização do metanol)
Mut ^s	M ethanol u tilization slow (Fenótipo quanto à utilização de metanol)
NIC 1-3	Neoplasia Intraepitelial Cervical
ORF	O pen R eadin F rame (Quadro aberto de leitura)
pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato – salina
PCR	P ylmerase C hain R eaction (Reação em cadeia da polimerase)
<i>PEX8</i>	Gene codificante da proteína de matriz peroxissomal
PGK	3-fosfoglicerato quinase
<i>PGK1</i>	Gene codificante da enzima 3-fosfoglicerato quinase em <i>Pichia pastoris</i>
PMSF	P henyl m ethylsulphonyl fluoride
pRB	Proteína do retinoblastoma
PV	Papilomavírus
RNA	Ácido ribonucléico
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
SDS	Dodecil sulfato de sódio
<i>Sh ble</i>	Gene que confere resistência à droga Zeocina relacionada à bleomicina
TBS	Tampão tris-salina

TBST	Tampão tris-salina contendo Tween
URR	U pstream R egulatory R egion (Região regulatória)
VLPs	V irus- l ike p articles (Partículas semelhantes ao vírus)
cVLPs	<i>chimeric Virus-like particles</i> (Partículas semelhantes ao vírus quiméricas)
YNB	Y east N itrogen B ase
<i>YPT1</i>	Gene codificante de uma GTPase envolvida na secreção

RESUMO

Mariz, F.C. **Expressão do Gene L1 de HPV-16 em *Pichia pastoris* Empregando Promotor Indutível P_{AOX1} e Promotor Constitutivo P_{PGK1} Visando Desenvolvimento de um Sistema para Produção Vacinal.**

Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental (LEMTE), UFPE.

Laboratório de Genética de Microrganismos, Departamento de Genética, UFPE.

A infecção persistente por tipos oncogênicos de Papilomavírus Humano (HPV) é necessária para o desenvolvimento do câncer cervical e para uma grande porcentagem de outros tumores anogenitais e orofaríngeos. Desde que essas doenças têm como agente etiológico um vírus, a vacinação profilática representa uma intervenção barata, efetiva e logisticamente simples. A proteína L1 do capsídeo viral é capaz de arranjar-se em partículas morfologicamente e antigenicamente semelhantes ao vírus denominadas *Virus-like particles* (VLPs), abordagem esta utilizada pelas vacinas anti-HPV atualmente licenciadas. Apesar da eficácia comprovada, a implementação dessas vacinas é um desafio devido à desconhecida duração da proteção por elas conferida, o elevado custo atrelado e a possibilidade de outros tipos virais carcinogênicos emergirem. O sistema de expressão baseado em *Pichia pastoris* tem sido explorado para produção de VLPs de HPV, mas os níveis de expressão relatados têm sucesso variado e todos os trabalhos empregam vetores comerciais baseados no promotor induzível do gene *AOX1* (P_{AOX1}). No presente trabalho, avaliamos a produção extracelular da proteína L1 de HPV-16 em *P. pastoris*, mediante utilização dos sistemas baseados no promotor P_{AOX1} e no promotor constitutivo do gene *PGK1* (P_{PGK1}). Linhagens de *P. pastoris* recombinantes foram geradas mediante eletroporação com os cassetes de expressão pPICZA α -L1H16 e pPGK Δ 3-L1H16. Clones contendo múltiplas cópias de cada cassete foram selecionados por ensaios de resistência à ZeocinaTM e triados quanto aos níveis de expressão mediante *Colony blotting* e *Dot blotting*, utilizando anticorpo anti-L1 (CamVir[®]). Embora tenha se observado aparente degradação e glicosilação da proteína L1, os resultados obtidos por *Western blotting* a partir das induções em frasco revelaram que o sistema baseado no promotor P_{PGK1} apresentou maiores níveis de expressão do que àquele baseado no promotor P_{AOX1}. A tentativa de purificação da proteína L1 com resina de afinidade se mostrou insatisfatória, possivelmente devido à problemas conformacionais na cauda de poli-histidina. Esses resultados representam análises preliminares passíveis de otimização. Os eventos de glicosilação precisam ser confirmados por análises mais detalhadas. Metodologias alternativas para purificação das VLPs estão sendo avaliadas, bem como estratégias de cultivo para minimizar a proteólise de L1. O presente trabalho demonstra que o sistema não comercial baseado no promotor constitutivo do gene *PGK1* de *P. pastoris* representa uma atrativa plataforma para produção de VLPs de HPV com fins vacinais.

Palavras-chave: HPV-16, *Pichia pastoris*, *PGK1*, proteína L1, VLPs, vacina

ABSTRACT

Mariz, F.C. **Expression of HPV16 L1 Gene in *Pichia pastoris* Employing the Inducible Promoter P_{AOX1} and the Constitutive Promoter P_{PGK1} in Order to Develop a System for Vaccinal Purposes.**

Laboratory of Molecular Studies and Experimental Therapy (LEMTE), UFPE.

Laboratory of Genetics of Microorganisms (LGM), Department of Genetics, UFPE.

Persistent infection with oncogenic Human papillomavirus (HPV) types is a necessary cause of cervical cancer, as well as of a great percentage of other anogenital tumors and oropharyngeal tumors. Since the main etiologic factor for these disease is a virus, prophylactic vaccination offers a cheaper, logistically simpler, and more effective intervention than the current strategy of prevention. The L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles (VLPs), which are morphologically and immunogenically indistinguishable from native virions, and represent the basis of the currently licensed vaccines. Although the proven efficacy, the introduction of a vaccination program is a challenge due to high costs, unknown durability of the protection, and the potential for new oncogenic strains to emerge. The *Pichia pastoris* expression system have been explored for HPV VLP production, but variable levels of expression were reported and all of the works employed commercial vectors based on the inducible promoter of the *AOX1* gene (P_{AOX1}). In the present work, we evaluate the HPV-16 L1 extracellular gene expression in *P. pastoris*, through the *AOX1* promoter and the constitutive promoter of the gene *PGK1* (P_{PGK1}). The recombinant strains were obtained through electroporation with pPICZA α -L1H16 and pPGK Δ 3-L1H16 expression cassettes. Multi-copy *P. pastoris* clones selected by ZeocineTM resistance were screened by Colony blotting and Dot blotting with the monoclonal antibody anti-L1 (CamVir[®]). Although apparent L1 degradation and glycosylation were observed, the Western blotting assay showed that the *PGK1* promoter presents higher expression levels than the *AOX1* promoter after baffled flasks induction. Purification of L1 protein from supernatant culture with affinity resin was unsatisfactory, probably due to conformational problems in the poly-his tag. These data represent preliminary analysis, which are subject to optimization. Alternative methodologies are under investigation for VLPs purification, as well as cultivation techniques to minimize the L1 proteolysis. This system based on constitutive *PGK1* promoter of *P. pastoris* represents an attractive platform for HPV VLPs production for vaccinal purposes.

Keywords: HPV-16, *Pichia pastoris*, *PGK1*, L1 protein, VLPs, vaccine

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE ABREVIATURAS	
1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 O PAPILOMAVÍRUS HUMANO	20
2.1.1 Classificação e estrutura viral	20
2.1.2 Biologia molecular da infecção e a carcinogênese pelo HPV	23
2.1.3 Epidemiologia do câncer cervical	28
2.2 O CAPSÍDEO VIRAL: PROTEÍNA L1	32
2.3 VACINAS E VLPs	36
2.4 SISTEMAS HETERÓLOGOS DE EXPRESSÃO PARA PRODUÇÃO DE VLPs de HPV	38
2.5 <i>Pichia pastoris</i> COMO SISTEMA PARA PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS	39
2.5.1 Metabolismo do metanol: o promotor induzível P _{AOX1}	40
2.5.2 Promotores alternativos para expressão	43
2.5.3 Metabolismo da glicose: o promotor constitutivo P _{PGK1}	43
2.5.4 Vetores de expressão para <i>P. pastoris</i>	44
2.5.5 Múltiplas integrações do cassete de expressão em <i>P. pastoris</i>	46
2.5.6 Proteólise	47
2.5.7 Produção de proteínas recombinantes do HPV em <i>P. pastoris</i>	49
3 JUSTIFICATIVAS	51
4 OBJETIVOS	53
4.1 OBJETIVO GERAL	53
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	53
5 MATERIAL E MÉTODOS	54
5.1 MATERIAL	54
5.1.1 Linhagens de microrganismos	54
5.1.2 Plasmídios	54
5.1.3 Soluções e Tampões	55
5.1.4 Composição dos meios de cultura	55
5.1.5 Enzimas, kits e marcadores	56
5.2 MÉTODOS	57
5.2.1 Cultivo de microrganismos	57
5.2.2 Análise de DNA e proteínas por eletroforese	57
5.2.3 Imunoensaios	58
5.2.4 Desenho e síntese do gene L1 de HPV-16	59
5.2.5 Manipulação do plasmídio pBSK-L1H16 e obtenção do gene L1	60
5.2.6 Obtenção do vetor pPICZA α	60
5.2.7 Clonagem do gene L1 de HPV-16 em vetor pPICZA α	61
5.2.8 Transformação da levedura <i>P. pastoris</i> com as construções pPICZA α -L1H16 e pPGK Δ 3-L1H16	62
5.2.9 Seleção e varredura dos recombinantes de <i>P. pastoris</i> com múltiplas cópias	63
5.2.10 Análise da expressão da proteína L1: cultivo e indução dos recombinantes	64

em frascos	
5.2.11 Purificação da proteína L1	65
6 RESULTADOS	67
6.1 DESENHO E SÍNTESE DO GENE L1 DE HPV-16	67
6.2 CONSTRUÇÃO DO CASSETE DE EXPRESSÃO pPICZA α -L1H16	71
6.3 TRANSFORMAÇÃO DA LEVEDURA <i>P. pastoris</i> COM AS CONSTRUÇÕES pPICZA α -L1H16 E pPGK Δ 3-L1H16	75
6.4 SELEÇÃO E VARREDURA DOS RECOMBINANTES DE <i>P. pastoris</i> COM MÚLTIPLAS CÓPIAS	76
6.5 ANÁLISES DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA L1: CULTIVO E INDUÇÃO DOS RECOMBINANTES EM FRASCOS	79
6.6 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA L1	82
7 DISCUSSÃO	84
8 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	93
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
ANEXOS	110

1. INTRODUÇÃO

O câncer cervical, segundo tipo de câncer mais comum em mulheres, é um problema de saúde pública responsável pela morte de 274.000 mulheres por ano: 86% desses óbitos ocorrem nos países em desenvolvimento. Quando persistente, a infecção por tipos de HPV de alto risco é o fator mais importante para a indução do câncer cervical, além de relacionar-se também com inúmeros outros tipos de cânceres. O Brasil e, em especial, a cidade de Recife se destacam mundialmente tanto pelo grande número de casos diagnosticados quanto pela relevante variação na prevalência dos genótipos relatados. Dentre os HPV de alto risco, os genótipos 16 e 18 correspondem aos mais comumente associados ao câncer de colo uterino, contribuindo com aproximadamente 70% dos casos em todo mundo.

Apesar da gravidade e com exceção do câncer de pele, o câncer cervical é o tipo que apresenta maior potencial de prevenção e cura quando diagnosticado precocemente. Todavia, os programas de triagem nos países em desenvolvimento são ineficazes e, portanto, a vacinação profilática representa uma satisfatória alternativa para redução massiva da doença através da prevenção da infecção pelo HPV. Atualmente, duas vacinas baseadas em *Virus-like Particles* de HPVs estão disponíveis no mercado, oferecendo quase 100% de proteção contra os tipos 6, 11, 16 e 18. No entanto, o elevado custo dessas vacinas afeta diretamente a disponibilidade das mesmas através de programas de vacinação nos países em desenvolvimento. Além disso, essas vacinas não contemplam 30% dos demais HPVs de alto risco. É razoável, portanto, imaginar que a produção regional de vacinas contra o HPV poderia não somente diminuir os custos como também resolver os problemas de demanda regionais.

A expressão e purificação de VLPs de HPV-16 em *P. pastoris* foram demonstradas recentemente, mas todos os trabalhos exploram o potencial do promotor induzível P_{AOX1} . O promotor constitutivo P_{PGK1} de *P. pastoris* foi recentemente isolado e caracterizado por nossos colaboradores, demonstrando níveis de expressão superiores ao $AOX1$ mediante emprego de um vetor não comercial gerado.

No presente trabalho, relatamos a construção do gene L1 de HPV 16 sintético com códons otimizados para expressão em *P. pastoris* e a posterior clonagem deste em vetores integrativos pPICZ α e pPGK Δ 3. Os cassetes de expressão obtidos foram empregados para produção de linhagens recombinantes de *P. pastoris*, as quais foram inicialmente triadas para

seleção de clones contendo múltiplas cópias de cada cassete. Clones triados por *Colony blotting* e *Dot blotting* foram empregados em ensaios de produção da proteína recombinante L1 a partir de frasco. As análises por *Western blotting* evidenciaram a produção da proteína viral, mas o produto recombinante parece estar glicosilado. Embora análises mais detalhadas sejam necessárias, sugerimos que o sistema baseado no promotor constitutivo P_{PGK1} mostrou níveis de expressão superiores àquele do promotor induzível P_{AOX1}.

Estes resultados apontam o sistema baseado no promotor do gene *PGK1* de *Pichia pastoris* como uma atrativa plataforma biotecnológica para produção de VLPs de HPV, visando o desenvolvimento de abordagens vacinais que atendam as demandas regionais. Estudos para otimização da produção já estão sendo executados e tanto a obtenção das VLPs de HPV-16 quanto a funcionalidade imunológica das mesmas serão analisadas em breve.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O PAPILOMAVÍRUS HUMANO

Os papilomavírus estão dispersos entre os vertebrados e se diversificaram ao longo da história evolutiva desse grupo (GOTTSCHEIDT, 2007). São vírus etiológicamente relacionados ao desenvolvimento de lesões papilomatosas e tumores epiteliais (HOWLEY & LOWY, 2001) através da infecção do epitélio mucoso e cutâneo. Essas lesões hiperproliferativas são geralmente benignas e a infecção é normalmente eliminada pela resposta imune, a qual é direcionada contra antígenos virais. Contudo, ocasionalmente as lesões não regredem e, sob a ação de outros co-fatores apropriados, podem progredir para câncer (ZUR HAUSEN, 2002; O'BRIEN & CAMPO, 2002).

Nesse âmbito, destaca-se o poder oncogênico do Papilomavírus Humano (HPV), o qual tem sido associado a diversos tipos de cânceres e mais intimamente ao carcinoma cervical. Virtualmente, todos os casos de câncer cervical estão ligados à infecção genital pelo HPV e estima-se que mais de 50% das mulheres serão acometidas pela infecção pelo menos uma vez na vida (WHO, 2005; IARC, 2007).

2.1.1 Classificação e estrutura viral

O HPV é um vírus pertencente à família *Papillomaviridae* e composto por um capsídeo não envelopado e icosaédrico. Seu genoma de DNA dupla-fita circular com aproximadamente 8000 pb (DE VILLIERS *et al.*, 2004; SCHEURER *et al.*, 2005; ZUR HAUSEN, 1991) apresenta 8 ORFs (*Open Reading Frames* ou Quadro Aberto de Leitura) e é caracteristicamente dividido em 3 regiões (figura 1): a longa região de controle (LCR – *Long Control Region* ou URR – *Upstream Regulatory Region*), que corresponde de 7-11% do conteúdo e apresenta sequências reguladoras da transcrição e replicação viral; a região de expressão precoce E (*Early*), abrangendo 50% do genoma, que codifica proteínas envolvidas na transformação celular (E6, E7 e E5), na maturação viral e alteração da matriz celular (E4), bem como na replicação e transcrição do genoma viral (E1 e E2); a região de expressão tardia L (*Late*), que codifica duas proteínas estruturais L1 e L2 (FAVRE *et al.*, 1997).

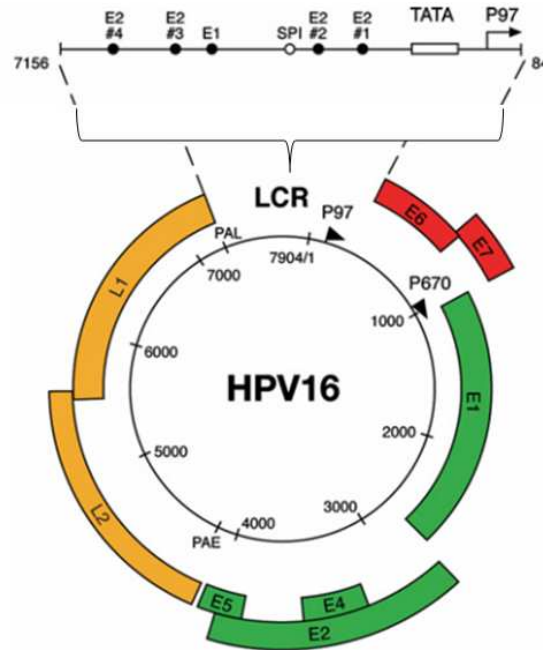


Figura 1. O genoma do HPV-16 (7904 pb) está demonstrado como um círculo preto, no qual os promotores precoce (p97) e tardio (p670) estão marcados por setas. As seis ORFs de expressão precoce estão representadas em verde e vermelho, enquanto as ORFs de expressão tardia estão em amarelo. A LCR (7156-7184 pb) foi destacada para visualização dos sítios de ligação à E1, E2 e à SP1, bem como o elemento TATA do promotor p97. Fonte: adaptado de Doorbar (2006).

Atualmente, cerca de 120 tipos de HPV foram descritos, com base nas sequências de nucleotídeos do gene L1 (figura 2) (BERNARD *et al.*, 2010). Além desta classificação filogenética, os tipos de HPV também podem ser adequadamente agrupados, de acordo com o tropismo tecidual, em cutâneos ou mucosotrópicos (SCHEURER *et al.*, 2005) ou ainda considerando seu potencial carcinogênico, sendo assim considerados de baixo, médio ou alto risco (figura 3) (STANLEY, 2001).

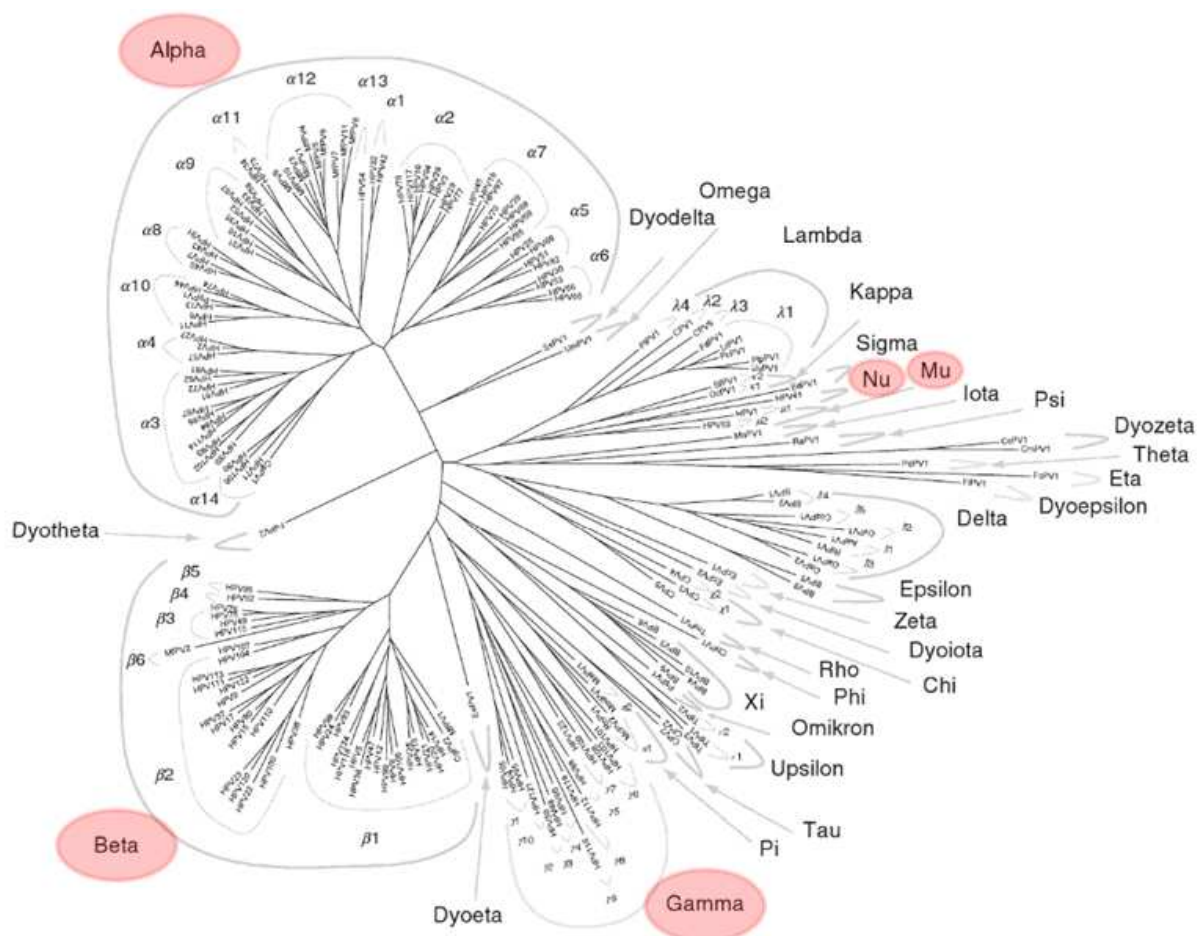


Figura 2. Árvore filogenética baseado nas sequências nucleotídicas do gene L1 de 189 papilomavírus. Os semicírculos externos identificam gêneros de Papilomavírus. Os Papilomavírus Humanos pertencem aos gêneros marcados em vermelhos. Fonte: adaptado de Bernard *et al* (2010).

Com base nas propriedades biológicas e patológicas, os tipos de HPV podem ser organizados ainda em gêneros e espécies. Os dois principais gêneros de HPV são o Alfa e o Beta (figura 2), nos quais se encontram aproximadamente 90% dos tipos atualmente caracterizados. Os tipos de HPV genitais pertencem ao gênero Alfa (MUÑOZ *et al.*, 2006), ao passo que aqueles pertencentes ao gênero Beta estão peculiarmente associados a infecções cutâneas não aparentes (embora nos indivíduos imunocomprometidos e nos pacientes com epidermodisplasia verruciforme hereditária, esses vírus possam estar associados ao desenvolvimento de câncer de pele) (HARWOOD & PROBY, 2002; PFISTER, 2003). Os demais HPV pertencem a três gêneros (Gama, Mu e Nu) (figura 2) e geralmente causam papilomas cutâneos que não apresentam caráter oncogênico (DE VILLIERS *et al.*, 2004).

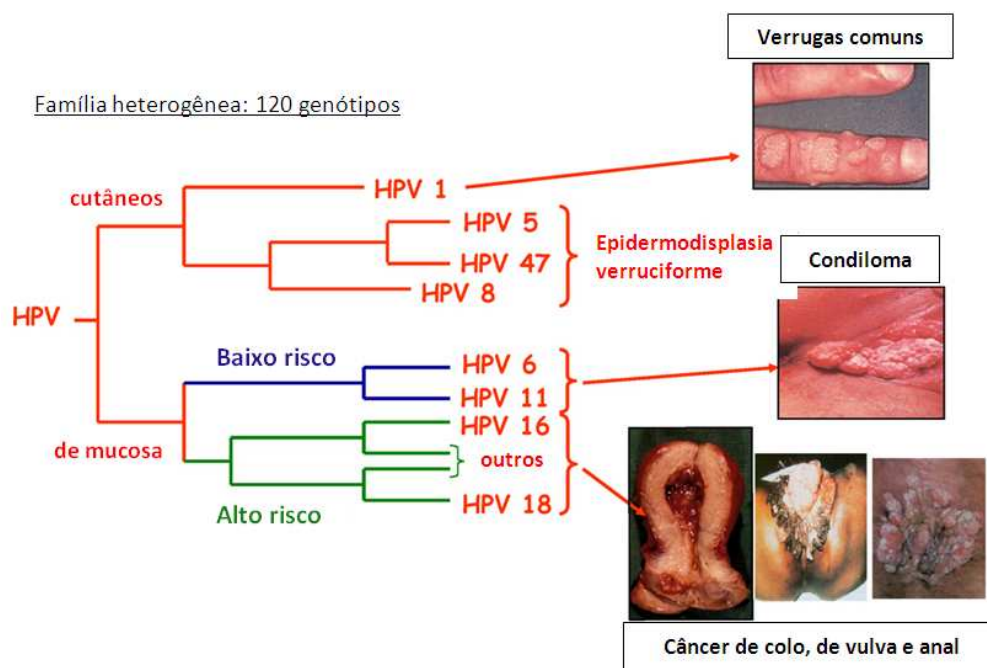


Figura 3. Ilustração da classificação dos Papilomavírus Humanos a partir do tropismo tecidual e do potencial carcinogênico. Fonte: adaptado de Denis *et al* (2008).

2.1.2 Biologia molecular da infecção e a carcinogênese pelo HPV

A correlação entre HPV e o desenvolvimento de neoplasias foi detectada, inicialmente, em cânceres do trato anogenital, incluindo cérvix, vulva, vagina, pênis e ânus (ZUR HAUSEN, 2002). Ademais, associam-se também ao HPV alguns tipos de cânceres não genitais, como de cabeça (SYRJANEN, 2005; WHO, 2010), laríngeo, esofágico, pulmonar (MAMMAS *et al.*, 2011; WHO, 2010) e de pele (STERLING, 2005).

O ciclo de infecção do PV é não lítico e está intrinsecamente relacionado aos estágios de diferenciação das células epiteliais do hospedeiro (figura 4) (O'BRIEN & CAMPO, 2002). A replicação viral ocorre nas camadas basais do epitélio escamoso estratificado da pele ou de membranas mucosas, nas quais os vírus têm acesso através de microlesões e/ou abrasões (WOODMAN *et al.*, 2007). Segundo o modelo atualmente proposto para a infecção *in vivo*, a ligação do PV à superfície das células epiteliais é precedida por eventos de interação com receptores e enzimas específicas da membrana basal exposta (DAY & SCHILLER, 2009; KINES *et al.*, 2009). Essas interações modificam conformacionalmente a partícula viral e permitem sua associação com receptores das células basais do epitélio (DAY & SCHILLER,

2009; KINES *et al.*, 2009). Uma vez no interior da célula hospedeira, a expressão dos genes virais ocorre através de um complexo padrão de eventos envolvendo o *splicing* de RNA precursor policistrônico até RNA maduro (YANG *et al.*, 1985; CAMPO *et al.*, 1994).

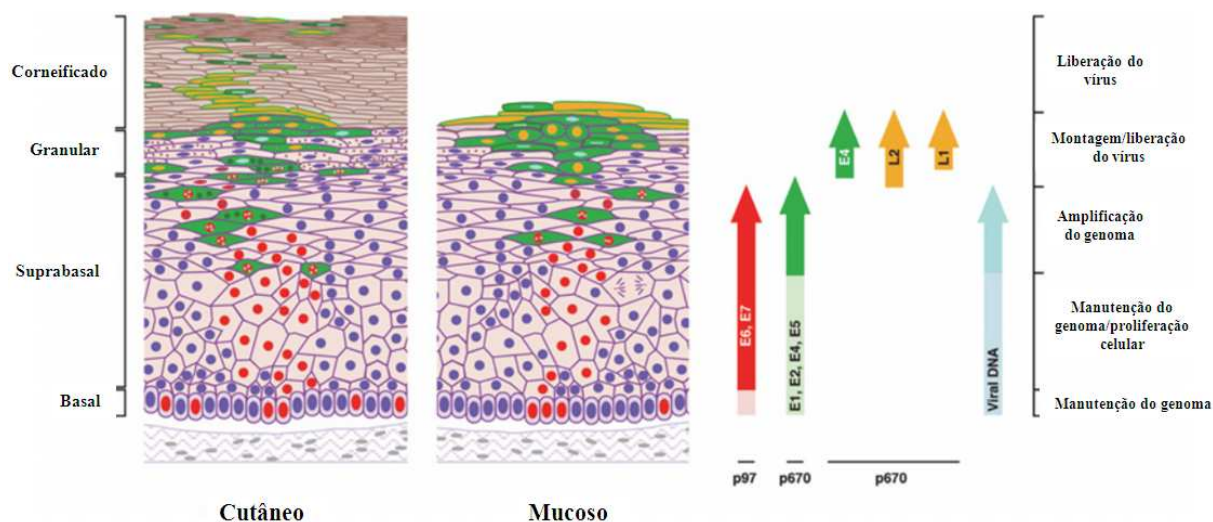


Figura 4. Diagrama esquemático da expressão gênica do HPV durante infecção produtiva. A epiderme é mostrada em cores, enquanto a derme está em cinza. As diferentes camadas celulares do epitélio estão indicadas à esquerda. Células da epiderme expressando marcadores de ciclo celular são destacadas com núcleos vermelhos. Essa caracterização presente nas células acima da camada basal é consequência da infecção viral e, em particular, da expressão dos oncogenes E6 e E7. A expressão das proteínas virais necessárias para replicação do genoma ocorre nas células expressando E6 e E7, após ativação do promotor p670 nas camadas mais superficiais do epitélio (células em verde com núcleo em vermelho). Os genes L1 e L2 (em amarelo) são expressos a partir de um subconjunto de células da camada superficial contendo o DNA viral amplificado. Fonte: adaptado de Doorbar (2006).

O primeiro estágio do ciclo viral na célula basal epitelial consiste, caracteristicamente, na estabilização do genoma do HPV na forma episomal (figura 5). Esse elemento extracromossômico é replicado de 50 a 100 vezes juntamente com o DNA hospedeiro e, posteriormente, tem-se início a expressão dos primeiros genes virais E1 (helicase) e E2 (figura 4). As proteínas então codificadas formam um complexo e se ligam à origem de replicação viral, recrutando a maquinaria celular necessária, como polimerase e proteínas acessórias (MOHR *et al.*, 1990; FRATTINI *et al.*, 1994; CONGER *et al.*, 1999). A proteína E2 funciona, ainda, como um fator de transcrição ativador ou inibidor dos demais genes E, e tem papel crítico na segregação do episomo viral nas células basais (DOORBAR, 2006).

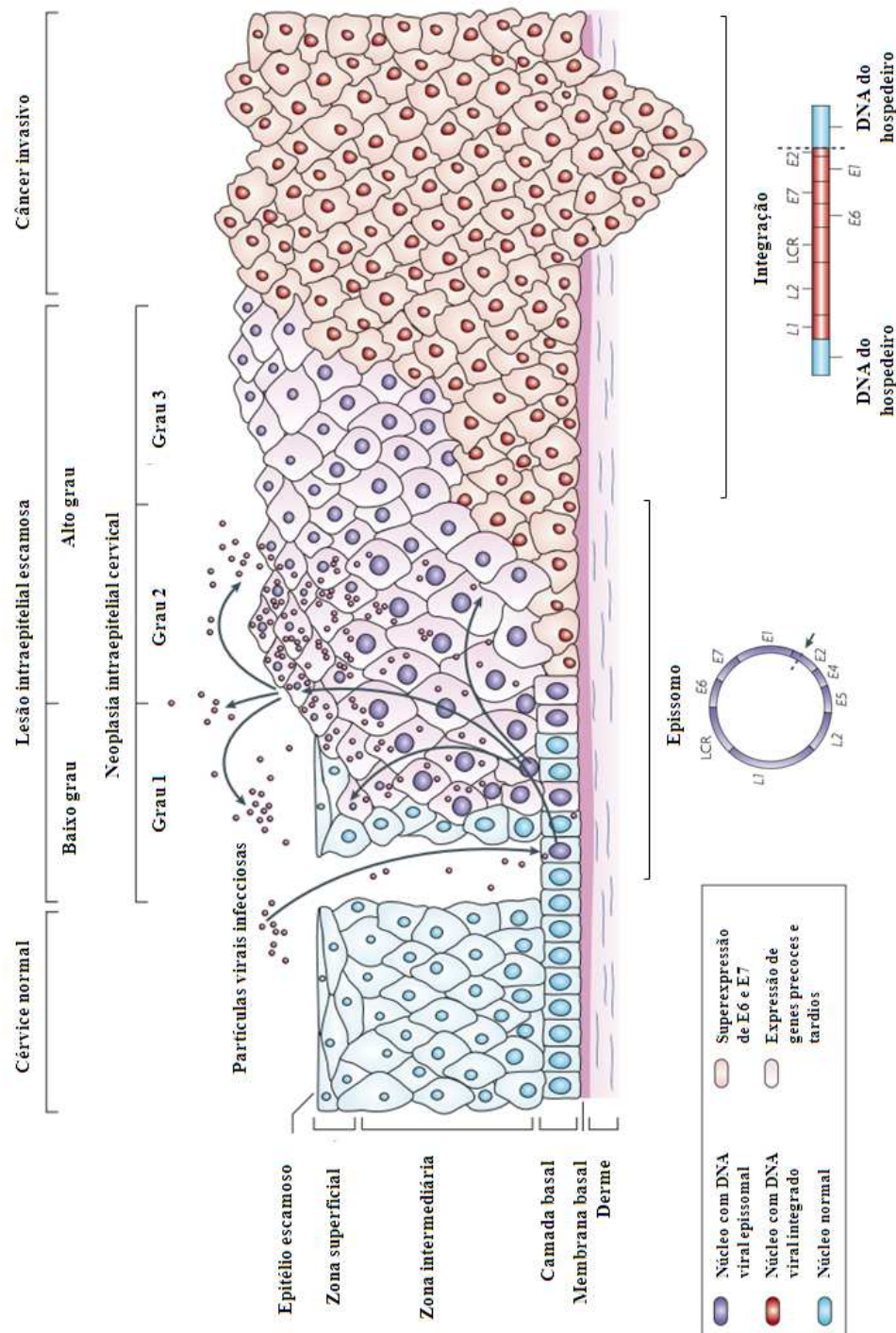


Figura 5. Ilustração dos principais eventos envolvidos na progressão do câncer cervical. O HPV tem acesso às células basais através de microlesões na cérvix epitelial. Após infecção, os genes precoces virais são expressos e o DNA viral se replica mediante sua forma episossomal (núcleos de cor púrpura). Nas camadas superficiais do epitélio (zonas intermediária e superficial) o genoma viral é ainda mais replicado, ocorrendo expressão dos genes tardios (L1 e L2) e a consequente formação de virions progenitores. As lesões intraepiteliais de baixo grau (NIC 1) suportam a replicação viral produtiva e essas partículas liberadas podem iniciar uma reinfeção. A infecção por tipos de HPV de alto risco progredem até lesões de alto grau (NIC 2 e 3). Essa progressão até cânceres invasivos está associada à integração do genoma viral ao cromossomo hospedeiro (núcleos celulares em vermelho), perda do gene E2 e subsequente desregulação dos oncogenes virais. Fonte: adaptado de Woodman *et al* (2007).

O segundo estágio do ciclo viral caracteriza-se pelo alto nível de expressão de proteínas não-estruturais (E4) e estruturais (L1 e L2), todas corroborando para a formação dos vírions e sua posterior liberação (figuras 4 e 5A). A proteína E4 atua nesse sentido ao promover o rompimento do citoesqueleto citoplasmático (DOORBAR, 2006) e facilitar o transporte das partículas virais. Neste momento, também, as células infectadas migram para as camadas mais superiores (sentido apical) do epitélio com a finalidade de acompanhar o programa de diferenciação dos queratinócitos, enquanto as células-filhas infectadas que permaneceram na camada basal se multiplicam e mantêm um reservatório de DNA viral (figura 4 e 6A) (MCCANCE, 2005).

Nas últimas duas décadas, as proteínas E6 e E7 foram extensivamente estudadas na carcinogênese cervical por apresentarem propriedades oncogênicas. A partir dessas investigações, foram propostos dois modelos de interações com proteínas supressoras de tumor, nos quais a proteína E6 interage com a proteína p53 e E7 se liga à proteína pRB, inativando e degradando tais supressores (STOREY *et al*, 1988; WERNESS *et al*, 1990). Uma vez que a proteína p53 não desempenhe sua função adequadamente, a célula tem sua capacidade de reparar danos no seu material genético comprometida, havendo aumento na frequência de rearranjos, mutações e aneuploidias (VOUSDEN, 1993). Por sua vez, a interferência na correta atuação da proteína pRB conduz ao estímulo inadequado da progressão do ciclo celular das células infectadas (SANDAL, 2002). Importante salientar, contudo, que esses dois mecanismos envolvendo as proteínas E6 e E7 são apenas a base geral para a investigação e compreensão de outros eventos implicados no desenvolvimento carcinogênico (SOUTHERN & HERRINGTON, 2000; TEWARI *et al*, 2000).

Em lesões cervicais de alto grau e câncer, o DNA episomal do HPV apresenta-se integrado ao cromossomo do hospedeiro devido à clivagem na região entre E1/E2, com consequente perda destes genes (figura 5) (MOTOYAMA *et al*, 2004). Isso resulta no descontrole da expressão dos oncogenes E6 e E7, uma vez que E2 atua inibindo a transcrição dos mesmos, e consequente malignização das células ou formação de tumor (BOSCH *et al*, 1992; DOORBAR, 2006).

De maneira semelhante, foi verificado que a oncoproteína E5 de HPV-16 tem capacidade de transformação por estar implicada na ativação de receptores, fatores transcricionais e vias de transdução de sinal relacionados ao crescimento, diferenciação e divisão celular. Outras evidências sugerem, também, a regulação negativa da expressão do

supressor de tumor p21, promovendo a proliferação celular (COFFER & KRUIJER, 1995; LEWIS *et al.*, 1998; TSAI & CHEN, 2003; TSAO *et al.*, 1996). Por outro lado, já foi relatado que em alguns casos de câncer cervical, observou-se a deleção do gene E5, sugerindo que seu papel não deva ser essencial para a manutenção da neoplasia maligna nas células infectadas. No entanto, a sua participação na transformação celular ocorre nos estágios iniciais da doença (DIMAIO & MATTON, 2001).

As lesões causadas em decorrência da infecção pelo HPV e consequente expressão de suas proteínas transformantes podem ser classificadas, seguindo critérios histológicos e com base no aspecto morfológico atípico e progressivo das células epiteliais, em neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC) do tipo 1, 2 e 3 (figura 6B e 6). A NIC-1 (ou displasia de baixo grau) é a manifestação mais comum e branda da infecção aguda pelo HPV, tendendo a regredir naturalmente no organismo. Uma pequena proporção de infecções resulta em NIC 2 e 3 (displasia de médio ou alto grau, respectivamente), as quais raramente apresentam caráter de regressão e, quando não tratadas, frequentemente progridem para câncer cervical (MOSCICKI *et al.*, 2006; BRYAN, 2007).

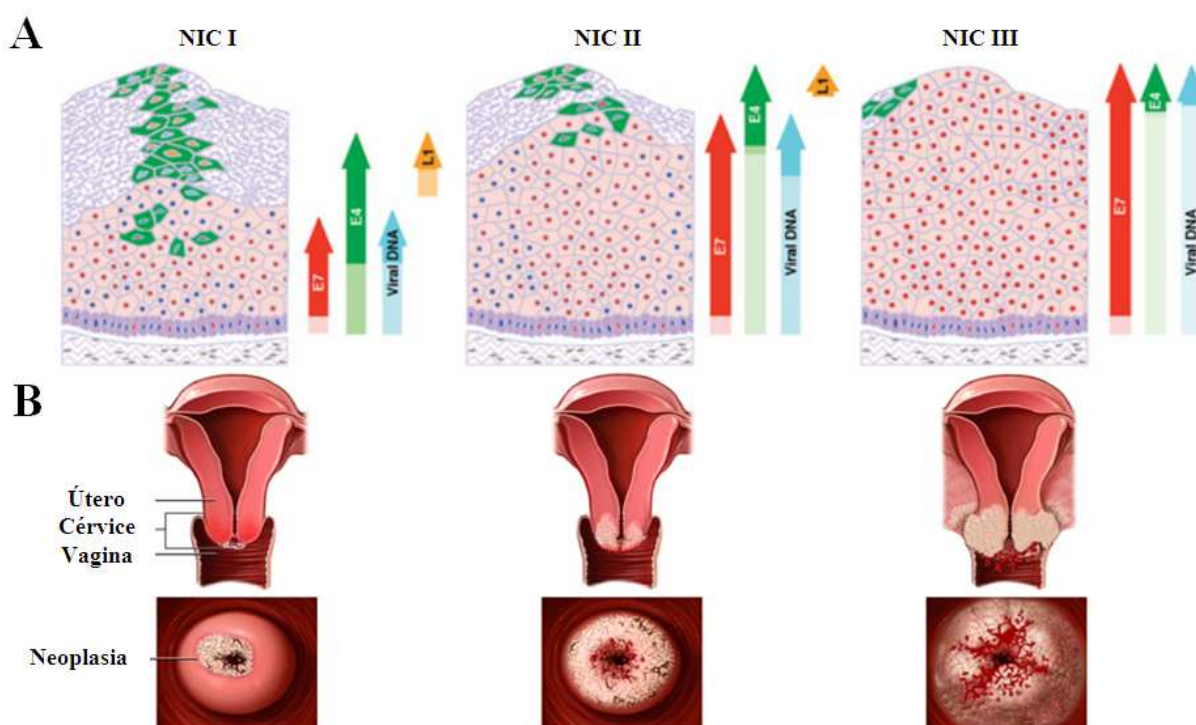


Figura 6. Ilustração da evolução da lesão cervical pré-maligna a câncer invasivo. (A) Mudanças nos padrões de expressão gênica viral que acompanham a progressão do câncer cervical: no estágio NIC 1, a ordem dos eventos é geralmente similar àquelas observadas nas lesões produtivas; nos estágios NIC 2 e 3, os eventos tardios são menos pronunciados, com a formação dos vírions infecciosos se tornando mais restrita às camadas superficiais; a integração do DNA viral ao genoma celular exacerba a superexpressão dos oncogenes virais e tanto os estágios

produtivos quanto o epissoma viral são perdidos. **(B)** Esquema do colo uterino durante os estágios da progressão até câncer cervical. Fonte: adaptado de Doorbar (2006) e NMA (2007).

2.1.3 Epidemiologia do câncer cervical

Embora a infecção pelo HPV esteja associada ao desenvolvimento de outras doenças, o câncer cervical é sem dúvida o mais grave acometimento deste vírus em termos de saúde pública. Todo ano, cerca de 500.000 mulheres desenvolvem câncer de cérvix uterina e 274.000 vão a óbito em decorrência dessa doença, configurando uma taxa de mortalidade de aproximadamente 55%. Mais de 80% desses óbitos ocorrem nos países em desenvolvimento, onde os programas de controle e prevenção do câncer cervical são ineficazes ou inexistentes (figura 7) (WHO, 2010).

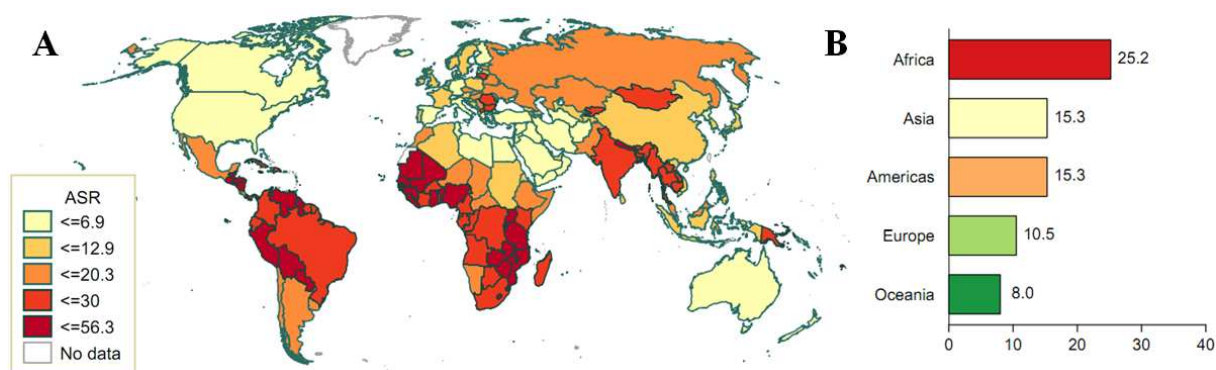
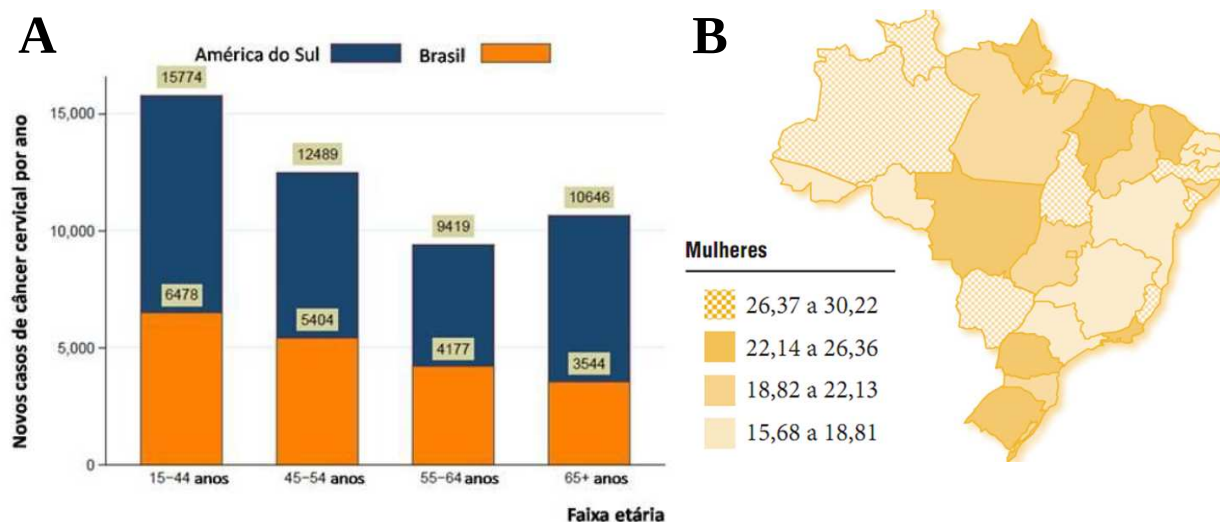


Figura 7. Incidência mundial do câncer cervical. **(A)** Taxa de incidência anual do câncer cervical (a cada 100,000 mulheres), padronizada por idade. **(B)** Taxa de incidência anual do câncer cervical por continente (a cada 100,000). Fonte: adaptado de WHO, 2010.

Mundialmente, o câncer de colo uterino afeta em torno de 1,4 milhões de mulheres, sendo observadas as maiores taxas de incidência na África e América Latina (figura 7), ao passo que a Índia apresenta o maior número de casos (20%) (WHO, 2010). Segundo dados do INCA (2009), a incidência de câncer cervical evidencia-se na faixa etária de 20-29 anos e o risco aumenta rapidamente até atingir seu pico, geralmente na faixa etária de 45-54 anos para os países desenvolvidos e de 55-64 anos para aqueles em desenvolvimento; nos países desenvolvidos, a sobrevida média estimada em cinco anos varia de 51% a 66%; nos países em

desenvolvimento, onde os casos são encontrados em estados relativamente avançados, a sobrevida média é menor, cerca de 40% após cinco anos; a média mundial é estimada em 49%.

Na América do Sul, o Brasil apresenta uma incidência de 24,5 casos de câncer cervical, sendo responsável por 51% dos 47.881 casos registrados em 2010 (figura 8A) (WHO, 2010). De acordo com o Ministério da Saúde/INCA e sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de colo uterino é o tipo de câncer mais incidente na Região Norte (23/100.000), o segundo nas Regiões Centro-Oeste (20/100.000) e Nordeste (18/100.000) e o terceiro nas Regiões Sul (21/100.000) e Sudeste (16/100.000) (INCA, 2009). No ano de 2007, os Estados de Mato Grosso, Goiás e Mato Grosso do Sul lideraram as estatísticas de incidência, ficando Pernambuco com a sexta maior taxa verificada; em 2008, as taxas de mortalidade mais elevadas foram registradas no Amazonas, Roraima e Maranhão (figura 8B) (INCA, 2009). Segundo estimativas do INCA para 2010, Pernambuco é o sexto estado brasileiro com maior número de novos casos de câncer cervical, ficando atrás apenas da Bahia na Região Nordeste. Durante a década de 1980, Recife relatou a maior taxa de incidência de câncer do colo uterino no mundo (83,2/100.000) (ALEIXO NETO, 1991). Embora essa taxa tenha diminuído substancialmente desde então, ainda se trata de uma das mais elevadas no Brasil (22,5/100.000) (INCA, 2009).



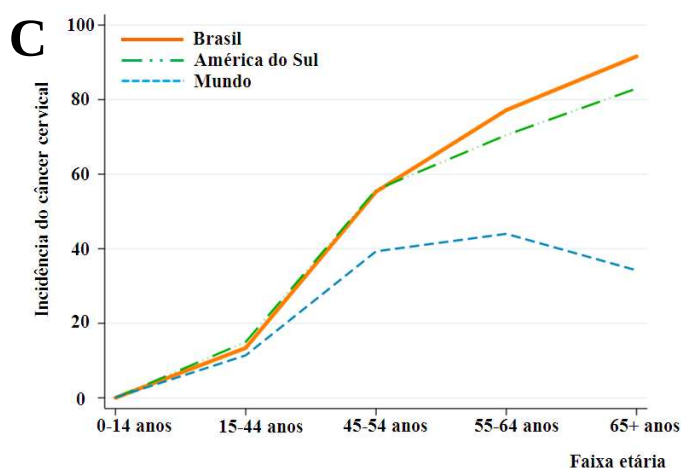


Figura 8. A incidência do câncer cervical no Brasil e na América do Sul. (A) Número de novos casos anuais de câncer cervical por idade na América do Sul e no Brasil. (B) Representação espacial das taxas brutas de incidência do câncer cervical (por 100 mil mulheres) no Brasil. (C) Taxa de incidência do câncer cervical no Brasil, comparada com aquelas estimadas para a América do Sul e para o Mundo. Fonte: adaptado de WHO (2010) e INCA (2009).

O principal fator de risco para o desenvolvimento de câncer cervical é a infecção persistente pelo HPV, segundo a OMS (WHO, 2010). Trata-se, portanto, do primeiro câncer associado a uma infecção (BOSCH *et al.*, 2002). No entanto, são necessários vários anos para que o câncer cervical se estabeleça a partir da infecção pelo HPV. O monitoramento da cérvix uterina e a remoção de lesões pré-malignas podem resultar na diminuição substancial da taxa de mortalidade notificada em todo mundo. Para isso, é necessário o estabelecimento de programas de triagem eficazes, o que não ocorre satisfatoriamente nos países em desenvolvimento (HANUMANTHA RAO *et al.*, 2011).

No Brasil, os programas de prevenção contra o câncer cervical estão vastamente disponibilizados e a cobertura auto-relatada do teste Papanicolau está geralmente adequada às condições. O declínio nas taxas de mortalidade por câncer de colo do útero, observado nas duas últimas décadas, ocorreu paralelamente com a melhoria nas práticas de triagem introduzidas na década de 1980 e refinadas desde 1998 (INCA, 2002). De 2003 a 2008, a taxa de frequência das mulheres com idade entre 25 e 59 anos, as quais reportaram a realização de pelo menos um teste Papanicolau nos últimos três anos, subiu de 25% para 84,6% (IBGE, 2010). Todavia, esses dados apresentam ampla variação de acordo com os níveis de renda. Ademais, nas áreas rurais das Regiões Norte e Nordeste, as taxas de mortalidade ainda estão aumentando. Infelizmente, de uma maneira geral a incidência do câncer cervical ainda é muito elevada no Brasil, com taxas próximas àsquelas mais elevadas, relatadas em países como Peru e algumas nações africanas (AYRES & AZEVEDO E SILVA, *in press*).

Os tipos de HPV de baixo risco mais frequentemente encontrados são o HPV-6 e o HPV-11, os quais contribuem com mais de 90% das verrugas genitais benignas (*condyloma*

acuminata) (MUÑOZ *et al.*, 2003). Apesar de não serem os únicos classificados como de alto risco, os HPV-16 e -18 são os maiores responsáveis pelo desenvolvimento de cânceres de mucosa. Somente o HPV-16 está relacionado a 50-60% dos casos de câncer cervical e, junto com o HPV-18, totalizam mais de 70% dos casos mundiais (SMITH *et al.*, 2007; CLIFFORD *et al.*, 2003; MUÑOZ *et al.*, 2003). Apenas na Indonésia o HPV-18 mostrou-se mais frequentemente associado ao câncer cervical do que o HPV-16 (SILVA *et al.*, 2006). Os tipos -31 e -45 contribuem com 4% cada, enquanto os demais tipos -33, -52 e -58 contribuem com 2% cada um (IARC, 2005).

O Brasil não apresenta dados estatísticos claros quanto à prevalência da infecção pelo HPV na população sexualmente ativa de diversos Estados e Regiões, nem dados demonstrativos sobre a vacinação. Entretanto, vários trabalhos confirmam a maior prevalência do HPV-16 em todas as regiões brasileiras e demonstram que o segundo genótipo mais importante difere de acordo com a região. Os HPV tipos -31 e -33 são mais encontrados que o tipo -18 nas regiões Nordeste e Centro-Oeste, enquanto nas regiões Norte, Sudeste e Sul, o HPV-18 mostra-se como o segundo mais prevalente (NORONHA *et al.*, 1999; LORENZATO *et al.*, 2000; BOSCH *et al.*, 1995; SILVA *et al.*, 2006; BALDEZ DA SILVA *et al.*, 2009).

Dados recentemente publicados pelo nosso grupo sugerem que, em Recife, além do HPV-31 (15,49%) apresentar uma incidência maior do que o HPV-18 (2,82%), o qual apresenta a mesma incidência do HPV-33, verificou-se, também, uma elevada percentagem de infecções simultâneas entre HPV-16/-31 (70,67%) e entre HPV-16/-33 (18,66%). Além disso, as mulheres infectadas pelo HPV-31 apresentaram lesões de alto grau com maior frequência quando comparadas com as lesões de baixo grau, ao contrário do que se observou nas mulheres infectadas por HPV-16. Por fim, evidenciou-se que, quando a infecção do HPV-16 combinava-se com a do HPV-31, as lesões tendiam a ser mais severas. Esses resultados provocam a discussão sobre a necessidade de se desenvolver programas de vacinação ajustados à prevalência viral de cada Região (BALDEZ DA SILVA *et al.*, 2009).

2.2 O CAPSÍDEO VIRAL: PROTEÍNA L1

O vírion de HPV apresenta morfologia e estrutura constantes, independente do sítio ou tipo da lesão. O vírus é constituído por um capsídeo icosaédrico não envelopado, com diâmetro entre 55 e 60 nanômetros (BAKER *et al.*, 1991; MODIS *et al.*, 2002; XU *et al.*, 2006). Por sua vez, este capsídeo é formado por 360 cópias da proteína L1 organizadas em 72 pentâmeros (ou capsômeros) e, provavelmente, 12 cópias da proteína L2 (figura 9). Dessa maneira, a proteína L1, que possui massa molecular entre 54 e 58 kDa e cerca de 500 aminoácidos (aa), compõe aproximadamente 90% do capsídeo viral, estando associada com a proteína L2, a qual tem massa molecular entre 68 e 76 kDa e 469 aa (DA SILVA *et al.*, 2001; BELNAP *et al.*, 1996; CHEN *et al.*, 2000).

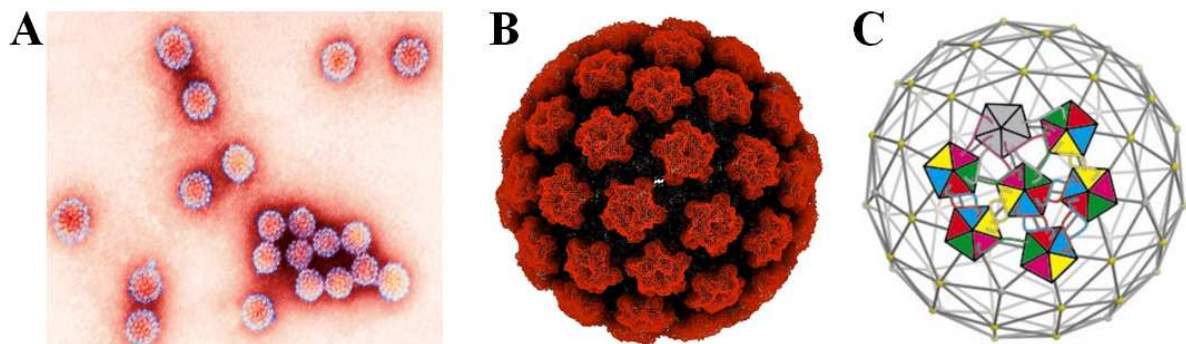


Figura 9. O capsídeo viral e a proteína L1: (A) Eletromicrografia de transmissão (TEM) colorida de virions do HPV; (B) Modelo atômico proposto para o capsídeo do HPV; (C) A formação e associação dos capsômeros estão destacadas através da coloração diferencial dos monômeros de L1. Fonte: adaptado de Sciencephotolibrary (2011) e Modis *et al* (2002).

Evidências bioquímicas sugerem que a estabilização do capsídeo viral é dependente de pontes dissulfeto (SAPP *et al.*, 1995; FLIGGE *et al.*, 2001; LI *et al.*, 1998; SAPP *et al.*, 1998). Segundo o modelo proposto por Modis *et al* (2002), as interações interpentaméricas ocorrem através da porção C-terminal de L1, que invade o pentâmero adjacente para efetivar a estabilização do capsídeo (figura 10B). Na estrutura cristalográfica da proteína L1 de quatro tipos de HPV (-11, -16, -18 e -35) proposta por Bishop *et al.* (2007), essa invasão ocorre em estruturas ocas formadas no centro de cada pentâmero.

Os monômeros de L1 contém 12 β -fitas, 6 loops e 5 α -hélices (h1-h5) (XU *et al.*, 2006) (figura 10A). As α -hélices h2, h3 e h5, dispostas próximas à porção C-terminal, são

fundamentais para o dobramento de L1 e consequente formação do pentâmero, enquanto h4 (também disposta próxima à região C-terminal) é imprescindível para montagem do capsídeo viral devido a sua atuação na interação entre os pentâmeros adjacentes (figura 10C) (Bishop *et al.*, 2007). Os *loops* da proteína L1, por sua vez, estendem-se em direção à superfície externa do capsídeo e suas sequências são muito variáveis entre os diferentes tipos de papilomavírus (CHEN *et al.*, 2000).

Particularmente para o HPV, estudos de mutagênese dos domínios de *loops* hipervariáveis em HPV-11 (LUDMERER *et al.*, 2000) e HPV-6 (MCCLEMENTS *et al.*, 2001) revelaram que vários epitopos neutralizantes estão localizado nessa região (XU *et al.*, 2006). Embora os arranjos desses *loops* sejam similares entre quatro tipos de HPV (-11, -16, -18 e -35), uma diferença estrutural mínima no *loop* de um epitopo é suficiente para romper a ligação anticorpo-epitopo (BISHOP *et al.*, 2007). Assim, apesar da grande homologia na sequência da proteína L1 entre os diferentes tipos de HPV e a conservação geral dos pentâmeros, detalhes estruturais do *loop* na superfície pentamérica são amplamente diferentes devido às mudanças na composição aminoacídica, as quais não apenas modificam sua composição como também alteram a antigenicidade da superfície viral. Essas são, portanto, as bases moleculares para a especificidade dos anticorpos neutralizantes para o HPV.

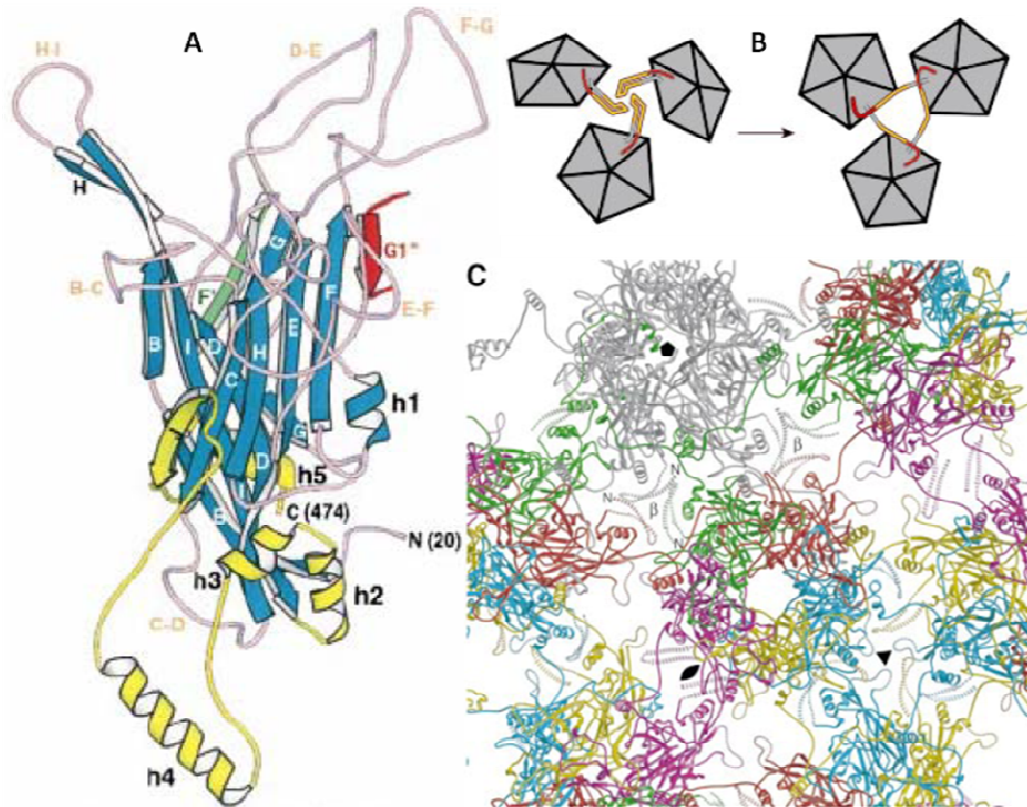


Figura 10. A proteína L1 e a estabilização do capsídeo viral: (A) O monômero de L1. Os elementos estruturais secundários estão marcados, onde as letras B-J correspondem as β -fitas e as designações h1-h5 correspondem as cinco α -hélices. Os loops entre as β -fitas são indicados pela designação B-C, C-D, etc. (B) Representação esquemática do rearranjo conformacional necessário para que a porção C-terminal de L1 invada o pentâmero adjacente para efetivar a estabilização do capsídeo através de pontes dissulfeto; (C) Ilustração das interações intercapsôméricas na superfície do capsídeo viral, a partir do modelo proposto por Modis *et al* (2002). No centro, é possível visualizar um pentâmero no qual cada monômero de L1 está pintado de uma cor diferente para demonstrar o entrelaçamento dos loops da superfície entre os vários pentâmeros. Fonte: adaptado de Modis *et al* (2002) e Chen *et al* (2000).

Apesar de ser encontrada em menor quantidade, a proteína L2 desempenha papel fundamental para a morfogênese viral e para o estabelecimento da infecção pelo papilomavírus (FAY *et al.*, 2004; RODEN *et al.*, 1996). Além de se ligar ao DNA do vírus, favorecendo o encapsidamento do seu genoma durante a fase produtiva, a proteína L2 é essencial para a infecção viral após a ligação do vírion à superfície celular, bem como para o carregamento do DNA viral até o interior do núcleo celular durante a fase inicial de infecção. Sendo assim, L2 atua como um adaptador entre o DNA do papilomavírus e a maquinaria celular responsável pelo transporte até o núcleo (FAY *et al.*, 2004).

Os estudos de Liu e colaboradores (1997) demonstraram que os primeiros 60 aa de L2 são altamente conservados e localizam-se dentro do capsídeo formado por L1, ligando-se ao

DNA viral; os 63 aa seguintes (do aa 61 ao aa 123) estão expostos na superfície do vírus e esta sequência é menos conservada entre os diferentes papilomavírus, ditando a neutralização específica por anticorpos; a porção C-terminal restante localiza-se internamente, sem função reconhecida até o momento (figura 11). Para que o encapsidamento do material genético viral ocorra pela ação da proteína L2, as histonas celulares condensam o genoma DNA circular dupla-hélice como um minicromossomo (HOWLEY, 1996; MODIS *et al.*, 2002).

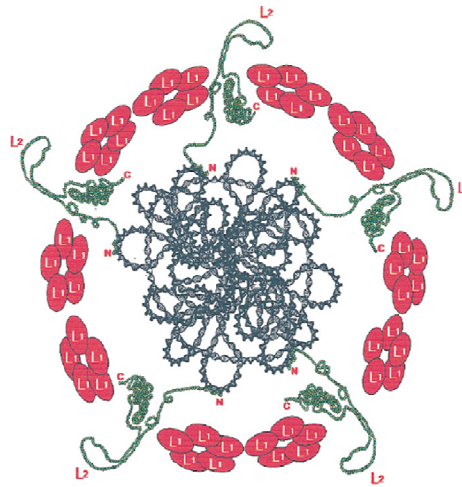


Figura 11. Modelo da interação entre a proteína L2, pentâmeros de L1 e o DNA viral do HPV. As proteínas L1 e L2 estão indicadas nas cores vermelhas e verde, respectivamente, enquanto o DNA está localizado no centro da estrutura esquematizada. Fonte: Liu *et al* (1997).

Além da reconhecida função estrutural, a contribuição de L1 e L2 para a infecção foi recentemente investigada e revisada (DAY & SCHILLER, 2009; KINES *et al.*, 2009). Os estudos desenvolvidos em modelos animais por Kines e colaboradores (2009) revelaram que a ligação dos vírions à superfície das células epiteliais depende de uma interação inicial com a membrana basal exposta por microlesões. Após se ligarem a proteoglicanos de heparan sulfato na membrana basal, a conformação estrutural do capsídeo viral é modificada e expõe sítios de clivagem para furina (um modelo de próproteína convertase). Uma vez ocorrendo a clivagem, os epitopos de neutralização cruzada de L2 são expostos e uma nova mudança conformacional acontece no capsídeo viral, permitindo que o vírion seja transferido para receptores de outros tipos presentes nas células epiteliais. Essa transferência provavelmente

ocorre durante a migração das células epiteliais sobre a membrana basal para cicatrizar a microlesão (DAY & SCHILLER, 2009; KINES *et al.*, 2009).

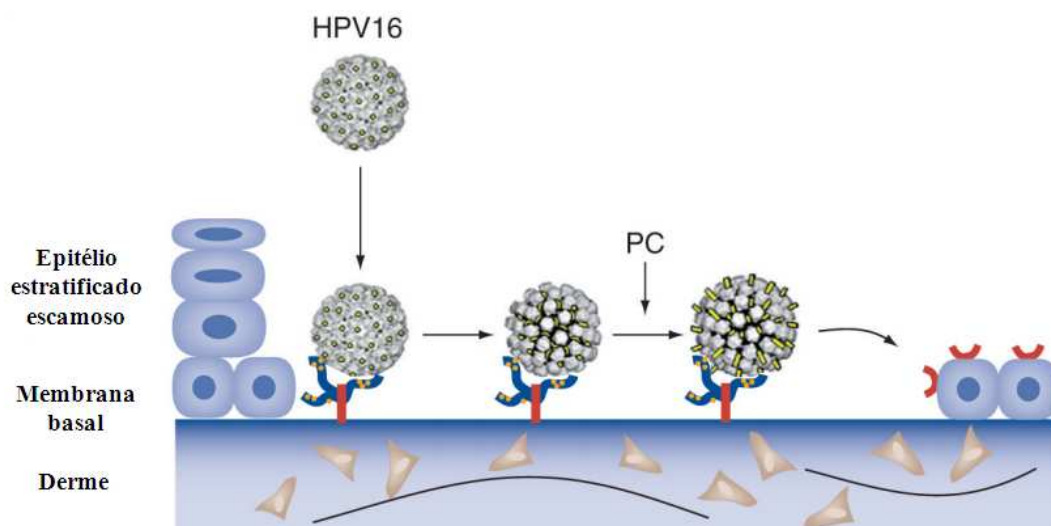


Figura 12. Modelo da infecção *in vivo* pelo papilomavírus. O vírion interage inicialmente com proteoglicanos de heparan sulfato presentes na membrana basal exposta do epitélio. Essa interação causa uma mudança conformacional no capsídeo viral e expõe sítios de clivagem para furina, (ou outra proproteína convertase). Nova mudança conformacional ocorre com a clivagem, expondo epitopos de neutralização cruzada de L2 e permitindo a interação do vírion com a superfície das células epiteliais. PC: proproteína convertase. Adaptado de Day & Schiller (2009).

2.3 VACINAS E VLPs

Variados estudos baseados em modelos animais demonstraram que a imunidade humoral exerce papel central na proteção contra o papilomavírus (BREITBURD *et al.*, 1995; KIRNBAUER, 1996). Essa resposta é resultado da produção de anticorpos neutralizantes dirigidos contra epitopos conformacionais da proteína L1 (DILLNER, 1999) e somente é estimulada quando a referida proteína capsidial adquire sua forma terciária ou nativa, estruturada como um multímero (DILLNER, 1999; STANLEY, 2006).

O desenvolvimento de vacinas contra o HPV mediante técnicas convencionais, como a geração de partículas virais inativadas ou atenuadas, é atualmente inviável devido à complexidade em mimetizar a diferenciação do epitélio estratificado em cultura de células (STANLEY, 2001), o que dificulta o estabelecimento de um sistema em laboratório para propagação de partículas virais em larga escala (DA SILVA *et al.*, 2001). Todavia, as técnicas

de engenharia genética desenvolvidas nas últimas décadas são capazes de contornar esse problema através da produção de subunidades virais recombinantes (MUÑOZ *et al.*, 2004).

Diferentes estratégias para o desenvolvimento de vacinas contra o papilomavírus têm sido investigadas por vários centros de pesquisas. Uma das abordagens biotecnológicas mais atrativas é a produção de partículas semelhantes ao vírus (*Virus-like Particles*, VLPs) a partir de sistemas heterólogos de expressão. As VLPs foram extensivamente descritas em células infectadas pelo vírus da hepatite B, o qual é capaz de produzir partículas vazias compostas apenas pelo antígeno de superfície (HBsAg) (BAYER *et al.*, 1968). Embora não apresentem material genético viral, essas partículas são capazes de penetrar no interior das células alvo e acredita-se que sejam liberadas das células infectadas para induzir uma resposta imunológica no hospedeiro. As VLPs não são infecciosas ou oncogênicas, já que não possuem DNA viral, e por serem morfolologicamente indistinguíveis das partículas virais nativas, induzem a produção de altos níveis de anticorpos neutralizantes sistêmicos e de mucosa (LIU *et al.*, 1998), podendo ser empregadas como agentes imunizantes. Desde que Bayer *et al* (1968) isolaram e caracterizaram essas partículas pela primeira vez, o conhecimento rápido e crescente de suas estrutura e funções, combinado com as potencialidades da engenharia genética, demonstrou múltiplas oportunidades para a exploração das VLPs em diferentes campos da biologia molecular (LUDWIG & WAGNER, 2007). Dentre elas estão, por exemplo, as VLPs quiméricas (cVLPs) que combinam tanto efeitos profiláticos quanto terapêuticos (DA SILVA *et al.*, 2001).

Kirnbauer *et al* (1992) demonstraram que pentâmeros de L1 tinham a propriedade intrínseca de se auto montarem em VLPs, as quais eram imunogenicamente semelhantes às partículas virais. A eficiência das VLPs na indução da resposta imune e prevenção da infecção por papilomavírus foi primeiramente avaliada em modelos animais, como cachorro, coelho e bovino – COPV (Papilomavírus oral canino, *Canine oral Papillomavirus*), CRPV (Papilomavírus do coelho *cottontail*, *Cottontail Rabit Papillomavírus*) e BPV -4 (Papilomavírus Bovino tipo 4, *Bovine Papillomavirus type 4*), respectivamente (CAMPO, 2002). Quase 15 anos depois dos trabalhos de Kirnbauer *et al* (1992), em 2006 a primeira vacina profilática quadrivalente contra os HPV-6, -11, -16 e -18 (GargasilTM), desenvolvida pela Merck Pharmaceuticals, foi aprovada pelo FDA (*Food and Drug Administration*) (MERCK & CO, 2006). No ano seguinte, outra vacina profilática, dessa vez bivalente contra os HPV-16 e -18 (CervarixTM), produzida pela GlaxoSmithKline Biologicals também foi

aprovada pelo FDA (GLAXOSMITHKLINE, 2007). Ambas as vacinas, compostas por VLPs da proteína L1, são administradas intramuscularmente, resultando em rápido acesso aos linfonodos locais e evitando, assim, as estratégias de fuga do sistema imune que ocorrem durante o ciclo infeccioso intraepitelial. Além disso, as VLPs são altamente imunogênicas, ativando respostas imunes inatas e adaptativas (KARANAM *et al.*, 2009), e possuem efeitos auto-adjuvantes devido ao fato de serem facilmente fagocitadas pelas células dendríticas e processadas para apresentação pelo MHC (Complexo Maior de Histocompatibilidade) de classe II (FIFIS *et al.*, 2004; GAMVRELLIS *et al.*, 2004).

Embora a liberação dessas vacinas profiláticas no mercado represente grande avanço nas estratégias de proteção contra o câncer de colo uterino, o custo proibitivo das mesmas (R\$ 300 a dose, sendo necessárias três doses) impede sua introdução nos programas de vacinação em massa dos países em desenvolvimento, os maiores afetados por essa doença (PATH, 2007; HAKIM & DINH, 2009). Considerando ainda que ambas as vacinas não contemplem outros tipos virais carcinogênicos, responsáveis por cerca de 30% dos casos de câncer cervical, várias tentativas têm sido realizadas no intuito de estabelecer outras plataformas biotecnológicas para produção de VLPs de HPV (HANUMANTHA RAO *et al.*, 2011).

2.4 SISTEMAS HETERÓLOGOS DE EXPRESSÃO PARA PRODUÇÃO DE VLPs DE HPV

A demanda global por proteínas recombinantes tem se acelerado continuamente nas últimas duas décadas. Essas proteínas recombinantes estão relacionadas a uma grande abrangência de aplicações, incluindo vacinas e medicamentos para animais e seres humanos, enzimas industriais e componentes de nanopartículas para diversas aplicações (LICO *et al.*, 2008). Considerando o grande valor comercial atrelado a cada uma delas, a escolha de um sistema de expressão adequado, capaz de produzi-la eficientemente a um baixo custo, torna-se primordial (MACAULEY-PATRICK *et al.*, 2005).

A vacina preventiva bivalente emprega células de inseto (*Trichoplusia ni* Hi5 infectadas com baculovírus recombinante) para produção de VLPs de HPV, enquanto a vacina quadrivalente utiliza a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (HANUMANTHA RAO *et al.*, 2011). Outros sistemas têm sido ou foram empregados para geração de VLPs, os quais envolvem células de mamíferos (NAKAUCHI *et al.*, 2008), plantas (VARSANI *et al.*, 2003;

SANTI *et al.*, 2006), células bacterianas (HOU *et al.*, 2009; AIRES *et al.*, 2006) e insetos (ZHOU *et al.*, 1991; KIRNBAUER *et al.*, 1993, 1996). Cada um desses sistemas apresenta potencialidades particulares no que tange as estratégias de obtenção e de administração vacinal.

Dentre as várias opções disponíveis, sistemas heterólogos que empregam leveduras e bactérias são reconhecidamente os mais explorados e bem caracterizados. Embora as duas alternativas ofereçam a melhor relação custo-benefício por atingirem altas densidades celulares em meios de cultura baratos, a grande vantagem das leveduras sobre as bactérias é a sua capacidade de realizar muitas das modificações pós-traducionais tipicamente associadas a eucariotos superiores e necessárias para a atividade biológica de muitas proteínas. Estas modificações incluem o processamento de sequências sinais, enovelamento, formação de pontes dissulfeto, certos tipos de adição de lipídios e glicosilações (MACAULEY-PATRICK *et al.*, 2005). Além disso, leveduras não são pirogênicas e possuem genomas comparativamente menores do que os de mamíferos, o que simplifica as análises moleculares e genéticas. Nos últimos 15 anos, a levedura *Pichia pastoris* foi extensivamente utilizada para produção de proteínas de interesse acadêmico e biotecnológico, configurando atualmente como o segundo sistema de expressão mais empregado após a bactéria *Escherichia coli*, a qual já vem sendo explorada a cerca de quatro décadas (COHEN *et al.*, 1973). Enquanto o uso de *P. pastoris* aumentou de 4% para 17% entre 1995-2009, o uso de *E. coli* permaneceu constante neste mesmo período (SØRENSEN, 2010).

2.5 *Pichia pastoris* COMO SISTEMA PARA PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS

Algumas espécies de leveduras pertencentes aos gêneros *Hansenula*, *Candida*, *Torulopsis* e *Pichia* são capazes de crescer utilizando metanol como única fonte de carbono e energia. Essas leveduras, então, são denominadas metilotróficas e constituem eficazes sistemas de expressão para um número crescente de aplicações biotecnológicas (GELLISSEN, 2000). Dentro desse restrito grupo, *Pichia pastoris* vem se destacando tanto para pesquisa básica quanto para o uso industrial por ser facilmente manipulada por métodos convencionais de engenharia genética, atingir altos níveis de expressão protéica e elevada

densidade celular, e por desfrutar do status GRAS (*Generally Recognised As Safe*) (CREGG *et al.*, 2001). Nesse contexto, vários fármacos aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*), incluindo a insulina (MELMER, 2005) e duas vacinas recombinantes, desenvolvida contra o vírus da hepatite B (CREGG *et al.*, 1987; ABRAHAM *et al.*, 1999), foram produzidos a partir de *P. pastoris*.

Os sistemas baseados em leveduras metilotróficas não oferecem alguns obstáculos geralmente encontrados nos sistemas baseados em *S. cerevisiae*, os quais envolvem instabilidade mitótica de linhagens recombinantes e hiperglicosilações indesejáveis (CEREGHINO & CREGG, 2000; DALY & HEARN, 2005). Ao contrário do que se observa para mamíferos, tanto *P. pastoris* como *S. cerevisiae* realizam O- e N-glicosilações do tipo *high* manose. Contudo, a levedura metilotrófica apresenta a vantagem de não realizar hiperglicosilações nas proteínas secretadas. Além do tamanho das cadeias de oligossacarídeos adicionadas pela *P. pastoris* (em média 8-14 resíduos de manose) ser muito menor do que as de *S. cerevisiae* (50-150 resíduos de manose), 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 & CREGG, 2000; DALY & HEARN, 2005). Adicionalmente, como não se trata de uma forte fermentadora, como *S. cerevisiae*, o emprego da levedura metilotrófica pode ser mais vantajoso considerando que, em culturas sob alta densidade, os produtos gerados pela fermentação podem atingir níveis tóxicos (“efeito Crabtree”) (TORRES & MORAES, 2002).

Várias linhagens de *P. pastoris* estão disponíveis para expressão, bem como diferentes linhas de vetores, os quais proporcionam tanto a expressão intra quanto extracelular. Diversos genes provenientes de diferentes organismos (bactérias, fungos, invertebrados, plantas e humanos) já foram expressos nesta levedura (CEREGHINO & CREGG, 2000). Devido a todos esses atrativos, o potencial de *P. pastoris* tem sido investigado para produção de VLPs de HPV.

2.5.1 Metabolismo do metanol: o promotor induzível AOX1

As primeiras reações do metabolismo metanólico para obtenção de energia ocorrem dentro dos peroxissomos. Nessa organela, a enzima AOX catalisa o primeiro passo na via de

utilização do metanol através da oxidação do metanol a formaldeído e peróxido de hidrogênio (DALY & HEARN, 2005). Em seguida, e ainda no peroxissomo, o peróxido de hidrogênio é degradado em água e oxigênio pela ação da AOX em conjunto com a catalase. Dessa forma, o peroxissomo encapsula e seqüestra o peróxido de hidrogênio, um composto tóxico para célula. Parte do formaldeído (produzido a partir da oxidação do metanol) deixa o peroxissomo e é oxidado a formato e dióxido de carbono por duas dehidrogenases citoplasmáticas, reações que proporcionam fonte de energia para o crescimento celular (GELLISSEN & HOLLENBERG, 1997). A porção restante de formaldeído que permanece no peroxissomo é utilizada como precursora de constituintes celulares (figura 12). A AOX tem uma baixa afinidade por oxigênio e, para contornar essa situação, esta enzima é produzida em grandes quantidades, chegando a representar mais de 30% do conteúdo de proteínas solúveis totais nas células cultivadas em metanol (CEREGHINO & CREGG, 2000; GELLISSEN *et al.*, 2005).

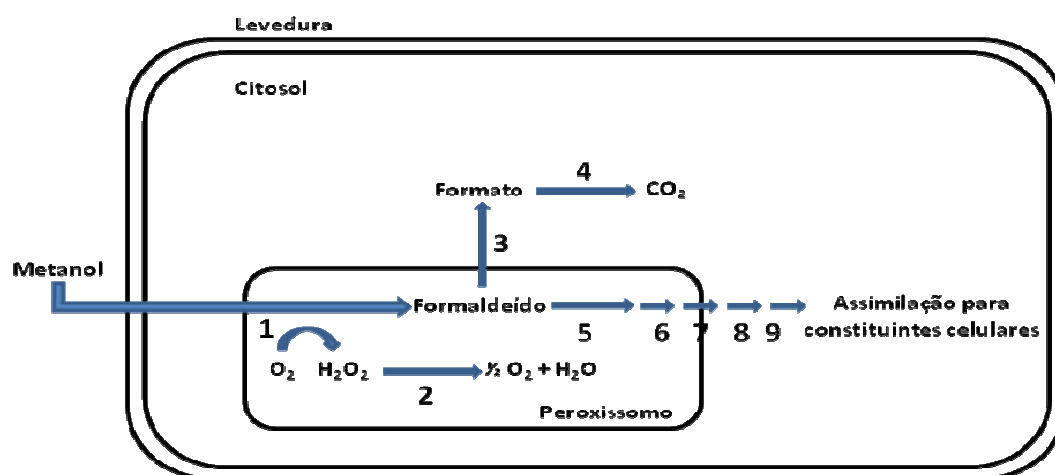


Figura 13. Metabolização do metanol em *P. pastoris*: 1. Álcool oxidase; 2. Catalase; 3. Formaldeído desidrogenase; 4. Formato desidrogenase; 5. Deidroxia cetona sintetase; 6. Deidroxia cetona quinase; 7. Frutose-bifosfato aldolase; 8. Frutose bifosfatase; 9. Formaldeído redutase. Fonte: adaptada Zhang *et al* (2000) e Houard *et al* (2002).

O genoma de *P. pastoris* contém dois genes que codificam a álcool oxidase: *AOX1* e *AOX2*. Muita embora as sequências codificantes destes dois genes possuam 97% de homologia, o gene *AOX1* regula 85% da atividade da álcool oxidase, enquanto o gene *AOX2* regula os 15% restantes. A expressão do gene *AOX1* é controlada em nível transcricional: em células crescidas em metanol, aproximadamente 5% do RNA poliA⁺ provém do gene *AOX1*, ao passo que em células crescidas na ausência de metanol, o mensageiro *AOX1* é indetectável

(CREGG *et al.*, 2002). O promotor do gene *AOX1* é fortemente reprimido em células cultivadas com glicose e outras fontes de carbono, enquanto é induzido em mais de 1000 vezes quando são cultivadas em meios contendo metanol como única fonte de carbono (CEREGHINO, 2002). Dois mecanismos envolvem a regulação do gene *AOX1*: um de repressão/desrepressão e um mecanismo de indução. Portanto, é importante salientar que a ausência de uma fonte de carbono repressora, tal como glicose, não resulta em substancial transcrição de *AOX1*. A presença do metanol é essencial para indução de altos níveis de transcrição (CEREGHINO & CREGG, 2000).

Três fenótipos de utilização do metanol estão disponíveis para linhagens de *P. pastoris*, de acordo com a sua habilidade para utilização desta fonte de carbono. Linhagens portadoras do fenótipo *Mut*⁺ (*Methanol utilization plus*) possuem ambos os genes *AOX1* e *AOX2*, o que as torna muito sensíveis ao metanol, permite seu crescimento na mesma taxa do fenótipo selvagem e requer grandes quantidades de metanol para indução. As linhagens portadoras do fenótipo *Mut*^s (*Methanol utilization slow*) possuem apenas o gene *AOX2* intacto, enquanto o gene *AOX1* encontra-se interrompido. Desse modo, tanto o crescimento quanto a produção de proteína heteróloga é dependente do gene menos ativo *AOX2* para a metabolização do metanol. O resultado disso é um crescimento mais lento e menor utilização de metanol. Essas linhagens, então, são indicadas para expressão intracelular da proteína recombinante, pois possuem menores quantidades da enzima AOX, o que proporciona maior rendimento específico (SREEKRISHNA *et al.*, 1997). Além disso, o crescimento lento em metanol favorece o processamento adequado das proteínas heterólogas em longas fermentações (CREGG *et al.*, 1987). A linhagem X-33 é *Mut*⁺ (tipo selvagem), a GS115 *Mut*⁺ e *His*⁻ (*his4*) e a KM71H é *Mut*^s e *Arg*⁺ (*aox1::ARG4*) (DALY & HEARN, 2005). Uma vez que linhagens *Mut*^s não são demasiadamente sensíveis ao metanol presente no meio como as linhagens *Mut*⁺, o aumento na produção pode ser atingido de forma mais fácil. Por fim, linhagens com o fenótipo *Mut*⁻ (*Methanol utilization minus*) são deficientes em ambos os genes AOX, sendo inviáveis para o crescimento em metanol (MACAULEY-PATRICK *et al.*, 2005).

2.5.2 Promotores alternativos para expressão

Além do promotor P_{AOX1} , outros promotores têm sido investigados e podem ser mais adequados para expressão de certos tipos de proteínas. O promotor P_{FDL1} controla a expressão da enzima formaldeído desidrogenase (*FLD1*), envolvida no metabolismo do metanol. Trata-se de um elemento forte e induzido tanto por metanol como única fonte de carbono (com a amônia sendo a fonte de nitrogênio) quanto por glicose como única fonte de carbono (com a metilamina como fonte de nitrogênio). Isso proporciona maior facilidade na expressão de proteínas heterólogas uma vez que esta abordagem não é dependente apenas de um indutor para produção (SHEN *et al.*, 1998).

O promotor P_{GAP} controla a expressão da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAP) e também constitui uma alternativa livre de metanol por necessitar de glicose como indutor. O emprego deste promotor constitutivo possibilita simultaneamente a expressão da proteína recombinante e o crescimento celular em meio contendo glicose, ao contrário dos sistemas que utilizam o P_{AOX} . Segundo Vassileva *et al* (2001), esse sistema possibilita a obtenção de níveis de expressão semelhantes ou até maiores do que aqueles que empregam metanol como indutor. Aloulou *et al* (2006) relataram a obtenção de 100-120mg/L de lipase pancreática humana em 40 horas de indução utilizando este promotor.

Outros dois promotores relatados na literatura, o P_{YPT1} , induzido por manitol e construído a partir do gene *YPT1* de uma GTPase envolvida na secreção, e o P_{PEX8} , que controla a proteína da matriz peroxissomal, demonstraram baixos níveis de expressão e, dessa forma, não despertam maiores interesses por outros autores (CREGG *et al.*, 2000).

2.5.3 Metabolismo da glicose: o promotor constitutivo P_{PGK1}

Embora o promotor P_{AOX1} seja utilizado com sucesso, existem circunstâncias nas quais ele não é adequado. A título de ilustração, o emprego de metanol para fermentações em larga escala é inapropriado por se tratar de um composto inflamável, bem como para a produção de produtos alimentícios (CREGG *et al.*, 2000). Esses aspectos têm forçado a investigação de outros promotores em potencial.

O promotor do gene *PGK1* tem sido empregado com sucesso na construção de vetores de expressão para diversas leveduras (GRANGE *et al.*, 1996; MASUDA *et al.*, 1994; DALL

et al., 1996; FOURNIER *et al.*, 1989) e fungos filamentosos (NARA *et al.*, 1993; TAKAYA *et al.*, 2004; VANHANEN *et al.*, 1989). A enzima glicolítica 3-fosfoglicerato quinase (PGK) atua no metabolismo da glicose transferindo o grupamento fosfato do 1,3-bifosfoglicerato para o ADP, gerando ATP e 3-fosfoglicerato. Essa enzima, a qual é constitutivamente expressa, também atua na via gliconeogênica e pode representar cerca de 5% do conteúdo protéico celular (HOLLAND & HOLLAND, 1978). Genes da via glicolítica em *S. cerevisiae* são altamente expressos e suas enzimas correspondentes constituem cerca de 30-60% das proteínas solúveis (BAKER, 1991).

O gene *PGK1* de *P. pastoris*, isolado e caracterizado por Almeida *et al* (2005), possui cópia única no genoma e uma ORF de 1251 pb codificante para uma proteína de 416 aminoácidos. No promotor P_{PGK1} de *P. pastoris* foram identificados elementos *cis* regulatórios também presentes em promotores P_{PGK1} de outras leveduras. O *TATA box* foi identificado na posição -71 do ATG do gene *PGK1* e o elemento *heat shock* (HSE) na posição -425 a -440, este último sendo responsável pelo aumento dos níveis de mRNA quando a temperatura é elevada (PIPER *et al.*, 1988). À semelhança do que se observa em *S. cerevisiae*, outras sequências importantes encontradas neste promotor são sítios de ligação para a proteína Gcr, a qual é fundamental para a ativação de altos níveis dos genes da via glicolítica (DEMINOFF & SATANGELO, 2001).

Nos experimentos desenvolvidos por Almeida *et al* (2005), quando células de *P. pastoris* foram cultivadas em meios contendo glicose, observou-se um aumento de duas vezes nos níveis de mRNA da α -amilase de *Bacillus subtilis* clonado sob o controle deste promotor constitutivo, em comparação com aqueles detectados sob crescimento em glicerol. Essas características despertam o interesse para emprego do promotor P_{PGK1} na produção de proteínas recombinantes em larga escala (ALMEIDA *et al.*, 2005).

2.5.4 Vetores de expressão para *P. pastoris*

Algumas características são comuns a maioria dos vetores plasmidiais desenhados para expressão de proteínas heterólogas em *P. pastoris*, sejam comerciais ou não. De uma forma geral, esses vetores contêm uma origem de replicação bacteriana para manutenção do plasmídeo, regiões específicas para recombinação no genoma da levedura e marcas para seleção em ambos os organismos (HIGGINS, 1998; GELLISSEN, 2000; CEREGHINO &

CREGG, 2000; TORRES & MORAES, 2002). Certas características adicionais servem como ferramentas para funções especializadas. É o caso, por exemplo, da utilização bem sucedida do sinal α -mating factor de *S. cerevisiae*, codificante do peptídeo pré-pró fator α , cuja função é dirigir a secreção da proteína recombinante (CREGG & CEREGUINO, 2001), e do emprego de sequências específicas para isolamento e geração de cassetes com múltiplas cópias do inserto por métodos *in vivo* e *in vitro* (INVITROGEN, 2009).

O vetor comercial de expressão pPICZA α apresenta a sequência promotora do gene *AOX1* e a sequência de terminação da transcrição do *AOX1* (fragmento de aproximadamente 1 kb) (CEREGHINO & CREGG, 2000). Como característica diferencial, este vetor disponibiliza o peptídeo sinal do fator α de *S. cerevisiae*, o qual permite a clivagem da proteína recombinante pela protease Kex2p presente na membrana do retículo endoplasmático e sua posterior secreção extracelular (CREGG & CEREGHINO, 2001). Ademais, o pPICZA α apresenta duas sequências que possibilitam estratégias diferentes de detecção e recuperação da proteína heteróloga produzida. A primeira delas refere-se ao epitopo C-myc, cuja fusão à proteína recombinante permite a sua imunodetecção por anticorpo anti-myc. A outra sequência está relacionada à cauda de poli-histidina (6xHis), cujo epitopo C-terminal possibilita tanto a detecção através do anticorpo anti-His quanto a purificação da proteína recombinante mediante cromatografia por afinidade (GELLISSEN, 2000; TORRES & MORAES 2002; INVITROGEN, 2009). Por sua vez, o vetor não comercial de expressão pPGK Δ 3 possui os mesmos elementos de sinalização para secreção extracelular e detecção/recuperação presentes no pPICZA α , mas o promotor do gene *AOX1* foi substituído pelo promotor do gene *PGK1* (ALMEIDA *et al.*, 2005).

Com relação às marcas de seleção, poucos genes são descritos para manipulação genética da levedura *P. pastoris*. Tanto os vetores pPICZA α quanto o pPGK Δ 3 apresentam o gene *Sh ble* do *Streptoalloteichus hindustanus*. Este pequeno gene (375 pb) confere resistência à droga ZeocinaTM em *E. coli*, leveduras (incluindo *P. pastoris*) e outros eucariotos, e possibilita a obtenção de linhagens possuidoras de múltiplas cópias do gene exógeno. Considerando o elevado custo atrelado à utilização da droga ZeocinaTM, sobretudo quando se vislumbra a produção em larga escala, vetores comerciais de outras linhas têm disponibilizado marcas de seleção alternativas, como os genes bacterianos *kan* e *amp^r*, os quais conferem resistência para os antibióticos Geneticina (G418) e Ampicilina, respectivamente (INVITROGEN, 2010). Adicionalmente, marcadores de prototrofia também

têm sido explorados e, nesse sentido, as marcas limitam-se aos genes da via biossintética *HIS4* de *P. pastoris* e *S. cerevisiae*, e *ARG4* de *S. cerevisiae* (HIGGINS *et al.*, 1998; INVITROGEN, 2010).

Tanto o vetor pPICZA α quanto o pPGK Δ 3 são do tipo integrativo em *locus* específico do genoma da levedura, originando transformantes geneticamente estáveis. A integração no genoma se dá via recombinação homóloga, já que o vetor contém regiões homólogas ao genoma de *P. pastoris*, podendo ocorrer por inserção ou substituição gênica (DALY & HEARN, 2005). Especificamente para o vetor pPICZA α , a transformação de linhagens Mut⁺ com vetores linearizados na região 5' do promotor P_{AOX1} promove a inserção por único *crossover* na região homóloga do *locus AOX1*, gerando transformantes Mut⁺, uma vez que o gene *AOX1* não é interrompido. A transformação de linhagens Mut^s, por sua vez, origina apenas transformantes Mut^s (DALY & HEARN, 2005).

Muito embora vetores comerciais de expressão epissomais estejam disponíveis para *P. pastoris*, o emprego desse sistema tem sido comprometido pela instabilidade clonal de caráter segregacional observada nas linhagens recombinantes geradas em larga escala (CREGG *et al.*, 1985; HONG *et al.*, 2006; ZHU *et al.*, 2009).

2.5.5 Múltiplas integrações do cassete de expressão em *P. pastoris*

Embora para vários genes exógenos explorados, a exemplo do antígeno de superfície do vírus da hepatite B e da β -galactosidase, uma única cópia do cassete de expressão tenha proporcionado elevados níveis de produção, outros estudos têm evidenciado que o aumento no número de cópias integradas do gene de interesse pode favorecer maiores índices de expressão (CLARE *et al.*, 1991a; CLARE *et al.*, 1991b; VASSILEVA *et al.*, 2001).

A obtenção de linhagens com múltiplas cópias estáveis tem sido realizada com sucesso por dois métodos: i) realização de triagem para identificação de clones com múltiplas cópias que naturalmente são gerados dentro de uma população de transformantes, a uma frequência muito baixa; ii) construção *in vitro* de um cassete de expressão contendo múltiplas cópias do inserto de interesse e geração de linhagens recombinantes com essas construções (CREGG *et al.*, 1993).

Vários autores têm relatado que o número de cópias integradas do gene exógeno representa um fator determinante na análise do rendimento da produção de uma proteína

recombinante (VASSILEVA *et al.*, 2001; MANSUR *et al.*, 2005; ROMANOS, 1995). Estudos realizados com a expressão intracelular do fragmento C da toxina tetânica demonstraram que, muito embora o fenótipo de utilização do metanol e o sítio de integração desempenhem um menor efeito nos níveis de produção, o aumento no número de cópias do gene exógeno possui um efeito marcante (CLARE *et al.*, 1991b). Para Romanos (1995), a maximização do número de cópias do gene de interesse é uma eficiente solução para contornar a limitação do nível transcricional na expressão de proteínas heterólogas.

De maneira contrária, outros autores salientam que essa estratégia possui limitações importantes. Cos e colaboradores (2005) observaram que o aumento no número de cópias do gene resultou em marcante diminuição da expressão extracelular. Estes autores também evidenciaram que o fenótipo Mut^s, quando associado a cópias únicas do gene, apresenta maiores níveis de produção do que o fenótipo Mut⁺. Hohenblum e colaboradores (2004), conduzindo um estudo sobre respostas ao estresse em *P. pastoris*, observaram que a utilização de mais de duas cópias do gene para tripsinogênio humano resultou em diminuição da produção do mesmo. Concluíram, portanto, que o aperfeiçoamento da expressão mediante aumento do número de cópias pode resultar numa espécie de “gargalo”, uma vez que a grande concentração de proteínas não processadas no ambiente intracelular constituiu uma condição estressante para a levedura.

A integração de cassetes de expressão *in tandem* no genoma pode gerar estruturas instáveis as quais são excisadas por eventos de recombinação; quanto maior o arranjo em *tandem* dos cassetes, maior a possibilidade desses eventos de excisão ocorrerem (WANG *et al.*, 1996; LEE & DA SILVA, 1997). Nesse sentido, linhagens detentoras de um grande número de cópias do cassete de expressão são mais instáveis geneticamente em comparação com linhagens possuidoras de cópias únicas. Essa instabilidade parece ser resultado de um fenômeno denominado “fardo metabólico”, condição na qual a expressão do número elevado de cópias do gene recombinante compromete a taxa de crescimento celular e desregula várias vias metabólicas (ZHU *et al.*, 2009; MACAULEY-PATRICK *et al.*, 2005).

2.5.6 Proteólise

A degradação proteolítica tem sido um problema recorrente no emprego de leveduras para expressão de proteínas recombinantes (GIMENEZ *et al.*, 2000). Os vacúolos desses

microrganismos contêm várias proteases cujos níveis variam de acordo com as condições nutricionais (HANSEN *et al.*, 1977). Ao contrário do que ocorre com *S. cerevisiae*, poucas são as proteases documentadas para *P. pastoris* (MACAULEY-PATRICK *et al.*, 2005). Como os relatos de proteases extracelulares para leveduras são escassos e considerando que *P. pastoris* secreta baixos níveis de proteínas nativas (SINHA *et al.*, 2004; MACAULEY-PATRICK *et al.*, 2005), a produção extracelular tem sido bastante explorada nesse sistema.

Ainda assim, a degradação proteolítica de proteínas recombinantes secretadas em *P. pastoris* pode ser resultado de morte celular e consequente liberação de proteases intracelulares a partir de fermentações com elevada densidade celular (MACAULEY-PATRICK *et al.*, 2005; SINHA *et al.*, 2004). As leveduras, de um modo geral, podem reconhecidamente sofrer estresse por privação de nutrientes, mudanças na fonte de carbono, temperatura e pH, além da presença de produtos tóxicos. Proteínas danificadas por estresse oxidativo ou por resposta a choque térmico também podem induzir uma resposta proteolítica. Nesse contexto, desde que o metabolismo do metanol demanda elevada concentração de oxigênio e tem como subproduto o peróxido de hidrogênio, proteínas danificadas por estresse oxidativo representam uma possibilidade relevante a partir das induções com metanol. Isso poderia provocar a produção em excesso de proteases vacuolares, sua resultante secreção para o citosol e, eventualmente, para o meio de cultura (SINHA *et al.*, 2004).

Várias estratégias têm sido desenvolvidas para controlar a proteólise em *P. pastoris*, as quais se baseiam nas condições de cultivo ou no emprego de linhagens deficientes em proteases (MACAULEY-PATRICK *et al.*, 2005; SINHA *et al.*, 2004). Esta levedura metilotrófica é capaz de crescer em culturas com pH na faixa entre 3-6 e, assim, diferentes valores têm sido considerados ótimos para expressão heteróloga dentro dessa faixa, do ponto da estabilidade do produto recombinante (MACAULEY-PATRICK *et al.*, 2005). Contudo, alguns autores têm relatado que a manutenção do pH acima de 6 durante a fase de indução diminui a atividade de proteases e, conseqüentemente, a degradação do produto extracelular recombinante (INVITROGEN, 2009). A estabilidade do produto de interesse também pode ser prolongada pela adição de suplementos ricos em aminoácidos, como peptona ou casaminoácido, ao meio de cultura. Esses compostos possivelmente atuam como substratos alternativos e competidores para uma ou mais proteases, podendo também reprimir a indução das proteases devido à limitação de nitrogênio (MACAULEY-PATRICK *et al.*, 2005; SREEKRISHNA *et al.*, 1997).

A temperatura também interfere na degradação e morte celular. Muito embora a faixa considerada ótima para *P. pastoris* seja entre 28-30°C, menores temperaturas podem aumentar a produção da proteína recombinante (MACAULEY-PATRICK *et al.*, 2005). Li *et al* (2001) demonstrou que a utilização de temperaturas reduzidas, mais precisamente 23°C, refinaram a produtividade (aumento na produção de 5.3 mg/l para 18 mg/l) sem comprometer o crescimento celular. Adicionalmente, Jahic *et al* (2003) propôs a contribuição de três fatores na diminuição da proteólise e aumento no rendimento dos níveis de expressão : i) baixas temperaturas e consequente diminuição da ação de proteases ; ii) morte celular reduzida e, consequentemente, menor liberação de proteases no meio; iii) aumento da taxa de síntese devido à elevação da atividade transcricional do promotor P_{AOX1} sob menores temperaturas. Juntos, esses fatores favoreceriam maiores níveis de expressão e menor degradação proteolítica da proteína heteróloga (JAHIC *et al.*, 2003).

A adição de inibidores de protease específicos ao meio de cultura pode ser vislumbrada. Contudo, supondo que a produção seja escalonada para a indústria, essa opção está atrelada a um custo proibitivo (MACAULEY-PATRICK *et al.*, 2005).

2.5.7 Produção de proteínas recombinantes do HPV em *P. pastoris*

Na última década, a expressão da proteína L1 de HPV foi relatada em *P. pastoris* (LI *et al.*, 2003; LIU *et al.*, 2007; BAZAN *et al.*, 2009; KOTZÉ *et al.*, 2011; HANUMANTHA RAO *et al.*, 2011; JIANG *et al.*, 2011). Todos os trabalhos empregaram a expressão da proteína viral através da utilização de vetores comerciais e sob controle do promotor P_{AOX1}.

O trabalho de Li *et al* (2003) representa a primeira tentativa de produção de VLPs de HPV em *P. pastoris*. Embora esses autores tenham relatado tanto a necessidade de otimizar os códons do gene L1 de HPV-6 para sucesso da expressão heteróloga quanto a glicosilação das proteínas recombinantes (sem comprometimento das suas características imunogênicas), Liu *et al* (2007) obtiveram proteínas L1 de HPV-16 não glicosiladas pela via extracelular e sem a necessidade de otimização dos códons do gene exógeno. Bazan *et al* (2009) foram os únicos autores a utilizar um vetor episomal para produção de VLPs de HPV-16.

Apesar de não demonstrar a produção de VLPs, Kotzé *et al* (2011) analisaram a expressão intracelular de L1 do HPV-16 mediante emprego de bioreatores. Jiang *et al* (2011) também utilizaram bioreatores e evidenciaram a produção intracelular de VLPs de HPV-58.

Hanumantha Rao *et al* (2011) expressaram a proteína L1 de HPV-16 e -18 em frascos e representam os únicos autores a analisar a funcionalidade das VLPs a partir de ensaios *in vitro* designados como “padrão ouro” pela OMS.

Recentemente, nosso grupo também analisou a produção da proteína L1 de HPV-16, -18 e -33 sob o controle do promotor P_{AOX1} de *P. pastoris* (COIMBRA *et al.*, 2011). Tanto a via intra quanto extracelular foram investigadas, mas os níveis de expressão mostraram-se muito baixos. Embora Liu *et al* (2007) tenham obtido sucesso na utilização de genes não otimizados, acreditamos que nossos resultados insatisfatórios se devem ao emprego de genes nativos, os quais podem conter marcas de terminação transcricional em leveduras representadas por regiões gênicas ricas em A-T, que produzem RNAm truncados (ROMANOS, 1995).

3. JUSTIFICATIVAS

A infecção pelo HPV tem sido motivo de crescente atenção nos últimos anos, tanto pelos gestores e profissionais da saúde, quanto pela comunidade acadêmica em todo mundo, considerando que o potencial carcinogênico do HPV tem sido sistematicamente avaliado. O Brasil e a cidade de Recife se destacam mundialmente tanto pelo número de casos relatados de infecção pelo HPV quanto pela relevante variação dos genótipos mais prevalentes.

Abordagens preventivas constituem a melhor alternativa para controle de infecções virais. Em particular, o câncer de colo uterino representa o tipo de câncer com maior potencial de prevenção e cura quando diagnosticado precocemente, à exceção do câncer de pele. O estabelecimento de programas de prevenção e triagem das lesões cervicais demanda profissionais bem treinados e investimento público persistente para desenvolver uma infraestrutura adequada. Os países em desenvolvimento, contudo, mostraram grande dificuldade em fazê-lo satisfatoriamente.

As duas vacinas profiláticas licenciadas contra o HPV apresentam um custo proibitivo para sua disponibilização nos países em desenvolvimento. Particularmente no Brasil, segundo estimativas do Ministério da Saúde, seria necessário o investimento de U.S. \$ 1.857 bilhão para vacinação de meninas entre 11-12 anos com a vacina quadrivalente, além dos \$ 750 milhões já investidos pelo Programa Nacional de Imunização (INCA, 2006). Adicionalmente, como essas vacinas contemplam to apenas dois tipos carcinogênicos de HPV, sua adoção poderia criar o nicho ecológico ideal para a substituição dos tipos prevalentes. Em longo prazo, o resultado disso seria a manutenção das atuais taxas de incidência das doenças associadas ao HPV.

O sistema de expressão heteróloga baseado na levedura *P. pastoris* tem sido relatada com uma alternativa atrativa para produção de proteínas recombinantes com fins vacinais. O emprego deste sistema para produção de VLPs de HPVs tem sido investigado nos últimos anos, mas todos os trabalhos envolvem a utilização de vetores comerciais, os quais foram patenteados e exigem o pagamento de *royalties* para uso comercial. Além disso, esses vetores determinam a expressão heteróloga mediante controle do promotor P_{AOX1}, o qual é eficiente mas possui inconvenientes por depender de um laborioso processo de monitoração da concentração do metanol e troca das diferentes fontes de carbono empregadas durante as fases de crescimento e indução.

Neste trabalho, avaliamos a produção da proteína L1 do HPV-16 em *P. pastoris* através do emprego de um gene otimizado para expressão neste hospedeiro. Este gene foi clonado sob controle do promotor induzível P_{AOX1} e do promotor constitutivo P_{PGK1}, e expresso mediante via secretória. O estabelecimento desta plataforma biotecnológica baseada em *P. pastoris*, voltada para uma produção de vacinas profiláticas contra o HPV que atenda as demandas regionais e diminua o custo de produção, deve contribuir substancialmente para a eficácia dos programas de prevenção contra o câncer cervical no país. Considerando, ainda, que uma forte vulnerabilidade econômica do complexo industrial da saúde brasileiro é sua elevada dependência de importações, sobretudo no campo das tecnologias de base biotecnológica, a produção nacional de vacinas representa uma importante retomada de posição estratégica.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo principal avaliar a expressão do gene L1 de HPV-16 com códons otimizados para *Pichia pastoris* sob controle dos promotores P_{AOX1} e P_{PGK1}, visando estabelecimento de uma plataforma biotecnológica para produção de VLPs de HPV-16.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desenhar *in silico* um gene L1 com códons otimizados para expressão em *P. pastoris*;
2. Avaliar a expressão extracelular da proteína L1 sob regulação do promotor indutível P_{AOX1} de *P. pastoris* mediante ensaios em frasco;
3. Avaliar a expressão extracelular da proteína L1 sob regulação do promotor constitutivo P_{PGK1} de *P. pastoris* mediante ensaios em frasco;
4. Avaliar a produção extracelular da proteína L1 nas diferentes linhagens recombinantes obtidas e sob controle do promotor indutível P_{AOX1};
5. Purificação da proteína L1 para caracterização das *Virus-like Particles*.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 MATERIAL

5.1.1 Linhagens de microrganismos

A linhagem TOP 10 de *Escherichia coli* (Invitrogen® – Carlsbad, CA, EUA), genótipo [F' {*proAB*, *lacIq*, *lacZ*ΔM15, Tn10 (TetR)} *mcrA*, Δ(*mrr*-*hsdRMS*-*mcrBC*), φ80*lacZ*ΔM15, Δ*lacX74*, *deoR*, *recA1*, λ-*araD139*, Δ(*ara-leu*)7697, *galU*, *galK*, *rpsL*(StrR), *endA1*, *nupG*] possibilitou a realização de manipulações genéticas, como propagação e amplificação de DNAs plasmidiais e construções moleculares realizadas durante o trabalho. As linhagens X-33 de *Pichia pastoris*, possuindo genótipo selvagem e fenótipo Mut⁺ e His⁺, e KM71H, possuindo genótipo *arg4 aox1::ARG4* e fenótipo Mut^S e ARG⁺, ambas da Invitrogen®, foram utilizadas para expressão da proteína L1 de HPV-16. Como controle negativo da indução, a linhagem X-33 foi transformada com os vetores pPICZAα e pPGKΔ3 vazios (sem inserto), enquanto a linhagem KM71H foi transformada com o vetor pPICZAα.

5.1.2 Plasmídios

O gene L1 otimizado de HPV-16 foi sintetizado pela empresa *Epoch Biolabs* (EUA) e clonado no plasmídio pBSK (Fermentas®), gerando o vetor pBSK-L1H16. Este vetor foi utilizado na transformação de bactérias *E. coli* TOP10 e empregado para obtenção do gene L1. O vetor pPICZAα (Invitrogen®) para expressão em *P. pastoris* possui o sinal α-*mating factor* de *S. cerevisiae* e o promotor P_{AOX1}, e foi obtido através da construção pPICZAα-L1B2 (JESUS, em andamento), mediante digestão enzimática. O vetor pPGKΔ3, cedido gentilmente pelo Prof. Dr. Fernando Araripe Gonçalves Torres, da Universidade de Brasília, foi desenvolvido durante a dissertação de mestrado de Arruda (2008) e contém o sinal α-*mating factor* com códons otimizados para *P. pastoris*, além do promotor P_{PGK1}. Os cassetes de expressão pPICZAα-L1H16 e pPGKΔ3-L1H16, além das regiões já descritas, contém o gene *Sh ble* de resistência a ZeocinaTM (Invitrogen®), e foram utilizados para expressão da proteína recombinante em *P. pastoris*.

5.1.3 Soluções e Tampões

Para manipulação e análises de DNA: Solução I – Glicose 50mM, Tris-HCl 25mM pH 8.0, EDTA (Ácido Tetracético Etilenodiamina) 10mM pH 8.0 (estéril); **Solução II** – NaOH 0,2M, SDS 1%; **Solução III** – Acetato de Potássio 5M; **Solução tampão TAE** (tris-acetato-EDTA) **10X** – Tris base 400mM, ácido acético 190mM, EDTA 10mM pH 7.6; **Tampão de amostra 6X** – glicerol 30%, azul de bromofenol 0,2%.

Para análises protéicas: Tampão de corrida para SDS-PAGE 10X – Tris 0.25M, glicina 1.9M e SDS 1%; **PBS** (Tampão fosfato – salina) – Fosfato de potássio 50mM, NaCl 150mM pH 7,2; **Solução tampão TBS-Tween 10X** – Tris-HCl 100 mM NaCl 0.9% Tween-20 0,1% pH 7.6 (diluir para 1X quando aplicado como **Tampão de lavagem para o Western blotting**); **Solução de bloqueio para Western blotting** – leite desnatado 5% em TBS-Tween 1X (p/v); **Tampão de transferência** – Tris-glicina 1X, SDS 1%, etanol 20%; **Coomassie Brilliant Blue** – azul de Coomassie R250 0,3%, metanol 45% e ácido acético 10%; **Solução descorante** – metanol 45%, ácido acético 10%; **Solução nitrato de prata (AgNO₃)** – nitrato de prata 0.2%, formaldeído 0.02%; **Solução fixadora para AgNO₃** – etanol 40%, ácido acético 10%; **Solução de lavagem para AgNO₃** – etanol 30%; **Tiosulfato de sódio 0.02%**; **Solução reveladora para AgNO₃** – carbonato de sódio 3%, formaldeído 37%, tiosulfato de sódio 0.0005%; **Solução de parada para AgNO₃** – glicina 0.5%; **Ponceau-S Red 0.4%** (Sigma-Aldrich®) em DMSO (Sigma-Aldrich®) .

5.1.4 Composição dos meios de cultura

Para cultivo de linhagens bacterianas: meio Luria-Bertani (**LB**: triptona 1%, extrato de levedura 0.5% e NaCl 1%); meio Luria-Bertani *Low Salt* (**LB Low Salt**: triptona 1%, extrato de levedura 0.5%, NaCl 0.5%, pH 7.5). Para meio sólido, foram acrescentados 15g/L de ágar.

Para cultivo de linhagens de leveduras: meio **YPD** (extrato de levedura 1%, peptona 2% e glicose 2%); **YPDS** (extrato de levedura 1%, peptona 2%, glicose 2% e sorbitol 1M). Para meio sólido, foram acrescentados 20g/L de ágar.

Para cultivo dos clones e indução da expressão: meio **MM** (*Minimal Methanol* – YNB 1.34%, biotina 4x10⁻⁵%, metanol 0.5%); meio **MD** (*Minimal Dextrose* – YNB 1.34%, biotina 4x10⁻⁵% e dextrose 2%).

5.1.5 Enzimas, kits e marcadores

Foram utilizados as enzimas e kits da Promega® Corporation: XhoI e NotI (incluindo tampão de reação ideal para cada enzima), *Taq* DNA Polimerase Master Mix, kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purifications System, kit SV Total RNA Isolation System, kit Improm-II™ Reverse Transcription System. Foram obtidos da Invitrogen® Corporation: RNase, Lyticase, Zeocina™, marcador λ /Hind III, Marcador 1 Kb plus, ProBond Purification System. Foram utilizados da Qiagen® Corporation (Duesseldorf, Alemanha): QIAquick Gel Extraction Kit , Qiagen Plasmid Midi Kit e QIAprep Spin Maxiprep kit e o 6-His Protein Ladder. O marcador PageRuler™ Prestained Protein Ladder Color Burst para eletroforese de proteínas foi obtido da Fermentas® International Inc. (Burlington, Canada).

5.2 MÉTODOS

Antes de iniciar a descrição cronológica dos métodos empregados neste trabalho, nos três itens seguintes serão determinados os protocolos para cultivo das linhagens de microrganismos utilizadas, para as análises de DNA e para os imunoenaios. Esses métodos estão listados em itens específicos para evitar sua descrição repetida ao longo do texto, uma vez que se trata de análises comumente empregadas ao longo deste trabalho.

5.2.1 Cultivo de microrganismos

Para a transformação de bactérias *E. coli* com o vetor pBSK-L1H16, foi utilizado o meio LB contendo 100 µg/ml de ampicilina e cultivo por toda a noite a 37°C sob agitação de 250 rpm. Para transformação de bactérias *E. coli* com o cassete de expressão pPICZAαL1H16, foi utilizado o meio LB *Low Salt* acrescido de 25 µg/ml de ZeocinaTM. As células foram rotineiramente cultivadas a 37°C em agitador orbital (100 rpm).

Para transformação das leveduras, as células foram cultivadas em meio YPD líquido antes de serem submetidas ao pulso elétrico. Após eletroporação, as leveduras transformantes foram semeadas em placas YPDS contendo 100 µg/ml de ZeocinaTM e incubadas por 2-3 dias a 30°C. As leveduras foram rotineiramente cultivadas a 30°C e, quando necessário, sob agitação vigorosa (300 rpm).

Para as linhagens transformadas com a construção pPICZAα-L1H16, a formação de biomassa foi realizada através do cultivo dos transformantes em meio YPD por 48 horas. As induções dessas linhagens foram executadas em meio MM por até 72 horas, adicionando-se alíquotas de metanol a cada 24 horas para concentrações finais de 4% (clones Mut^S) e 2% (Mut⁺). Para a linhagem transformada com a construção pPGKΔ3-L1H16, a formação de biomassa/indução foi realizada através de cultivo em MD por 48 ou 72 horas. Todos os ensaios de expressão foram feitas sob agitação vigorosa a 300-350 rpm.

5.2.2 Análise de DNA e proteínas por eletroforese

Os géis de agarose utilizados foram preparados na concentração de 0.8% e 1% em TAE 1X (Tampão ácido acético e EDTA). Para aplicação do material no gel, foi utilizado tampão de amostra 6X. As corridas de eletroforese foram realizadas com fonte de tensão constante e ajustável (100 V). Por fim, para visualização das bandas de DNA em

transiluminador de luz ultravioleta, os géis foram corados com solução de Brometo de etídeo (0.5 µg/ml).

Para as análises das proteínas por SDS-PAGE, foram preparados géis separador (*resolving gel*) 12% [6ml de Acrilamida/Bis-acrilamida 30%/0.8%, 3,75ml de Tris-HCl 1M/SDS 0,4% pH 8.8, 50µl de APS 10% (Sigma-Aldrich®), 10µl de TEMED (Sigma-Aldrich®), completar com água MilliQ para 15ml] e concentrador (*stacking gel*) de 5% [0,65ml de Acrilamida/Bis-acrilamida 30%/0,8%, 1,25ml de Tris-HCl 1M/SDS 0,4% pH 6.8, 25µl de APS 10% (Sigma-Aldrich®), 5µl de TEMED (Sigma-Aldrich®), completar com água MilliQ para 5ml]. Para aplicação no gel, as amostras do sobrenadante das induções foram submetidas às condições desnaturantes, sendo aliqüotadas em tampão Laemmli 2X (Tris-HCl 1M pH 6.8, SDS 4%, β-mercaptoetanol 4%, glicerol 20%, azul de bromofenol 0.1%) e incubadas por 5 minutos a 100°C. As corridas de eletroforese foram realizadas com tampão de corrida para SDS-PAGE 1X e mediante emprego de fonte de tensão constante e ajustável, seguindo os seguintes parâmetros: 400 V e 35mA por 90 minutos.

5.2.3 Imunoensaios

As imunodeteções por *Dot blotting*, *Colony blotting* e *Western blotting* empregaram membranas de PVDF (*Polyvinylidene fluoride*, Millipore®) e o protocolo descrito a seguir. Especificamente para o *Western blotting*, a etapa de transferência das proteínas do SDS-PAGE para as membranas foi realizada em sistema semi seco. Quando conveniente, as membranas foram coradas por *Ponceau-S Red* 0.4% para visualização das proteínas aderidas. Para descorar as membranas e prosseguir com os ensaios de *immunoblotting*, o *Ponceau* foi retirado após lavagem em NaOH 1N. Para detecção da proteína L1, os imunoensaios empregaram um etapa inicial de bloqueio das membranas, seguida de incubação com anticorpo monoclonal anti-L1 de HPV-16 Camvir® (Chemicon®) e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (Amersham®), ambos diluídos em solução de bloqueio para 1:1000 e 1:3000, respectivamente. Entre as incubações com os anticorpos primário e secundário, bem como antes da etapa de revelação da reação, foram realizadas duas etapas de lavagem das membranas com TBS-Tween 1X (cada etapa consistindo de três incubações por 10min no tampão de lavagem). Para revelação da reação, utilizou-se substrato quimioluminescente baseado em três reagentes: Luminol e Iodofenol, ambos da Sigma-Aldrich®, e peróxido de hidrogênio comercial 20 volumes. Para visualização da reação

quimioluminescente, empregou-se filme *BioMax Light Film* e reagente Dektol (ambos da KODAK®), e soluções de ácido acético para fixação. Quando conveniente, foram empregados o *Alkaline Phosphatase (AP) Conjugated Anti-Mouse Antibody* e o *Visiglo AP Chemiluminescent substrate* para revelação da reação, ambos da Amresco®.

A descrição dos itens a seguir corresponde aos métodos cronologicamente desenvolvidos ao longo deste trabalho.

5.2.4 Desenho e síntese do gene L1 de HPV-16

Tomando-se como base a sequência disponível no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, número de acesso GI: 27752860), a adaptação dos códons do gene L1 de HPV-16 para expressão em *P. pastoris* foi feita *in silico*, considerando não apenas o *codon usage* desta levedura como também a estrutura secundária do mRNA. À sequência desenhada, foram adicionados os sítios de clonagem para as enzimas XhoI e NotI (compatíveis com ambos os vetores de expressão pPICZA α e pPGK Δ 3), a sequência Kex2 para processamento do sinal de secreção e uma cauda de poli-histidina (6x). Como previamente mencionado no item 5.1.2, o gene foi sintetizado e clonado em vetor pBSK. Análises de identidade, composição nucleotídica e predição da sequência protéica foram realizadas pelos softwares *Blastn* e *Blastp* do NCBI e *BioEdit Sequence Alignment Editor*, enquanto a investigação do *codon usage* foi feita pelo *Graphical Codon Usage Analyser*.

Adicionalmente, foram desenhados dois pares de *primers* para amplificação do gene L1, mediante emprego do software BLAST disponível *on line* no NCBI (tabela 1). Um dos pares amplifica o fragmento completo (1568 pb) e o outro amplifica um fragmento interno ao gene (444 pb).

Tabela 1. Sequências dos *primers* utilizados para amplificação do gene L1 de HPV-16.

<i>Primers L1H16</i>	Sequência 5'-3'
<i>Forward</i>	TAGGATCCATGTCATTATGGCTTCCA
<i>Reverse</i>	CTGGATCCTTAATGATGATGATGATGATGCAA
<i>Primers L1H16 internos</i>	Sequência 5'-3'
<i>Forward</i>	GGTCAACCTTTAGGAGTTGG
<i>Reverse</i>	GACGAACATTTGTTCCCTTCA

5.2.5 Manipulação do plasmídio pBSK-L1H16 e obtenção do gene L1

O plasmídio pBSK-L1H16 contendo o gene L1 sintético foi utilizado para transformação de bactérias *E. coli* TOP 10 pelo sistema de cloreto de cálcio (CaCl_2), segundo Sambrook *et al* (1989). Previamente, células da referida linhagem bacteriana foram submetidas a protocolo de competência como se segue. As bactérias foram inoculadas em 50 ml de LB sob condições anteriormente descritas (item 5.2.1). Em seguida, novo inóculo foi realizado com 1 ml da cultura em 500 ml de LB para crescimento até uma O.D.₆₀₀ igual a 0,5. Metade dessa cultura foi centrifugada a 3000 x g por 5min, a 0°C. O precipitado celular obtido foi ressuscitado em solução gelada de CaCl_2 (100mM) e incubado no gelo por 30min. Outra centrifugação foi realizada a 3000 x g por 7min para, a seguir, ressuspensão das células em 5 ml de CaCl_2 (100mM) e glicerol 15% gelados. Para transformação (SAMBROOK *et al.*, 1989), foram aliqüotadas 50 µl de células competentes e 0,5 µg de DNA plasmidial. As células transformadas foram semeadas em placas LB/Ampicilina e cultivadas como descrito (item 5.2.1).

As colônias crescidas na placa de transformação foram inoculadas em meio líquido LB/Ampicilina para mini extração do plasmídeo pBSK-L1H16. Uma alíquota do cultivo foi preservada em glicerol 100% e o restante foi submetido à mini extração plasmidial (SAMBROOK *et al.*, 1989). Ao final, o DNA plasmidial foi ressuscitado em TE (pH 8) contendo RNase (20 µg/ml) para estoque a -20°C e posterior análise por eletroforese (item 5.2.2).

Novo inóculo do preservado de bactérias recombinantes foi feito para extração do plasmídio pBSK-L1H16 em média escala, empregando o *Qiagen Plasmid Midi Kit*. O material proveniente dessa extração foi empregado para obtenção do gene L1 mediante digestão enzimática com as enzimas XhoI e NotI. Após digestão dos fragmentos, a amostra proveniente da reação enzimática foi submetida à eletroforese (item 5.2.2) e o fragmento correspondente ao inserto foi excisado do gel de agarose para purificação com o *QIAquick Gel Extraction Kit*.

5.2.6 Obtenção do vetor pPICZAα

Linhagens de *E. coli* TOP10 previamente transformadas com a construção pPICZAα-L1B1 (JESUS, em andamento) e preservadas foram inoculadas em meio líquido LB *low salt*/ZeocinaTM, sob condições descritas no item 5.2.1, para cultivo e posterior extração

plasmidial em média escala com o *Qiagen Plasmid Midi Kit*. O material extraído foi digerido com as enzimas XhoI e NotI e empregado em eletroforese (item 5.2.2). O fragmento correspondente ao vetor pPICZA α foi excisado do gel de agarose para purificação com o *QIAquick Gel Extraction Kit*.

5.2.7 Clonagem do gene L1 de HPV-16 em vetor pPICZA α

Em seguida à purificação, o inserto L1 e o vetor pPICZA α foram submetidos a uma reação de ligação na proporção de 3:1 (vetor:inserto) com a enzima T4 DNA ligase, seguindo recomendações do fabricante. Após inativação da ligase, a reação de ligação foi utilizada para transformação de bactérias *E. coli* TOP10 competentes pelo sistema de CaCl₂ (SAMBROOK *et al.*, 1989). Os transformantes foram semeados em placa LB *low salt*/ZeocinaTM e incubadas sob condições previamente descritas (item 5.2.1).

As colônias crescidas na placa de transformação foram repicadas para novas placas LB *low salt*/ZeocinaTM. Para varredura dos repiques recombinantes, isto é, contendo o cassete de expressão, foi realizada PCR de colônia com três pares de *primers*: os pares L1H16 e L1H16int e o par AOX1 (Invitrogen®), este último anelando nas regiões inicial e de terminação do promotor P_{AOX1} do vetor pPICZA α (tabela 2). Um terceiro *primer* foi introduzido nas análises, o qual anela na região do fator- α de sinalização para secreção (tabela 2). Nesse intuito, os transformantes foram ressuspensos em água MilliQ e submetidos à lise térmica por 3min a 95°C. Após essa etapa de fragmentação da parede celular, uma alíquota desse material foi aplicada em uma reação de PCR convencional contendo *Taq DNA Polimerase Master Mix* e os respectivos *primers*, sob a seguinte ciclagem térmica: desnaturação inicial a 95°C por 5min, 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1min, anelamento a 54°C por 1min e extensão a 72°C por 1min, e extensão final a 72°C por 7min.

Tabela 2. Sequências dos *primers* AOX1 e fator- α utilizados para confirmação da obtenção do cassete de expressão pPICZA α -L1H16.

<i>Primers</i> AOX1	Sequência 5'-3'
<i>Forward</i>	GACTGGTTCCAATTGACAAGC
<i>Reverse</i>	GCAAATGGCATTCTGACATCC
<i>Primers</i> fator- α	Sequência 5'-3'
<i>Forward</i>	TACTATTGCCAGCATTGCTGC

Paralelamente, a mesma alça utilizada para ressuspender os transformantes em água MilliQ (PCR de colônia) foi utilizada para inoculá-las em meio líquido LB *low salt*/ZeocinaTM. Após cultivo por toda noite sob condições adequadas (item 5.2.1), esses transformantes foram submetidos à mini extração plasmidial (SAMBROOK *et al.*, 1989) e o material extraído foi analisado por digestão enzimática e PCR a fim de confirmar a correta obtenção do cassete de expressão pPICZA α -L1H16. Uma alíquota dessa extração foi submetida à sequenciamento no Núcleo Integrado de Tecnologia do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (NIT/CPqAM) com os *primers* previamente descritos e de acordo com os padrões estabelecidos na referida unidade.

5.2.8 Transformação da levedura *Pichia pastoris* com as construções pPICZA α -L1H16 e pPGK Δ 3-L1H16

Preservados de *E. coli* TOP10 contendo os cassetes de expressão pPICZA α -L1H16 e pPGK Δ 3-L1H16 (COIMBRA, em andamento) foram cultivados em meio líquido LB *low salt*/ZeocinaTM e submetidos a extração plasmidial em máxima escala com o *QIAprep Spin Maxiprep kit*. Em seguida, os referidos fragmentos de DNA foram linearizados com a enzima SacI e, após análise por eletroforese (item 5.2.2), submetidos à purificação com o *QIAquick Gel Extraction Kit*. O mesmo procedimento foi realizado com os vetores pPGK Δ 3 e pPICZA α vazios (sem inserto).

Em paralelo, o protocolo de eletrocompetência das linhagens X-33 e KM71H de *P. pastoris*, adaptado de Scorer *et al* (1994), consistiu, inicialmente, na inoculação dessas leveduras em 5 ml de YPD e crescimento sob condições dispostas no item 5.2.1, até uma O.D.₆₀₀ igual a 6. A seguir, uma alíquota desse crescimento foi reinoculada em 200 ml de YPD até o crescimento atingir uma O.D.₆₀₀ entre 1,3-1,5. Após centrifugação do cultivo, foram realizadas lavagens do precipitado celular com água MilliQ estéril e sorbitol 1M gelados. O precipitado celular final das duas linhagens foi ressuspensionado em sorbitol 1M gelado e acondicionado em gelo. Aproximadamente 10 μ g das construções pPICZA α -L1H16 e pPGK Δ 3-L1H16 previamente purificadas foram alíquotadas junto com 80 μ l das linhagens X-33 eletrocompetentes em cubeta 0,2 cm, enquanto a linhagem KM71H foi alíquotada apenas com a construção pPICZA α -L1H16. Após administração do pulso elétrico, seguindo as determinações do fabricante (*Multiporator Eppendorf*, 1500 V por 5 ms), adicionou-se 1

ml de sorbitol 1M gelado às cubetas. Esse material foi, então, transferido para um tubo estéril de 15 ml e incubado por 2 horas a 30°C, sem agitação. Para aumentar o rendimento da transformação, 1 ml de YPD foi aliqotado e o tubo foi incubado por mais 2-3 horas a 30°C, sob agitação. Finalmente, alíquotas de 150 µl das reações de eletroporação foram semeadas em placas YPDS/ ZeocinaTM e cultivadas sob condições previamente descritas (item 5.2.1).

O mesmo procedimento foi realizado com os vetores pPICZAα e pPGKΔ3 vazios (sem inserto). As linhagens geradas X-33/pPICZAα, KM71H/pPICZAα e X-33/pPGKΔ3 representaram os controles negativos da expressão da proteína L1.

5.2.9 Seleção e varredura dos recombinantes de *Pichia pastoris* com múltiplas cópias

As colônias de leveduras recombinantes obtidas após eletroporação e semeio em placa YPDS/ZeoicinaTM foram repicadas para novas placas e avaliadas quanto à resistência a diferentes concentrações do antibiótico ZeocinaTM (100 µg/ml, 500 µg/ml e 1mg/ml). Esse ensaio permitiu selecionar e estimar o número de cópias dos cassetes de expressão integradas no genoma da levedura. Posteriormente, os clones com múltiplas cópias selecionados foram triados quanto aos níveis de expressão da proteína L1. Os ensaios empregados para tal foram o *Colony blotting* (GOODNOUGH *et al.*, 1993) e *Dot blotting* (KUCINSKAITE *et al.*, 2007), com algumas modificações.

Para o *Colony blotting*, novas placas YPDS/ZeoicinaTM contendo vários repiques dos clones X-33/pPICZAα-L1H16 e KM71H/pPICZAα-L1H16 foram incubadas sob condições adequadas por três dias. Em seguida, para expressão da proteína L1, esses clones foram induzidos mediante adição de alíquotas de metanol na tampa das placas a cada 24 horas para uma concentração final de 2% (tomando-se como referência o volume de meio plaqueado). Como a expressão dos clones X-33/pPGKΔ3-L1H16 é constitutiva, a placa contendo os mesmos foi apenas incubada para crescimento das colônias em placas MD. Após 72 horas, membranas PVDF recortadas foram dispostas sobre os repiques por três horas a 28°C e, depois, lavadas com tampão TBS-Tween até que todo o excesso de células fosse retirado. Depois, as membranas foram submetidas ao protocolo de imunodeteção previamente descrito e a reação de quimioluminescência foi visualizada em filme fotográfico (item 5.2.3). O mesmo procedimento foi desenvolvido com placas contendo as linhagens controle X-33/pPICZAα, KM71H/pPICZAα e X-33/pPGKΔ3.

O ensaio por *Dot blotting* foi desenvolvido apenas com os clones X-33/pPGKΔ3-L1H16 analisados previamente no *Colony blotting*, além da linhagem controle X-33/pPGKΔ, no intuito de dar suporte às análises de expressão anteriores. Estes clones foram cultivados em placa *deep well* com meio MD líquido por 72 horas e, a seguir, a placa foi centrifugada para obtenção do sobrenadante. As membranas de PVDF foram fixadas no *Dot blotter* e sensibilizadas com alíquotas de 100 µl do sobrenadante. A hibridização com os anticorpos e revelação da reação imunoquímica foi realizada como descrito no item 5.2.3.

5.2.10 Análise da expressão da proteína L1: cultivo e indução dos recombinantes em frascos

Baseando-se na varredura prévia por *Colony* e *Dot blotting*, clones com múltiplas cópias que apresentaram os sinais mais fortes de expressão foram cultivados em meio líquido para análise da expressão e integridade protéica por *Western blotting*. As induções iniciais foram executadas em escalas menores e, progressivamente, escalas maiores foram utilizadas visando purificação protéica. Excepcionalmente para os clones X-33/pPGKΔ3-L1H16, os quais haviam sido previamente cultivados em placas *deep well* e analisados por *Dot blotting*, não foram realizadas as mini induções em frascos, passando-se os ensaios destes clones imediatamente para média e maior escala.

Os detalhes das condições de cultivo já foram descritos no item 5.2.1. De maneira geral, para as mini induções, os clones X-33/pPICZAα-L1H16 e KM71H/pPICZAα-L1H16 (e as respectivas linhagens controle) foram primeiramente inoculados em 40 ml de meio YPD líquido para geração de biomassa. Para indução, as células foram centrifugadas por 5min a 1500 x g e ressuspensas em MM, num volume 10 vezes menor do que aquele empregado para obtenção de biomassa. Ao final da indução, os cultivos foram centrifugados a 1500 x g por 5min e o sobrenadante (meio de cultura) foi armazenado a -20°C.

Os ensaios por SDS-PAGE e *Western blotting* para estas induções em menor escala foram realizados sem nenhuma etapa prévia de precipitação protéica. Alíquotas dos sobrenadantes finais coletados foram aplicadas em SDS-PAGE para eletroforese, como já descrito no item 5.2.2. A seguir, as proteínas presentes no gel de poliacrilamida foram transferidas para uma membrana PVDF e analisadas por *Western blotting*, sob condições também já dispostas (item 5.2.3).

Os clones que apresentam maiores níveis de expressão foram selecionados para induções em média escala. As etapas de obtenção de biomassa e indução se mantiveram sem maiores alterações, mas empregando 100 ml e 20 ml de meio, respectivamente. O mesmo procedimento foi feito com os clones X-33/pPGK Δ 3-L1H16, salientando apenas que para estes últimos o meio empregado para geração de biomassa/expressão da proteína heteróloga foi o MD. Aliquotas dos sobrenadantes, provenientes de tempos distintos da indução, foram analisadas após precipitação protéica com TCA 100% (p/v) e acetona absoluta. Para isso, 1 ml dos sobrenadantes foi aliquotado em 200 μ l de TCA e precipitado por 2-3 horas a -20°C. A seguir, centrifugaram-se as amostras a 8000 x g por 30min a 4°C e os sobrenadantes foram descartados para, então, lavagem dos precipitados protéicos com acetona gelada. Após nova lavagem e centrifugação, os precipitados finais foram secados em centrífuga a vácuo por 5-10min e ressuspensos em 20 μ l do tampão desnaturante. Finalmente, as amostras precipitadas foram analisadas por SDS-PAGE e *Western blotting* como disposto no item 5.2.3.

Para as induções em maior escala, as etapas de obtenção de biomassa e indução se mantiveram sem maiores alterações, mas empregando 200 mL e 20 mL de meio, respectivamente. Desta vez, aproveitando-se dos maiores volumes analisados, foram coletadas alíquotas nos tempos T₀, T₂₄, T₄₈ e T₇₂ de indução para análise do perfil de expressão dos clones selecionados. As referidas alíquotas foram devidamente precipitadas com TCA e acetona absoluta e analisadas por SDS-PAGE e *Western blotting* (item 5.2.3).

Quando se julgou necessário, as membranas empregadas em *Western blotting* foram submetidas a protocolo de *stripping* para nova hibridização. Nesse intuito, realizou-se incubação das membranas em tampão de *stripping* (SDS 10%, Tris-HCl 0.5M pH 6.8, β -mercaptoetanol) a 60°C por 10min, por três vezes. Ao final da terceira incubação, as membranas foram lavadas com TBS-Tween em três etapas de 5min para, então, realização de novo protocolo de *Western blotting*.

5.2.11 Purificação da proteína L1

Uma fração das amostras de sobrenadante (10 mL) provenientes dos tempos T₄₈ (para o sistema com o promotor P_{PGK1}) e T₇₂ (para o sistema com o promotor P_{AOX1}) das induções dos clones em maior escala foi separada para purificação da proteína L1 por resina de níquel

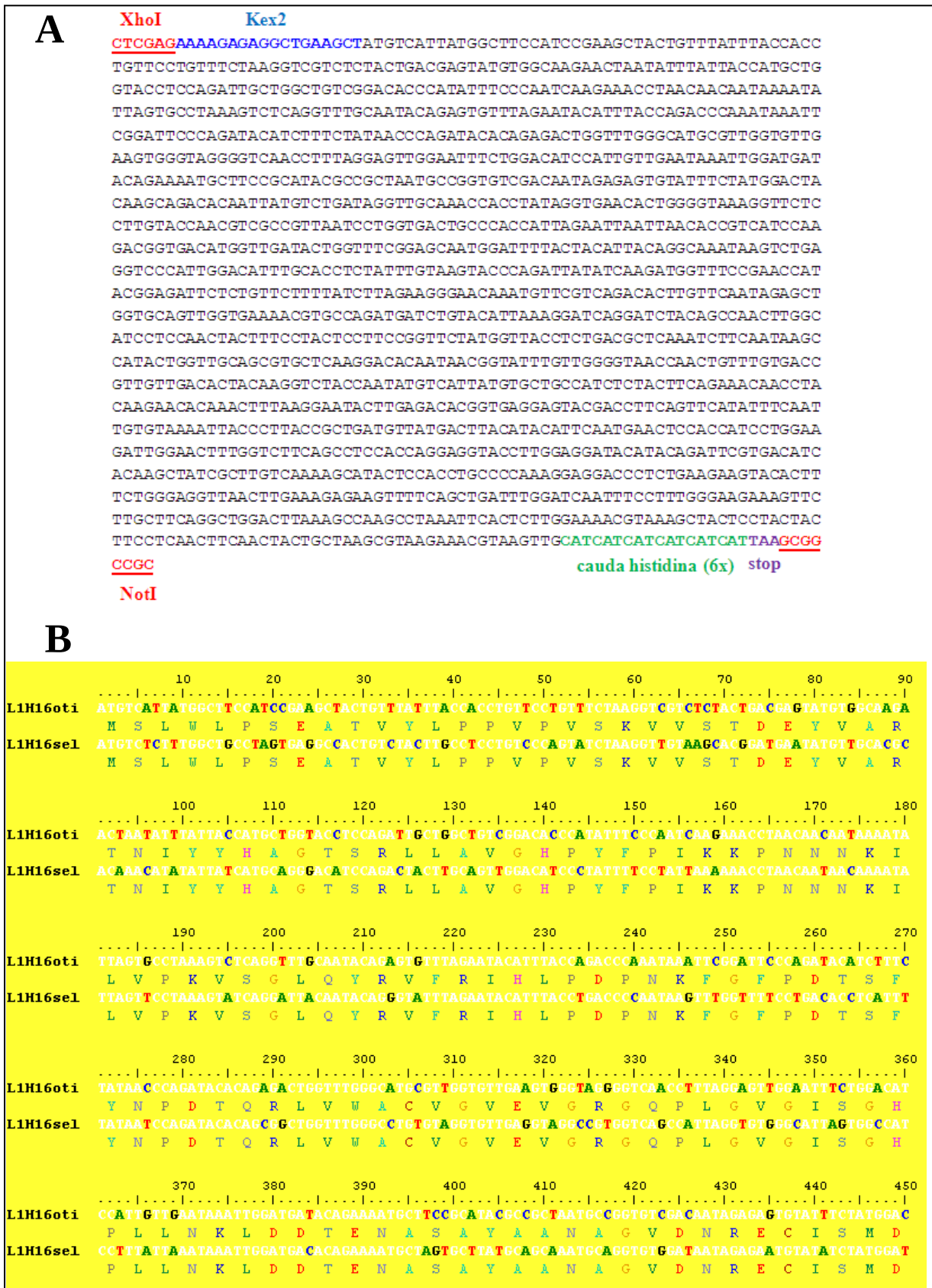
empregando o *ProBond Purification System* (Invitrogen[®]), segundo recomendações do fabricante.

Antes de aplicar todo o volume na resina, uma pequena alíquota desses sobrenadantes foi precipitada com TCA, aplicada em SDS-PAGE e corada com nitrato de prata (AgNO_3) para visualização do extrato protéico extracelular dos clones. Nesse intuito, o gel de poliacrilamida foi inicialmente corado com *Comassie* e descorado com solução descorante (etapa de fixação). Em seguida às lavagens com etanol 30% e água destilada, procedeu-se incubação em reagente tiosulfato de sódio para sensibilização do gel. Nova lavagem com água foi executada e, posteriormente, o gel de poliacrilamida foi incubado em solução de AgNO_3 . Após a terceira lavagem, a revelação da reação foi feita através de incubação em solução de carbonato de sódio. Quando as bandas protéicas tornaram-se visíveis, prosseguiu-se com nova lavagem e parada da reação com adição de solução de glicina. Em paralelo, o material proveniente da purificação com resina foi, depois, analisado por SDS-PAGE e *Western blotting*.

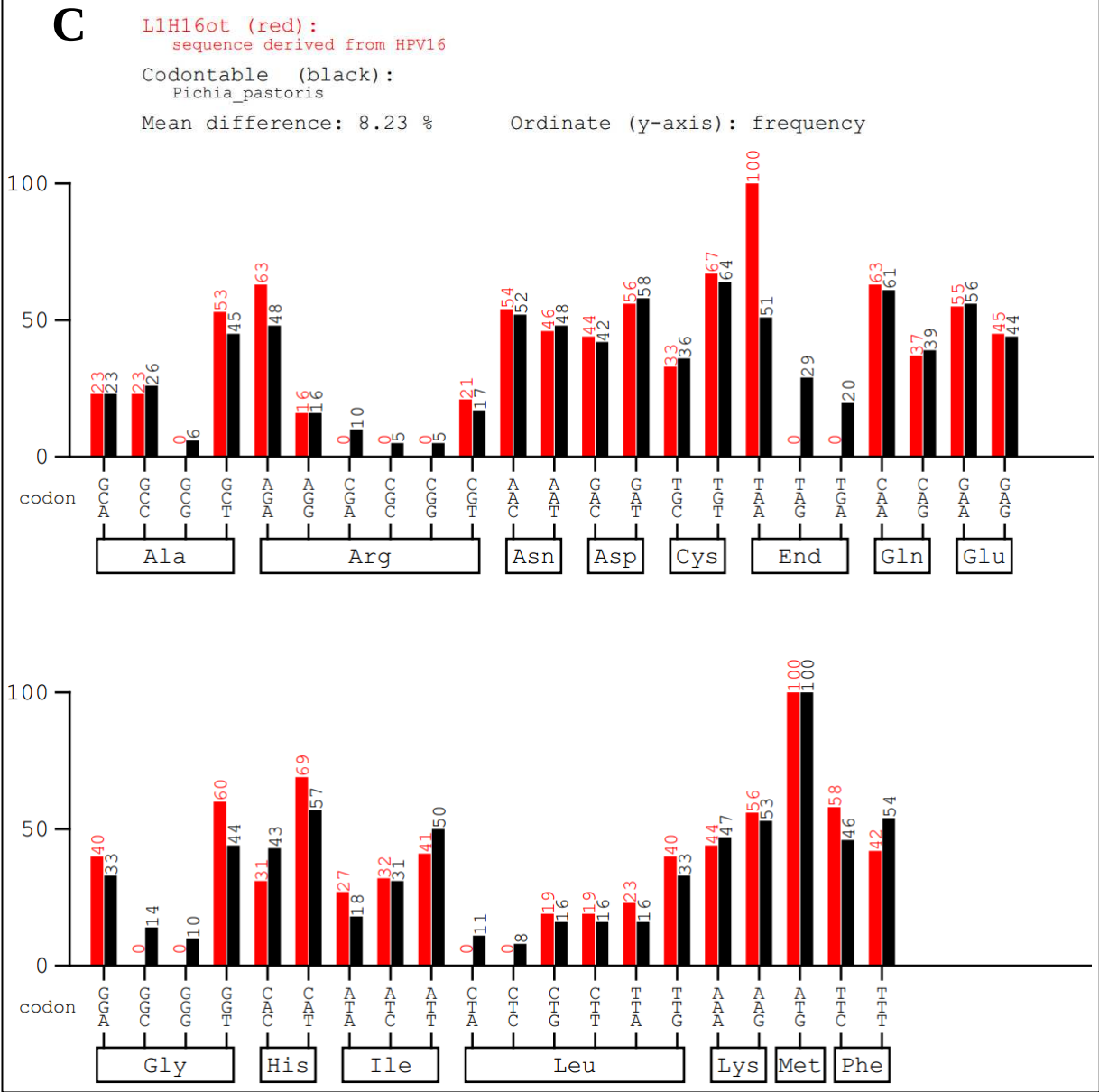
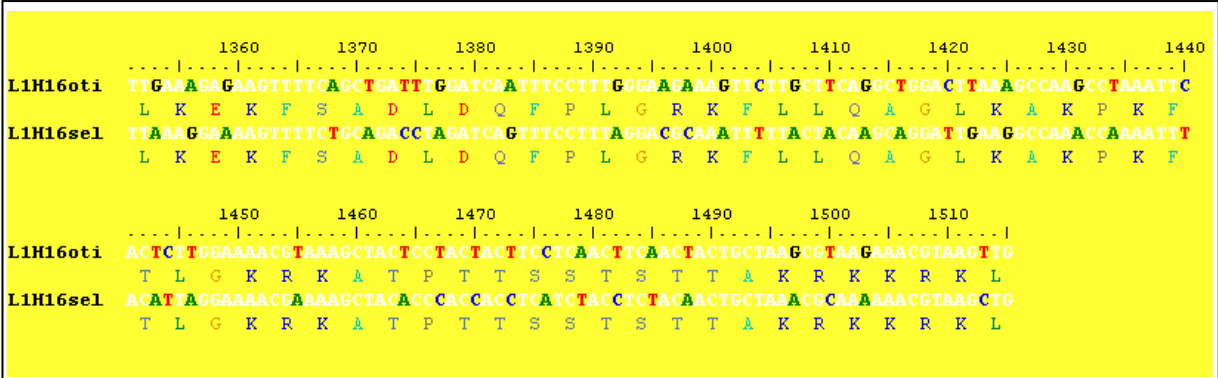
6. RESULTADOS

6.1 Desenho e síntese do gene L1 de HPV-16

O gene L1 sintetizado de HPV-16 possui 1568 pb e 80% de identidade com o gene L1 original (selvagem), de maneira que as mudanças introduzidas na sua composição nucleotídica constituem mutações silenciosas e, portanto, a composição aminoacídica da proteína recombinante é idêntica à nativa viral (figura 13B). A diferença entre os códons presentes no gene sintético e aqueles preferencialmente empregados pela levedura *P. pastoris* é de 8,23%, (contra 14,36% para o gene selvagem) (figura 14C). O conteúdo G+C (42,47%) foi mantido próximo àquele presente nas proteínas nativas de *P. pastoris* (42,73%) e o conteúdo A+T foi diminuído de 61,29% (gene nativo) para 57,53%. À sequência codificadora do gene L1, foram adicionados sítios de restrição para clonagem (XhoI e NotI), sítio para clivagem proteolítica pela protease Kex2, uma causa de poli-histidina e o códon de parada (figura 14A). O gene foi sintetizado e clonado em vetor pBlueScript.



	460	470	480	490	500	510	520	530	540																					
L1H16oti	TACAA	GCA	GACACA	TATGT	CTGAT	AGGTT	GCAAA	ACCAC	CTATAGG	TGAAC	ACTGGGG	TAAAGG	TTCT	CTT	TGTACCA	ACG	CGCG	CT	T											
	Y	K	Q	T	Q	L	C	L	I	G	C	K	P	P	I	G	E	H	W	G	K	G	S	P	C	T	N	V	A	V
L1H16sel	TACAA	ACA	ACACA	TATGT	TCTAAT	TGGTT	GCAAA	ACCAC	CTATAGG	TGAAC	ACTGGGG	CAAAAG	GATC	CCGAT	TGTACCA	ATG	TTCG	AGTA												
	Y	K	Q	T	Q	L	C	L	I	G	C	K	P	P	I	G	E	H	W	G	K	G	S	P	C	T	N	V	A	V
	550	560	570	580	590	600	610	620	630																					
L1H16oti	AATCC	TGGTGA	CTGCC	ACCATT	AGGATTA	TAAAT	TAAAC	ACGTC	ATCCA	AGAC	GGTGA	CATGGT	TGATAC	TGGTT	CCGAG	CAAT	GGAT	TTTT												
	N	P	G	D	C	P	P	L	E	L	I	N	T	V	I	Q	D	G	D	M	V	D	T	G	F	G	A	M	D	F
L1H16sel	AATCC	AGGTGA	TGTC	CACCATT	AGGTTA	ATAA	TAAAC	ACGTC	TATTC	AGGAT	TGGTGA	TATGGT	TGATCT	GGCTTT	TGGT	GCTAT	GGAC	TTTT												
	N	P	G	D	C	P	P	L	E	L	I	N	T	V	I	Q	D	G	D	M	V	D	T	G	F	G	A	M	D	F
	640	650	660	670	680	690	700	710	720																					
L1H16oti	ACTAC	ATTAC	AGGCA	AAATA	AGTCT	GAGG	TCCCAT	TGGAC	ATTTC	ACCTCT	ATTGTA	AGTAC	CCAG	ATTATAT	CAGAT	GGTT	TC	CGAA												
	T	T	L	Q	A	N	K	S	E	V	P	L	D	I	C	T	S	I	C	K	Y	P	D	Y	I	K	M	V	S	E
L1H16sel	ACTAC	ATTAC	AGGCA	AAATA	AGTCT	GAGG	TCCCAT	TGGAT	TTTGT	TACAT	CTATTT	TGC	AAATAT	TCC	CAGATTATAT	TAAAT	GGT	GT	CA	GA										
	T	T	L	Q	A	N	K	S	E	V	P	L	D	I	C	T	S	I	C	K	Y	P	D	Y	I	K	M	V	S	E
	730	740	750	760	770	780	790	800	810																					
L1H16oti	CCATA	CGGAG	TTCT	CTCT	TTTAT	CTTAG	AGGGA	CAAA	TGTT	CGT	CAGAC	CTTGT	CAAT	AGCT	GGTGC	AGTT	GGTGA	AAAC												
	P	Y	G	D	S	L	F	F	Y	L	R	R	E	Q	M	F	V	R	H	L	F	N	R	A	G	A	V	G	E	N
L1H16sel	CCATA	TGG	CGA	CAGCT	TATTT	TTTAT	TTT	ACG	AGGGA	CAAA	TGTT	TGTT	TAGACAT	TTTAT	TAAAT	AGGCT	GGTGC	TGTT	GGTGA	AAAT										
	P	Y	G	D	S	L	F	F	Y	L	R	R	E	Q	M	F	V	R	H	L	F	N	R	A	G	A	V	G	E	N
	820	830	840	850	860	870	880	890	900																					
L1H16oti	GTG	CCAGAT	GATCT	GTAC	ATTAA	AGCAT	CAGGA	TCTAC	AGCA	CACT	TGGCAT	CTCT	CAAC	TACT	TTTCT	ACT	CCCT	TCC	GGTT	CTAT	GGTT									
	V	P	D	D	L	Y	I	K	G	S	G	S	T	A	N	L	A	S	S	N	Y	F	P	T	P	S	G	S	M	V
L1H16sel	GTAC	CAGAT	CGAT	TATAC	ATTAA	AGGCT	CTG	GGCT	CTACT	TGCA	AAAT	TAG	CCAG	TTCA	AAAT	TATTT	TCT	TAC	ACCT	AGT	GGTT	CTAT	GGTT							
	V	P	D	D	L	Y	I	K	G	S	G	S	T	A	N	L	A	S	S	N	Y	F	P	T	P	S	G	S	M	V
	910	920	930	940	950	960	970	980	990																					
L1H16oti	ACCTC	TGAC	GTCAA	ATCTT	CAATA	AGGATA	CTGGT	TGAC	GGTGT	CAAG	ACACA	ATAA	CGGT	ATTG	TGGGG	TAA	CACT	GT												
	T	S	D	A	Q	I	F	N	K	P	Y	W	L	Q	R	A	Q	G	H	N	N	G	I	C	W	G	N	Q	L	F
L1H16sel	ACCTC	TGAT	GCC	AAATAT	TCAATA	AGGATA	CTGGT	TGAC	AGGAT	CAAGG	CCCA	ATAA	TGGC	ATTG	TGGGG	TAA	CACT	GT												
	T	S	D	A	Q	I	F	N	K	P	Y	W	L	Q	R	A	Q	G	H	N	N	G	I	C	W	G	N	Q	L	F
	1000	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080																					
L1H16oti	GTG	AC	CGTTG	TGTA	CACTAC	AGGTC	TACCA	ATATG	TGCTAT	TGCTG	CCATCT	CTACT	TCAG	AAAC	CACTAC	CAAG	AAAC	CACTTT												
	V	T	V	V	D	T	T	R	S	T	N	M	S	L	C	A	A	I	S	T	S	E	T	T	Y	K	N	T	N	F
L1H16sel	GTT	TAC	TGTTG	TGTA	TACTAC	CCAGT	TACCA	ATATG	TGCTAT	TGCTG	CCATAT	CTACT	TCAG	AAAC	TACAT	TAAAA	TACT	TAACTTT												
	V	T	V	V	D	T	T	R	S	T	N	M	S	L	C	A	A	I	S	T	S	E	T	T	Y	K	N	T	N	F
	1090	1100	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170																					
L1H16oti	AAGGA	TACTT	AGACAC	CGGTG	AGGAG	GTAC	CACTT	CAGTT	CATAT	TTCAAT	TGTG	TAAAT	TACCT	TACCG	TGAT	TGTAT	GACTT	TAC												
	K	E	Y	L	R	H	G	E	E	Y	D	L	Q	F	I	F	Q	L	C	K	I	T	L	T	A	D	V	M	T	Y
L1H16sel	AAGGA	TACTT	ACGACAT	GGG	GAGGA	ATATG	D	L	T	CA	GGTT	TATTT	TTT	CAAC	GTG	CCAAA	TACCTT	AACTG	CAGAC	CTT	TATG	ACATAC								
	K	E	Y	L	R	H	G	E	E	Y	D	L	Q	F	I	F	Q	L	C	K	I	T	L	T	A	D	V	M	T	Y
	1180	1190	1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260																					
L1H16oti	ATACAT	TCAAT	GAACT	CCAC	CACT	CCGGA	AGATT	GGAACT	TTGGT	CTTCA	GCCTC	CA	CCAG	GAGT	ACCTT	GAGG	ATAC	CAGATT												
	I	H	S	M	N	S	T	I	L	E	D	W	N	F	G	L	Q	P	P	P	G	G	T	L	E	D	T	Y	R	F
L1H16sel	ATACAT	TATG	AAAT	TCCACT	TTT	TGGAG	CACT	GGAA	TTT	TGGT	CTACA	CCCT	CC	CCAG	GAGG	CCAC	AC	TAGATAC	TTAT	GACTTT										
	I	H	S	M	N	S	T	I	L	E	D	W	N	F	G	L	Q	P	P	P	G	G	T	L	E	D	T	Y	R	F
	1270	1280	1290	1300	1310	1320	1330	1340	1350																					
L1H16oti	GTG	ACAT	CAAGC	TATCG	TTGT	CAAAA	GCATAC	CTCC	ACCTG	CCCA	AGGAG	GA	CCCT	CTG	AGAA	GTAC	ACTTT	TCGGG	AGT	TAA										
	V	T	S	Q	A	I	A	C	Q	K	H	T	P	P	A	P	K	E	D	P	L	K	K	Y	T	F	W	E	V	N
L1H16sel	GTA	ACAT	CCA	GGCAAT	TG	TTGT	CAAAA	CATAC	ACCT	CCAG	CACT	TAA	AGAGAT	CCCT	T	AAAA	TACACT	TTT	TCGGG	AGT	AAAT									
	V	T	S	Q	A	I	A	C	Q	K	H	T	P	P	A	P	K	E	D	P	L	K	K	Y	T	F	W	E	V	N



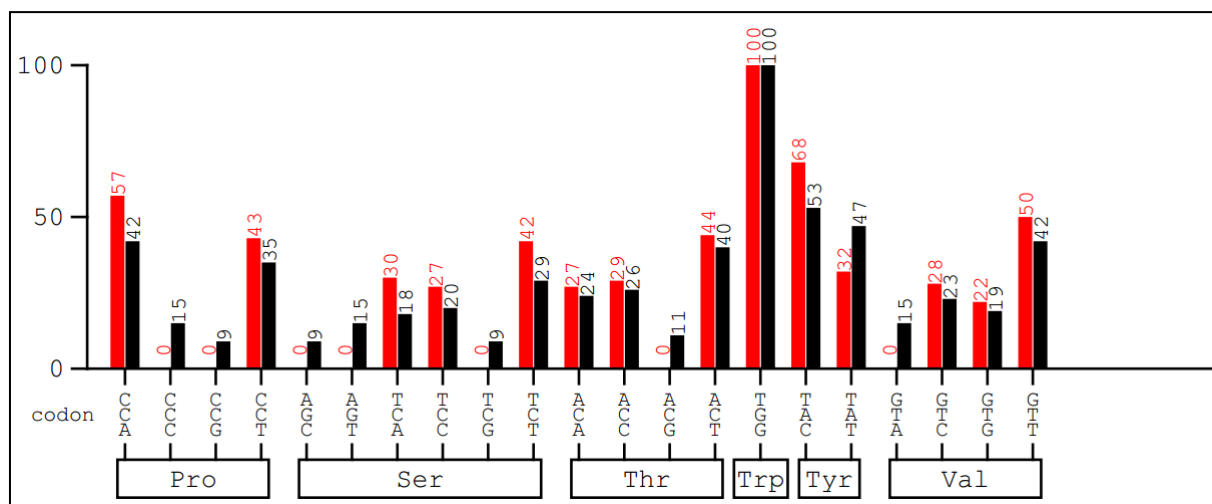


Figura 14. Representação esquemática da sequência do gene L1 sintético de HPV-16 e análises *in silico*. (A) O gene L1 sintético sequenciado e caracterizado quanto às regiões adicionadas: em vermelho estão salientados os sítios de clonagem das enzimas XhoI e NotI; em azul está demonstrado a sequência para clivagem proteolítica pela Kex2; em verde, a cauda de poli-histidina (6x) adicionada; em roxo, o códon de parada da tradução. (B) A similaridade entre as sequências dos genes L1 selvagem e sintético é demonstrada, com destaque para as bases que foram alteradas após otimização dos códons. (C) Comparação entre a utilização preferencial de códons de *P. pastoris* e o *codon usage* do gene L1 sintético.

6.2 Construção do cassete de expressão pPICZA α -L1H16

A estratégia geral de clonagem está esquematizada na figura 15. Para clonagem do gene L1 sintético em vetor de expressão pPICZA α , o plasmídeo pBSK-L1H16 contendo o inserto de interesse foi extraído de um cultivo de bactérias *E. coli* TOP10 transformadas. O material proveniente da extração foi empregado em digestão enzimática com as enzimas XhoI e NotI para liberação do gene L1 (figura 16A). Em paralelo, a construção pPICZA α -L1B1 (JESUS, em andamento) foi extraída de linhagens bacterianas previamente transformadas e submetida à digestão enzimática com as referidas enzimas para obtenção do vetor de expressão pPICZA α (figura 16A). Após purificação dos fragmentos de interesse previamente digeridos (figura 16B), inserto e vetor foram submetidos a uma reação de ligação com a enzima T4 DNA ligase e alíquotas dessa reação foram utilizadas para transformação de bactérias *E. coli* TOP10 competentes.

As colônias transformantes obtidas foram inicialmente triadas por PCR de colônia com *primers* AOX1 (figura 16C), L1H16int (figura 16D), L1H16 (figura 16E), e fator- α /AOX1 reverso (figura 16F). Segundo o manual *EasySelectTM Pichia Expression Kit* (INVITROGEN, 2009), a utilização dos pares de *primers* AOX1 e fator- α /AOX1 reverso

possibilita a amplificação de fragmentos com 2.1 e 1.8 kb, respectivamente, a partir do cassete de expressão, como observado nas figuras 15C e 15F. Posteriormente, o plasmídio obtido após cultivo e extração desses transformantes foi analisado por digestão enzimática (figura 16G) e sequenciamento (figura 16H), visando confirmação da correta orientação do inserto L1 na construção molecular.

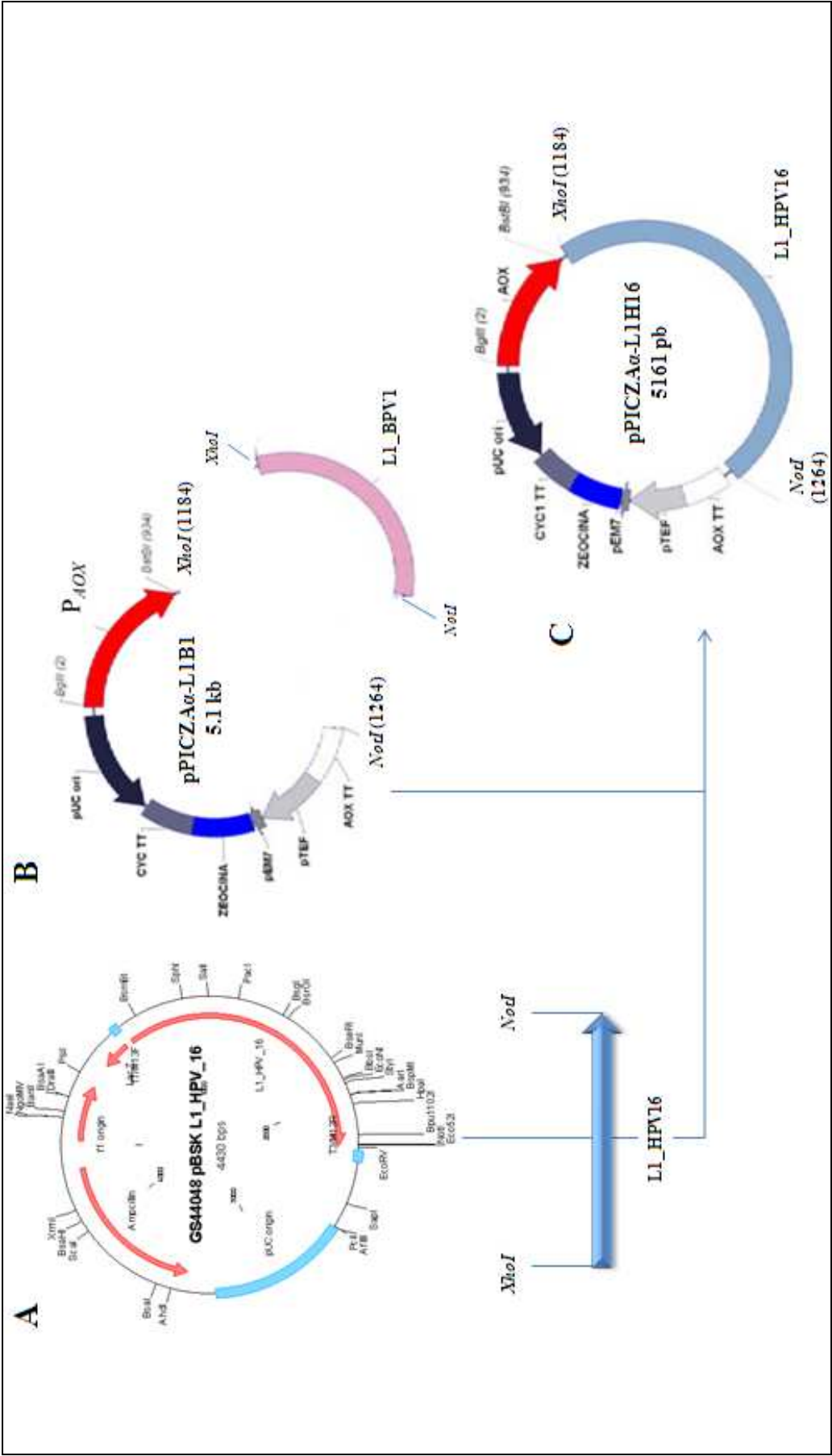


Figura 15. Ilustração esquemática da estratégia de construção do cassete de expressão pPICZAα-L1H16. (A) Mapa físico do plasmídeo pBSK-L1H16, do qual foi obtido o gene L1 mediante digestão com as enzimas XhoI e NotI. (B) Mapa físico do cassete de expressão pPICZAα-L1B1, do qual obteve-se o vetor de expressão pPICZAα mediante digestão com as enzimas citadas. (C) Clonagem do gene L1 de HPV-16 no vetor pPICZAα e construção do cassete de expressão de interesse.

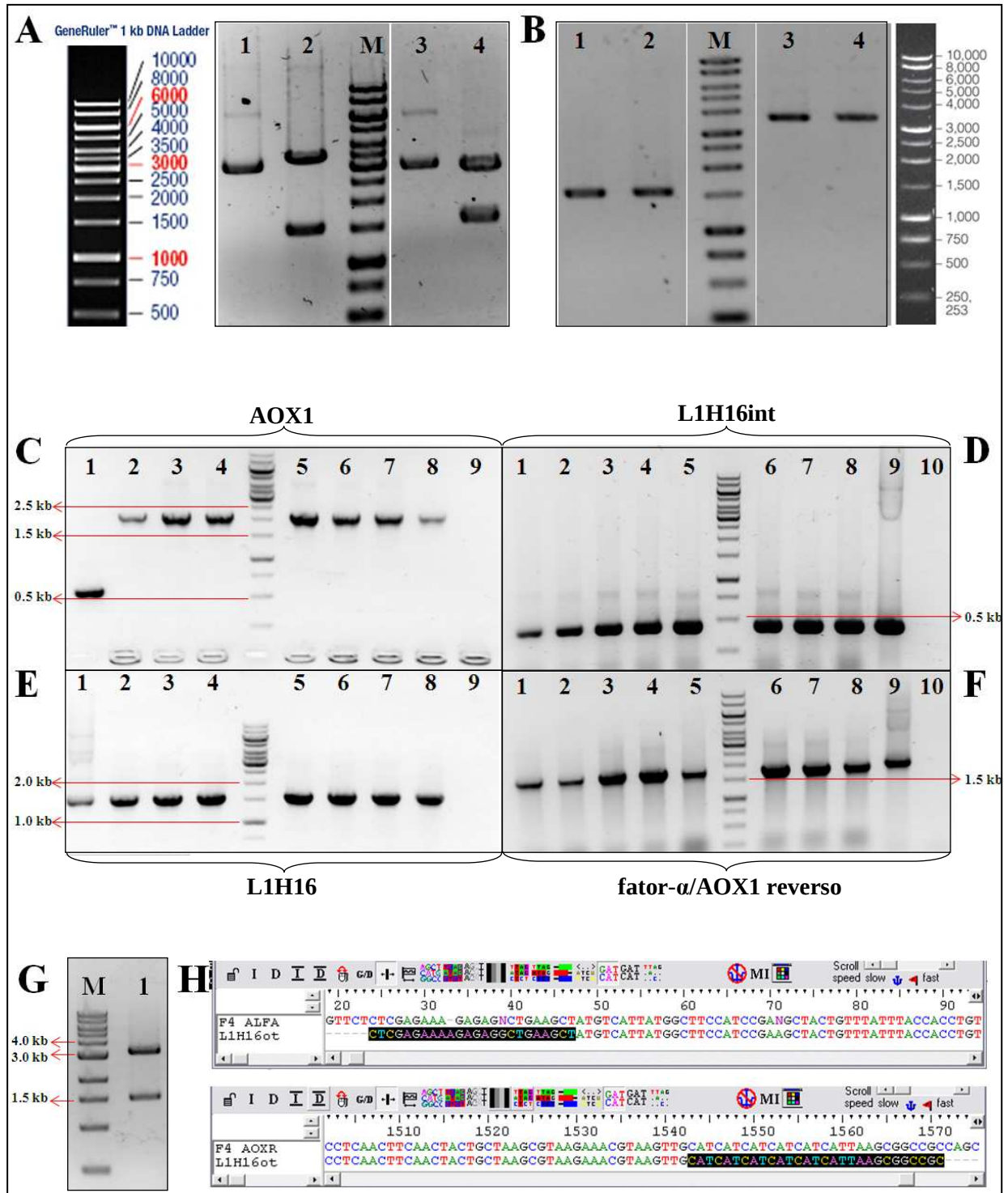
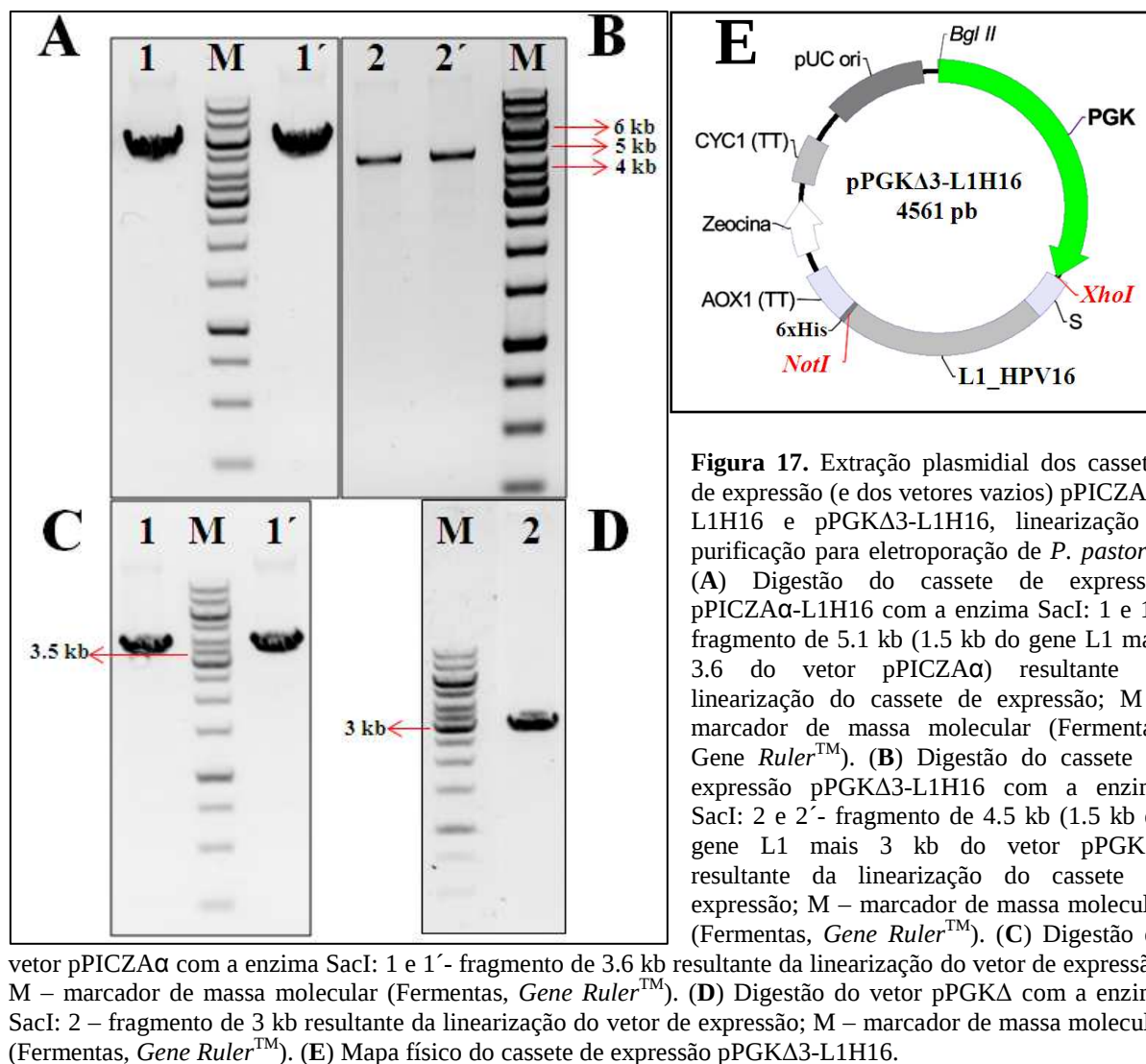


Figura 16. Construção do cassete de expressão pPICZAα-L1H16. (A) Eletroforese em gel de agarose com as digestões do cassete pPICZAα-L1B1 e do plasmídio pBSK-L1H16: 1 – pPICZAα-L1B1 circular; 2 – pPICZAα-L1H16 digerido com as enzimas XhoI e NotI para obtenção do vetor pPICZAα (~3.6 kb); 3 – pBSK-L1H16 circular; 4 – pBSK-L1H16 digerido com as enzimas XhoI e NotI para liberação do gene L1 (~1.5 kb); M – marcador de massa molecular *GeneRuler*™. (B) Eletroforese em gel de agarose das purificações do gene L1 e do vetor pPICZAα digeridos: 1 e 2 – gene L1 sintético (~1.5 kb); 3 e 4 – vetor pPICZAα (~3.6 kb); M – marcador de massa molecular (Promega, 1 kb DNA ladder). (C-F) Eletroforese em gel de agarose com as amostras submetidas à PCR de colônia com os respectivos pares de *primers* AOX1, L1H16int, L1H16 e fator-α/AOX1 reverso. Como controle positivo das reações, na amostra 1 das figuras C e F foram utilizadas as colônias de

bactérias transformadas com os vetores pPICZA α e pPICZA α -L1B1, respectivamente, enquanto que uma colônia de bactéria transformada com o vetor pBSK-L1H16 constituiu o controle positiva das figuras **D** e **E**. As últimas amostras (9 ou 10) dessas figuras representam o controle negativo das reações. As demais amostras se referem às colônias analisadas nas quais se observou a amplificação dos fragmentos de interesse. (**G**) Eletroforese em gel de agarose com a amostra de extração plasmidial digerida com as enzimas XhoI e NotI: 1 – digestão da construção pPICZA α -L1H16 para liberação do vetor (3.6 kb) e do inserto L1 (1.5 kb); M – marcador de massa molecular (Promega, 1k DNA ladder). (**H**) Alinhamento realizado pelo *BioEdit Sequence Alignment Editor* com as sequências do gene L1 otimizado e àquela proveniente do sequenciamento da construção pPICZA α -L1H16 com *primers* fator- α e AOX1 reverso. As regiões marcadas em preto correspondem aos sítios XhoI e Kex2 (no alinhamento superior) e à cauda de polihistidina, códon finalizador e sítio NotI (no alinhamento inferior) do gene L1 presente no cassete de expressão sequenciado.

6.3 Transformação da levedura *Pichia pastoris* com as construções pPICZA α -L1H16 e pPGK Δ 3-L1H16

Os cassetes de expressão pPICZA α -L1H16 e pPGK Δ 3-L1H16 (COIMBRA, em andamento) foram extraídos de bactérias *E. coli* TOP 10 recombinantes preservadas, através do emprego de kit comercial de máxima escala, e linearizados com a enzima SacI (figuras 16A e 16B). As linhagens X-33 e KM71H de *P. pastoris* competentes foram eletroporadas com os referidos cassetes, semeadas em placas YPDS/*Zeocina*TM e incubadas sob condições adequadas. O mesmo procedimento foi feito com os vetores pPICZA α e pPGK Δ 3 vazios (sem inserto) (figuras 17C e 17D).



6.4 Seleção e varredura dos recombinantes de *Pichia pastoris* com múltiplas cópias

Clones de leveduras com múltiplas cópias do cassete de expressão foram selecionados para cada linhagem recombinante X-33/pPICZAα-L1H16, KM71H/pPICZAα-L1H16 e X-33/pPGKΔ3-L1H16, mediante crescimento em diferentes concentrações de ZeocinaTM (100 µg/ml, 500 µg/ml e 1mg/ml). Nas figuras 18.1, 18.2, 19.1 e 19.2 estão demonstradas as colônias resistentes à 1mg/ml de ZeocinaTM.

Posteriormente, os ensaios de imunodetecção por *Colony blotting* (figuras 18.3, 18.4, 19.3 e 19.4) e *Dot blotting* (figura 19) foram realizados para selecionar previamente clones de

P. pastoris (múltiplas cópias) com maiores níveis de expressão da proteína L1. Ambas as análises também empregaram as linhagens controle transformadas com vetores de expressão vazios (sem inserto).

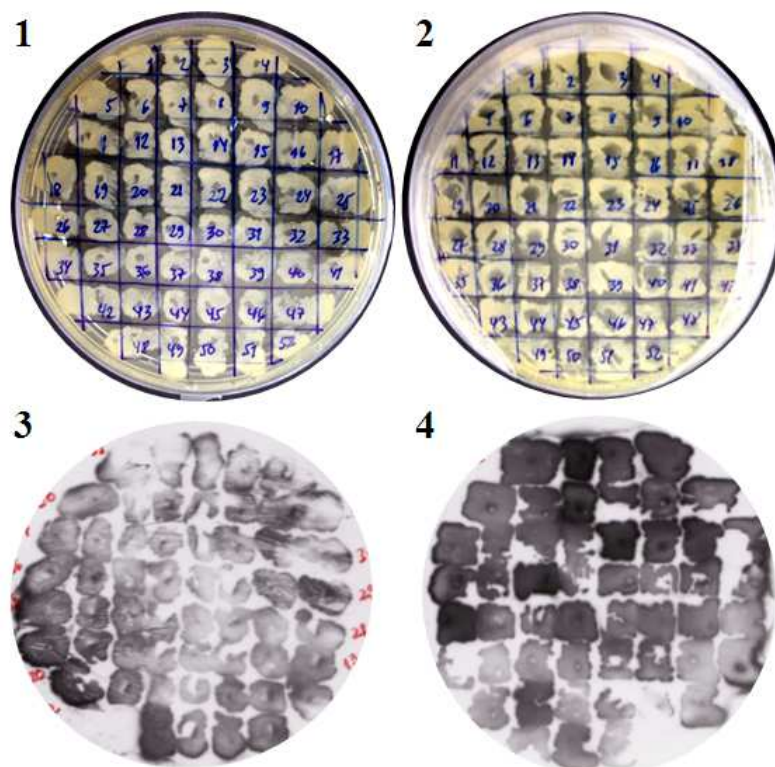


Figura 18. Seleção e varredura dos clones de *P. pastoris* com múltiplas cópias do cassete de expressão pPICZAα-L1H16. (1 e 2) Os clones X-33/pPICZAα-L1H16 e KM71H/pPICZAα-L1H16, respectivamente, foram semeados em placas contendo ZeocinaTM a 1 mg/ml para seleção de clones com múltiplas cópias. (3 e 4) As respectivas linhagens foram analisadas por *Colony blotting* para varredura dos clones com maiores níveis de expressão da proteína L1.

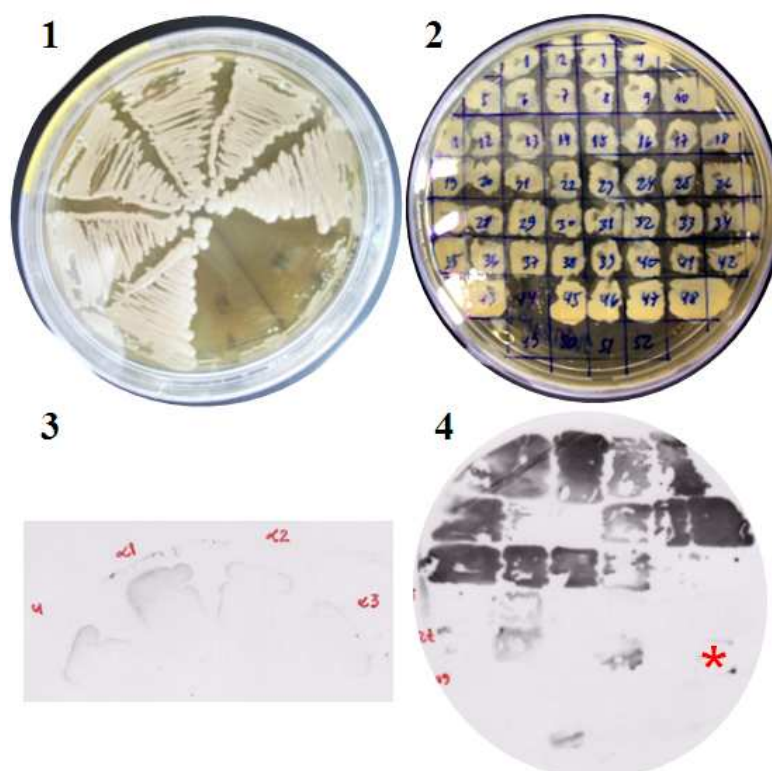


Figura 19. Seleção e varredura dos clones de *P. pastoris* com múltiplas cópias do cassete de expressão pPGKΔ3-L1H16. (1) Colônias das linhagens controle X-33/pPICZAα e KM71H/pPICZAα foram repicadas das placas de eletroporação. (2) Os clones X-33/pPGKΔ3-L1H16 foram semeados em placas contendo Zeocina™ a 1 mg/ml para seleção de clones com múltiplas cópias. (3 e 4) As respectivas linhagens foram analisadas por *Colony blotting* para varredura dos clones com maiores níveis de expressão. O asterisco em vermelho indica a linhagem controle X-33/pPGKΔ3.

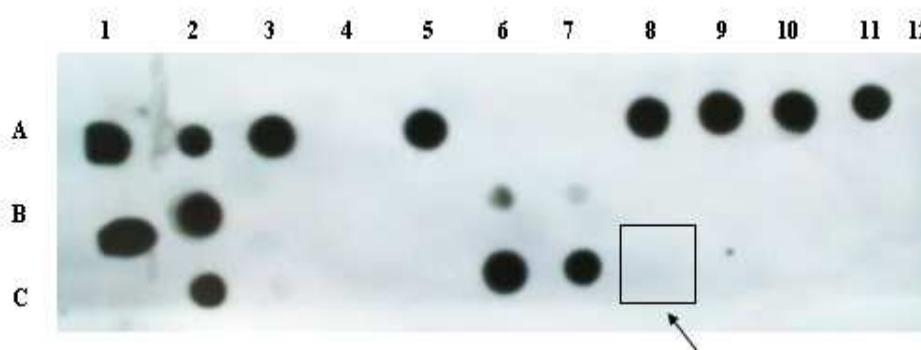


Figura 20. Varredura dos clones de *P. pastoris* com múltiplas cópias do cassete de expressão pPGKΔ3-L1H16 por *Dot blotting*. Em cada poço do *blotter* foram aplicados 100 µl do sobrenadante dos clones cultivados em *deep well*, bem como da linhagem controle negativo (poço 8C, marcado com uma seta). À semelhança do observado no *Colony blotting*, alguns clones analisados mostraram-se não reativos para detecção da proteína L1 no *Dot blotting*.

6.5 Análises da expressão da proteína L1: cultivo e indução dos recombinantes em frascos

Tomando-se como referencial os níveis de expressão observados por *Colony blotting* e *Dot blotting*, os clones selecionados de cada linhagem foram cultivados e induzidos em frascos. Como já comentado, inicialmente essas induções foram realizadas em pequena escala para que a proteína L1 fosse caracterizada por *Western blotting*, sem realização de etapas preliminares de precipitação protéica (figura 21). Excepcionalmente para os clones X-33/pPGKΔ3-L1H16, os quais haviam sido previamente cultivados em placas *deep well* e analisados por *Dot blotting*, não foram realizadas as mini induções em frascos, passando-se os ensaios imediatamente para média e maior escala. Embora as proteínas detectadas pelo anticorpo anti-L1 (CamVir[®]) tenham apresentado um massa molecular diferente do esperado para L1 (figura 21), as análises prosseguiram sem maiores alterações e considerando aqueles clones que tinham visualmente o sinal mais forte de detecção da proteína L1.

Nos ensaios de indução em média escala posteriores, desta vez empregando precipitação protéica, os clones selecionados apresentaram um padrão de detecção inesperado para a proteína recombinante (figura 22), sugestivo de degradação protéica. Concomitantemente, embora o anticorpo anti-L1 (CamVir[®]) tenha reconhecido uma proteína nativa extracelular de *P. pastoris* com massa molecular entre 40-45 kDa para todas as amostras (incluindo as linhagens controle), o sinal de detecção tipicamente associado aos clones de *P. pastoris* induzidos não foi visualizado para as linhagens controles (figuras 22A, 22B e 22C, poços 1, 1 e 7, respectivamente). Por fim, com as alíquotas de sobrenadante coletadas em diferentes tempos de indução, puderam-se notar diferenças nos níveis de expressão ao longo do cultivo para os promotores analisados.

Com o propósito de produzir material suficiente para purificação da proteína L1 em resina de afinidade (segundo recomendações do fabricante), a última indução em maior escala empregou maiores volumes de cultivo e, portanto, foram coletadas alíquotas do sobrenadante em quatro diferentes tempos de indução. Essas alíquotas foram submetidas à precipitação protéica e analisadas por *Western blotting* a fim de se investigar os níveis de expressão da proteína L1 ao longo de toda indução, mediante os diferentes sistemas e parâmetros de cultivo (figura 23). Devido à dificuldade de visualização da proteína de interesse, uma membrana contendo alíquotas provenientes do tempo T₇₂ de indução foi submetida à protocolo de

stripping para hibridização com anticorpo anti-L1 (CamVir®) numa nova diluição (figura 23F).

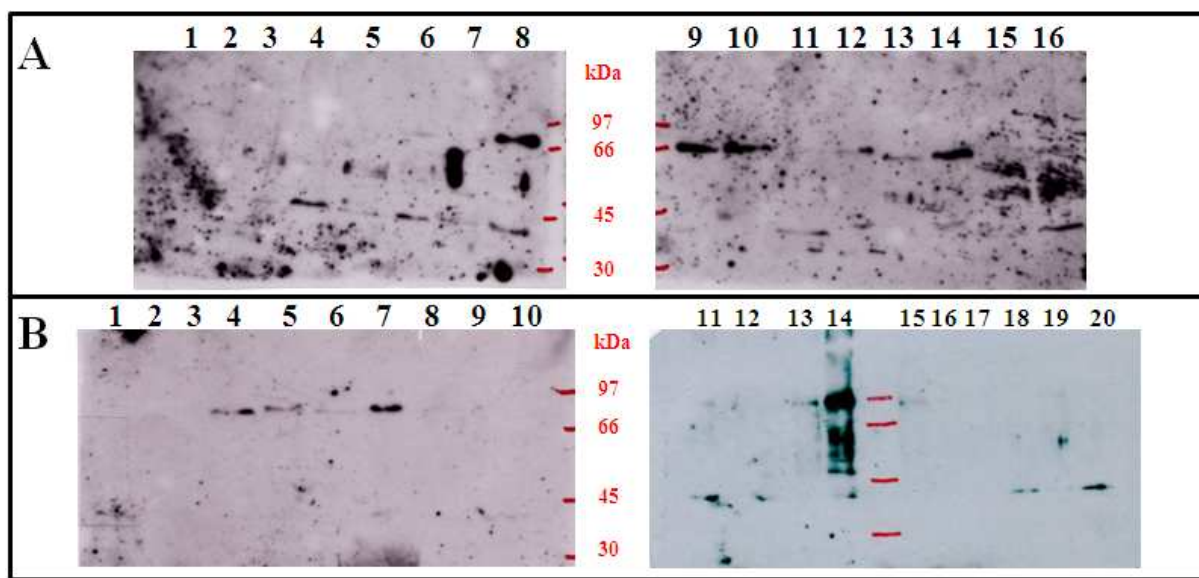


Figura 21. Western blotting dos sobrenadantes provenientes das mini induções com os clones de *P. pastoris*. (A) Clones X-33/pPICZA α -L1H16 induzidos com metanol a 2% por 48 horas: 1 a 16 – alíquotas de sobrenadante do tempo T₄₈. (B) Clones KM71H/pPICZA α -L1H16 induzidos com metanol a 4% por 48 horas: 1 a 20 – alíquotas de sobrenadante do tempo T₄₈.

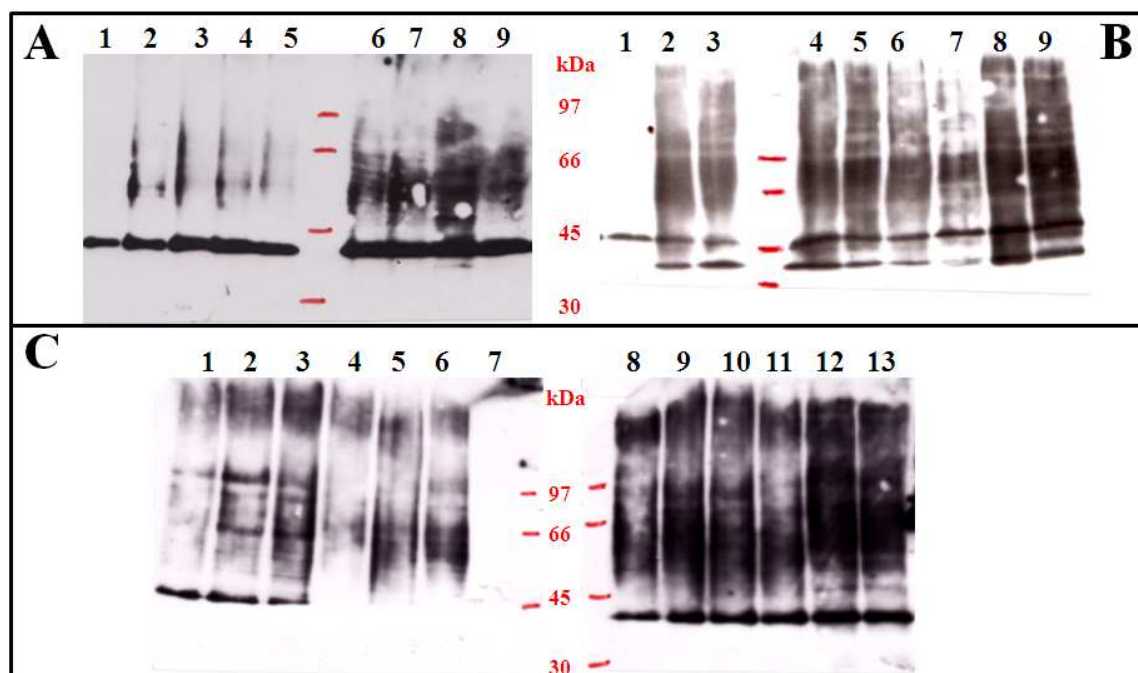


Figura 22. Western blotting dos sobrenadantes provenientes das induções em média escala com os clones de *P. pastoris* de ambos os sistemas, precipitados com TCA e acetona. (A) Clones X-33/pPICZA α -L1H16 induzidos

com metanol a 2% por 72 horas: 1 – sobrenadante da linhagem controle X-33/pPICZA α , coletado no tempo T₇₂; 2 a 5 – amostras de sobrenadante dos clones, coletadas no tempo T₄₈ de indução; 6 a 9 – amostras de sobrenadante dos clones, coletadas no tempo T₇₂ de indução. (B) Clones X-33/pPGK-L1H16 induzidos com glicose a 2% por 72 horas: 1 – sobrenadante da linhagem controle X-33/pPGK, coletado no tempo T₇₂; 2 a 5 – amostras de sobrenadante dos clones, coletadas no tempo T₄₈ de indução; 6 a 9 – amostras de sobrenadante dos clones, coletadas no tempo T₇₂ de indução. (C) Clones KM71H/pPICZA α -L1H16 induzidos com metanol a 4% por 72 horas: 1 a 6 – amostras de sobrenadantes dos clones, coletadas no tempo T₄₈ de indução; 7 – sobrenadante da linhagem controle KM71H/pPICZA α , coletado no tempo T₇₂; 8 a 13 – amostras de sobrenadante dos clones, coletadas no tempo T₇₂ de indução.

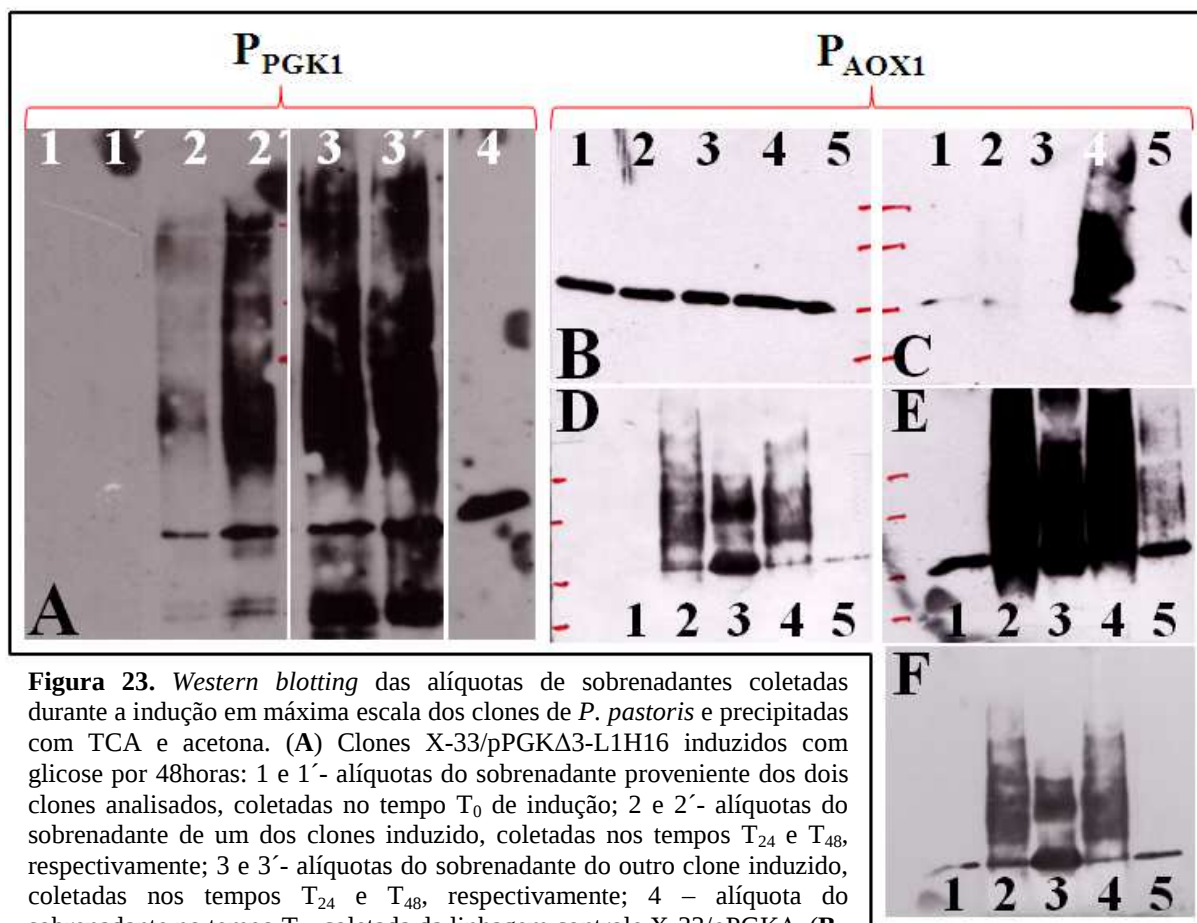


Figura 23. Western blotting das alíquotas de sobrenadantes coletadas durante a indução em máxima escala dos clones de *P. pastoris* e precipitadas com TCA e acetona. (A) Clones X-33/pPGK Δ 3-L1H16 induzidos com glicose por 48 horas: 1 e 1' – alíquotas do sobrenadante proveniente dos dois clones analisados, coletadas no tempo T₀ de indução; 2 e 2' – alíquotas do sobrenadante de um dos clones induzido, coletadas nos tempos T₂₄ e T₄₈, respectivamente; 3 e 3' – alíquotas do sobrenadante do outro clone induzido, coletadas nos tempos T₂₄ e T₄₈, respectivamente; 4 – alíquota do sobrenadante no tempo T₄₈ coletada da linhagem controle X-33/pPGK Δ . (B, C, D e E) Alíquotas dos tempos T₀, T₂₄, T₄₈ e T₇₂ de indução, respectivamente, provenientes dos clones X-33/pPICZA α -L1H16 e KM71H/pPICZA α -L1H16 induzidos com metanol: 1 – linhagem controle X-33/pPICZA α ; 2 e 3 – clones X-33/pPICZA α -L1H16; 4 e 5 – clones KM71H/pPICZA α -L1H16. (F) Stripping da membrana E para hibridização com o mesmo anticorpo anti-L1, mas numa diluição diferente: 1 – linhagem controle X-33/pPICZA α ; 2 e 3 – clones X-33/pPICZA α -L1H16; 4 e 5 – clones KM71H/pPICZA α -L1H16

6.6 Purificação da proteína L1

Alíquotas dos sobrenadantes nos tempos T_0 e T_{72} (para o sistema induzível) e T_{24} e T_{48} (para o sistema constitutivo) da indução em maior escala foram precipitadas com TCA, submetidas à eletroforese em SDS-PAGE e coradas com *Coomassie* e nitrato de prata (figura 24). Em paralelo, a fração (10 mL) de sobrenadante de interesse foi separada e utilizada para purificação em resina de níquel com kit comercial. O material final eluído da resina foi também analisado por SDS-PAGE, mediante coloração por nitrato de prata (figura 25A), e por *Western blotting* (figura 25B).

Os ensaios por SDS-PAGE permitiram a visualização de bandas entre 45 e 66 kDa a partir das amostras dos clones de *P. pastoris* induzidos, após a purificação com resina de níquel e coloração com nitrato de prata (figura 25A). Estas mesmas amostras purificadas foram empregadas em *Western blotting* com anticorpo anti-L1 (CamVir[®]), a partir do qual também foi possível identificar as referidas bandas (figura 25B). Contudo, é importante mencionar que a purificação com kit comercial não apresentou bom rendimento. As bandas da proteína L1 foram evidenciadas a partir do eluído purificado apenas após precipitação com TCA.

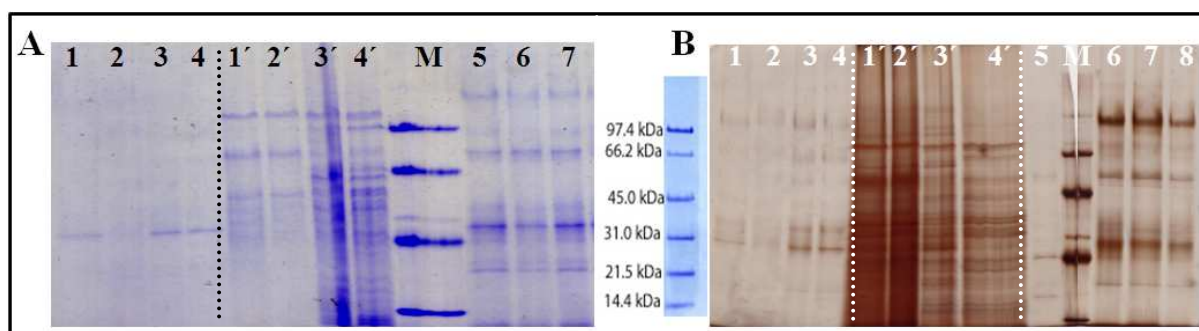


Figura 24. Análise por SDS-PAGE dos sobrenadantes provenientes das induções em maior escala. **(A)** Alíquotas do sobrenadante precipitadas com TCA e coradas com *Coomassie*: as amostras 1 e 2 se referem ao sobrenadante de dois clones X-33/pPICZA α L1H16 coletados no tempo T_0 de indução, enquanto as amostras 1' e 2' se tratam do sobrenadante desses clones no tempo T_{72} de indução; as amostras 3 e 4 se referem ao sobrenadante de dois clones KM71H/pPICZA α L1H16 coletados no tempo T_0 de indução, enquanto as amostras 3' e 4' se tratam do sobrenadante desses clones no tempo T_{72} de indução; 5 e 6 – alíquotas do clone pPGK Δ 3L1H16 nos tempos T_{24} e T_{48} , respectivamente; 7 – alíquota da linhagem controle X-33/pPGK Δ 3 no tempo T_{72} de indução. **(B)** As mesmas alíquotas da figura anterior, mas coradas com nitrato de prata: uma alíquota de sobrenadante referente à linhagem controle X-33/pPICZA α no tempo T_{72} de indução (amostra 5), foi adicionada à análise.

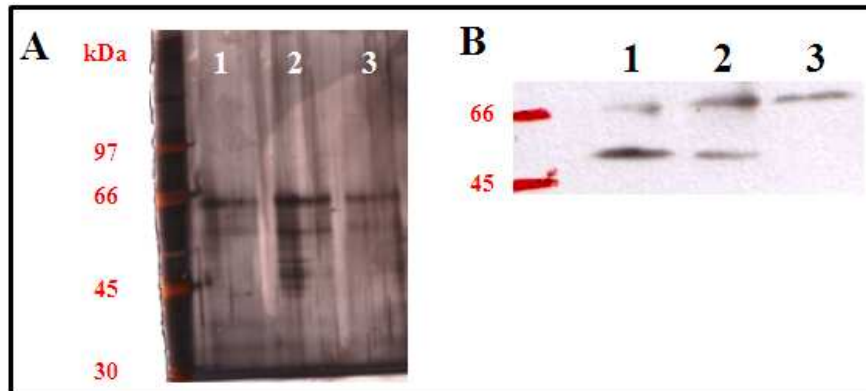


Figura 25. Análise por SDS-PAGE e *Western blotting* das eluições da purificação com resina de afinidade: (A) eluição do material purificado com resina de níquel, precipitadas com TCA e coradas com nitrato de prata: 1 - clone X-33/pPICZA α L1H16; 2 - clone KM71H/pPICZA α L1H16; 3 - clone X-33/pPGK Δ 3L1H16. (B) *Western blotting* com anticorpo anti-L1 das alíquotas da eluição do material purificado com resina de níquel e precipitadas com TCA: 1 - clone X-33/pPICZA α L1H16; 2 - clone KM71H/pPICZA α L1H16; 3 - clone X-33/pPGK Δ 3L1H16.

7. DISCUSSÃO

Além de representar a infecção sexualmente transmissível mais comum do mundo, a infecção pelo HPV constitui uma causa bem estabelecida para o desenvolvimento do câncer cervical (WHO, 2010) e um relevante fator para o desenvolvimento de cânceres anogenitais (ânus, vulva, vagina e pênis), de cabeça e de pescoço (WHO, 2010). Na última década, o HPV foi investigado e fortemente associado a outros cânceres não genitais, como laríngeo, esofágico e pulmonar (MAMMAS *et al.*, 2011). Embora tenha uma incidência menor do que as demais complicações clínicas, a papilomatose respiratória juvenil também é resultado da infecção pelo HPV e apresenta péssimo prognóstico devido às freqüentes recorrências e disseminações pelo trato aerodigestivo em crianças (ROSENBLATT *et al.*, 2005; GALLAGHER & DERKAY, 2008).

A introdução do teste de Papanicolau nos programas de prevenção dos Estados Unidos, Canadá e dos países Nórdicos Europeus foi capaz de reduzir drasticamente as taxas de incidência e mortalidade pelo câncer de colo uterino entre as décadas de 1950 e 1990 (NATUNEN *et al.*, 2011; JEMAL *et al.*, 2004). Infelizmente, os países em desenvolvimento, nos quais se estabelecem a grande maioria dos casos de lesões e tumores cervicais, apresentam grande dificuldade em realizar esses programas de maneira satisfatória.

Comparada às estratégias atuais de prevenção das lesões cervicais, a imunização mediante administração de vacinas profiláticas contra o HPV, antes do início da atividade sexual, pode oferecer uma intervenção mais barata, efetiva e logisticamente simples (KOLS & SHERRIS, 2000). Desde 2008, duas vacinas profiláticas estão licenciadas contra o HPV. Ambas têm o potencial de prevenir 70% dos casos de câncer cervical e 90% das verrugas genitais nos próximos 10-20 anos (KAUFMANN & SCHENEIDER, 2007). Num período mais curto (5-10 anos), estima-se que a implementação de um programa de vacinação efetivo contra os HPV de alto risco carcinogênico possa prevenir 30% das infecções causadas por esses vírus, bem como de 40-50% das anormalidades citológicas e 50-60% das NIC-3 (KAUFMANN & SCHENEIDER, 2007). Segundo modelos matemáticos, reduções significativas em todas as doenças relacionadas à infecção pelo HPV, incluindo aquelas não genitais, seriam observadas após 40-60 anos de vacinação (BARNABAS & GARNETT, 2004). Contudo, o impacto estimado dessas vacinas é comprometido pelos seus altos custos.

As vacinas licenciadas contra o HPV são resultado de um grande esforço para desenvolvimento de abordagens baseadas em subunidades protéicas, tendo em vista as dificuldades inerentes ao desenvolvimento de estratégias vacinais contra o HPV mediante técnicas convencionais. O obstáculo atual consiste no desenvolvimento de vacinas profiláticas de segunda geração contra o HPV, alternativas que ofereceriam uma ou mais vantagens sobre as vacinas atuais em termos de preço, eficácia, facilidade de administração e/ou capacidade de conferir proteção contra outros tipos virais (PATH, 2007).

Apesar da existência de sistemas de expressão da proteína L1 de HPV-16 em bactérias, como *E. coli*, tais processos são economicamente limitados em suas habilidades para produção de quantidades significativas de VLPs (LAI & MIDDELBERG, 2002). Vários autores têm relatado a expressão e purificação da proteína L1 de HPV-16 em *Pichia pastoris*, caracterizando esse sistema como uma potencial plataforma vacinal devido ao seu baixo custo e aos altos níveis atingidos de produção da proteína recombinante (LI *et al.*, 2003; LIU *et al.*, 2007; BAZAN *et al.*, 2009; KOTZÉ *et al.*, 2011; HANUMANTHA RAO *et al.*, 2011; JIANG *et al.*, 2011, COIMBRA *et al.*, 2011).

O presente trabalho teve como objetivo a obtenção de linhagens recombinantes de *P. pastoris* transformadas com os cassetes pPICZA α -L1H16 e pPGK Δ 3-L1H16 para avaliação da expressão induzida e constitutiva, respectivamente, da proteína L1 de HPV-16. Diferentemente do trabalho de Coimbra *et al* (2011), utilizamos um gene com códons otimizados para expressão nesta levedura metilotrófica. Pela primeira vez, investigamos e relatamos a produção extracelular da proteína L1 de HPV-16 sob controle do promotor constitutivo P_{PGK1} de *P. pastoris*, como alternativa ao sistema comercial baseado no promotor induzível P_{AOX1}.

Os trabalhos envolvendo a expressão da proteína L1 de HPV em *P. pastoris* têm explorado diferentes estratégias de produção, embora todas estejam sujeitas à regulação pelo mesmo promotor induzível P_{AOX1}. Curiosamente, alguns deles mostram resultados contraditórios. Por exemplo, Li *et al* (2003) relataram a necessidade de otimização de códons para expressão intracelular do gene L1 de HPV-6, enquanto Liu *et al* (2007) obtiveram sucesso na produção da proteína L1 de HPV-16 mediante emprego de um gene nativo (sem códons otimizados) através da via extracelular; Kotzé *et al* (2011) apenas obtiveram sucesso na expressão intracelular do gene L1 otimizado de HPV-16 após utilizarem um biorreator para indução; Bazan *et al* (2009) relataram expressão da proteína L1 de HPV-16 em frascos

através de um sistema episomal mas o êxito somente foi atingido após substituição de um gene selvagem por outro otimizado (BAZAN *et al.*, 2009); recentemente, tanto a expressão intracelular do gene L1 otimizado de HPV-58 quanto de HPV tipos -16 e -18 foram relatadas em frasco, mediante vetores integrativos (HANUMANTHA RAO *et al.*, 2011; JIANG *et al.*, 2011).

Nenhum dos trabalhos citados mencionou a análise de clones com múltiplas cópias do gene L1 integrado ao genoma do hospedeiro. Considerando que os autores não avaliaram se os clones induzidos possuíam várias cópias do cassete ou não, talvez isso possa explicar a variação nos níveis de expressão dessa proteína em *P. pastoris*. No caso particular de Bazan *et al* (2009), embora a expressão da proteína L1 tenha ocorrido com sucesso através de várias cópias do vetor construído, trata-se de um sistema não integrativo, o qual tem sido associado à geração de linhagens recombinantes geneticamente instáveis (CREGG *et al.*, 1985; HONG *et al.*, 2006; ZHU *et al.*, 2009; BAZAN *et al.*, 2009). O referido grupo tem investido, atualmente, no desenvolvimento de vetores integrativos para *P. pastoris* contendo sequências de DNA ribossomal (rDNA) de *Hansenula polymorpha* e o promotor P_{AOX1} (SILVA, 2010). Isso proporcionaria o desenvolvimento de linhagens com múltiplas cópias do gene heterólogo integradas nas regiões de rDNA, mas ainda estando a expressão dependente da indução com metanol.

Tendo isso em mente, geramos linhagens recombinantes de *P. pastoris* contendo os cassetes de expressão pPICZA α -L1H16 e pPGK Δ 3-L1H16, e selecionamos clones com múltiplas cópias do gene L1 de HPV-16. Vassileva *et al* (2001) observaram que a tolerância do aumento na concentração de ZeocinaTM, por parte de clones transformantes, tem correlação direta com o aumento no número de cópias do cassete de expressão presente na célula. Segundo esses autores, cada cópia do cassete contribui igualmente para os níveis de expressão globais da proteína recombinante. Concluíram, então, que clones resistentes a concentrações de 100, 500, 1000 e 2000 μ g/m de ZeocinaTM possuem, respectivamente, 1, 2, 3 e 4 cópias integradas do gene *Sh ble*, suposição confirmada por análises quantitativas através de *Southern blotting*. No presente estudo, selecionamos clones resistentes a 100, 500 e 1000 μ g/ml de ZeocinaTM mas as análises quantitativas por *Southern blotting* ou PCR em tempo real ainda são necessárias para confirmação do número de cópias integradas.

Posteriormente à seleção dos clones com múltiplas cópias do cassete de expressão, identificamos as colônias que apresentavam os maiores níveis de expressão da proteína L1

mediante ensaio por *Colony blotting*. Esses ensaios de imunodeteção com anticorpo monoclonal anti-L1 (CamVir[®]) permitiram identificar visualmente, dentre várias dezenas de colônias, aquelas com maior potencial de produção, tanto pelo sistema baseado no promotor P_{AOX1} quanto àquele do baseado no promotor P_{PGK1}. O ensaio por *Dot blotting* apenas com as colônias X-33/pPGKΔ3-L1H16 foi executado para dar suporte aos resultados do *Colony blotting*, considerando que as metodologias são diferentes (esta última se baseia na indução em placa, enquanto a primeira consiste em indução em meio líquido). Os resultados das duas metodologias se mostraram coerentes e confiáveis.

Os clones triados foram utilizados em ensaios de indução da expressão em frascos. Inicialmente, essas análises foram feitas em menor escala apenas para os clones X-33/pPICZAα-L1H16 e KM71H/pPICZAα-L1H16. As análises por *Western blotting* revelaram a presença de uma banda de aproximadamente 66 kDa para alguns clones, enquanto outros apresentaram uma banda com cerca de 97 kDa. Nas análises subsequentes em média escala (com linhagens de ambos os sistemas) se verificou um padrão sugestivo de degradação da proteína L1. Ainda que os ensaios de imunodeteção tenham reconhecido uma proteína inespecífica com massa entre 40-45 kDa em todas as linhagens analisadas, esse padrão sugestivo de degradação protéica não foi visualizado nas amostras das linhagens controle transformadas com vetor vazio (sem inserto). Por fim, alguns clones KM71H/pPICZAα-L1H16 continuaram apresentando as bandas de 66 e 97 kDa, enquanto os clones X-33/pPGKΔ3-L1H16 apresentaram bandas pouco menores que 30 kDa, não evidenciada na linhagem controle, dando mais suporte à ideia de degradação da proteína L1.

O ensaio de indução em maior escala foi realizado para se produzir grande quantidade de proteína recombinante a fim de se realizar purificação da mesma com resina de níquel disponibilizada em kit comercial. Para isso, foram escolhidos dois clones de cada linhagem recombinante do sistema induzível e um clone do sistema constitutivo. Aproveitando-se dos maiores volumes empregados, também foram coletadas alíquotas em diferentes tempos de indução para se analisar o perfil de expressão ao longo do cultivo. As análises por *Western blotting* revelaram que o padrão sugestivo de degradação protéica era evidenciado apenas após o início da indução, seja com glicose ou com metanol, intensificando-se até o final da mesma. Comparando o perfil de expressão entre os dois promotores, ainda que visualmente, é possível notar claramente que o promotor do gene *PGK1* proporciona maiores níveis de

expressão da proteína L1 nas primeiras 48 horas de indução, níveis estes equiparados pelo promotor P_{AOX1} apenas em torno de 72 horas de indução.

Embora possa se conjecturar que, ao se prolongar a indução por mais tempo, os níveis de expressão do promotor P_{AOX1} atingiriam àqueles do promotor P_{PGK1}, a maioria dos trabalhos que empregam expressão da proteína L1 de HPV em frascos (sob controle do sistema induzível) relatam cultivo máximo até 72 horas de indução (JIANG *et al.*, 2011; HANUMANTHA RAO *et al.*, 2011; BAZAN *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2007). Isso é característico do sistema baseado no promotor do gene *AOX1*, o qual necessita de um controle fino das concentrações de metanol e oxigênio no meio para obter níveis satisfatórios de expressão para alguns genes heterólogos, o que não ocorre em induções com frascos (CEREGHINO, 2002; WITTRUP *et al.*, 2007). Ensaios em biorreatores são necessários para avaliar precisamente essa possibilidade.

A expressão do gene L1 sob a perspectiva do emprego de linhagens com fenótipos diferenciados quanto à utilização do metanol também norteou as análises deste trabalho. Sob determinadas circunstâncias, o emprego de linhagens de *P. pastoris* com fenótipo Mut^S pode ser vantajoso, uma vez que nesse caso a taxa de utilização do metanol se dá de maneira mais lenta e isso favoreceria o processamento adequado de proteínas heterólogas (CREGG *et al.*, 1987; SREEKRISHNA *et al.*, 1997; VASSILEVA *et al.*, 2001). Cregg e colaboradores (1987) relataram que linhagens com fenótipo Mut⁺ produziram 10 vezes menos HBsAg do que aquelas com fenótipo Mut^S. Considerando que o antígeno de superfície do HBV é um monômero que se complexa também em VLPs, à semelhança do que ocorre com a proteína L1 de HPV-16, desenvolvemos linhagens de *P. pastoris* com fenótipos Mut⁺ (X-33/pPICZA α -L1H16) e Mut^S (KM71H/ pPICZA α -L1H16) para avaliar a produção de L1. Ainda que os resultados preliminares do nosso estudo não tenham apontado nenhuma clara diferença nessa produção, acreditamos que algumas modificações nos parâmetros de cultivo possam fornecer dados nesse sentido.

Em paralelo, como os trabalhos de Cregg *et al* (1987) e Vassileva *et al* (2001) investigaram a expressão intracelular do HBsAg, também estamos desenvolvendo linhagens com múltiplas cópias do cassete de expressão para produção intracelular da proteína L1 sob controle do promotor P_{AOX1}. Para isso, a construção pPICZA α -L1H16 desenvolvida neste trabalho foi empregado em reação de digestão com as enzimas BstB I e XhoI para retirada do fator- α e posterior recircularização. O mesmo procedimento foi feito com o cassete pPGK Δ 3-

L1H16 para avaliar a produção intracelular de L1. Ainda que *P. pastoris* não possua fenótipo diferencial quanto à utilização de glicose, a produção intracelular de L1 sob controle do promotor P_{PGK1} não foi investigada até o momento.

Executamos a purificação sob condições desnaturantes e, a título de comparação, realizamos uma eletroforese por SDS-PAGE com alíquotas não purificadas e com alíquotas eluídas da resina. Após coloração com nitrato de prata, ficou evidente que o rendimento da purificação foi insatisfatório. A visualização de bandas a partir das amostras purificadas somente ocorreu após realização de precipitação protéica com TCA. Ainda assim, embora o tamanho esperado da proteína L1 fosse entre 55-60 kDa, o anticorpo anti-L1 reconheceu bandas com cerca de 66 kDa.

Problemas de rendimento durante a purificação de proteínas recombinantes conjugadas a cauda de poli-histidina podem ser resultado de uma conformação inadequada dessa “etiqueta” molecular. Em nosso grupo de laboratório, já experimentamos essa situação com a expressão da proteína P26 do Vírus da Anemia Infecciosa Equina em *P. pastoris* (COUTINHO, 2011). No referido trabalho, não foi possível identificar a proteína P26 mediante *Western blotting* com anticorpo anti-His, mas os ensaios com anticorpos policlonais obtidos a partir de animal previamente infectado confirmaram a presença da proteína, tanto por *Western blotting* quanto por IDGA (Imunodifusão em Gel de Agarose). De maneira semelhante, os ensaios de imunodeteção com anticorpo anti-His falharam em demonstrar a presença da proteína L1 nas amostras de sobrenadantes não purificadas, bem como nas amostras provenientes da purificação (resultados não mostrados). Contudo, a identificação da proteína L1 nas amostras purificadas, mediante emprego de anticorpo anti-L1 (CamVir[®]) obteve sucesso. Sugerimos, portanto, que a ligação da resina à cauda de poli-histidina tenha sido prejudicada dentro desse contexto.

Alguns trabalhos relatam que a proteína L1 do papilomavírus pode ser glicosilada (LARSEN *et al.*, 1987; PFISTER & FUCHS, 1994) quando expressa em células de mamífero (BROWNE *et al.*, 1988) e de inseto (XI & BANKS, 1991), ainda que outros autores não tenham obtido os mesmos resultados (ZHOU *et al.*, 1991). Apesar de não estar bem esclarecida a função desta modificação pós-traducional na formação da partícula viral, quatro sítios de glicosilação na região N-terminal de L1 foram demonstrados (BROWNE *et al.*, 1988; ZHOU *et al.*, 1993). Segundo Daly & Hearn (2005), duas moléculas da mesma proteína traduzida por uma célula podem ser heterogêneas quanto ao padrão de glicosilação que

apresentam, ainda que tenham sido expostas às mesmas enzimas e maquinaria de glicosilação. Isso seria resultado de diferenças quanto ao tipo ou tamanho dos resíduos de glicosídeos adicionadas a cada população de proteínas ou mesmo quanto a não ocupação dos sítios de glicosilação. O tamanho da cadeia de oligossacarídeos adicionada, por sua vez, depende dos resíduos circunjacentes. Por exemplo, para a sequência consenso de N-glicosilação Asn-Xaa-Ser/Thr, se Xaa for uma prolina ou um resíduo hidrofóbico, a glicosilação é inibida; se Xaa for um aminoácido negativamente carregado, a ocupação por oligossacarídeos é favorecida (DALY & HEARN, 2005). Nesse interesse, nossas análises a partir da sequência da proteína L1 de HPV-16 sugerem que, dos quatro sítios de glicosilação disponíveis, um apresenta sequência altamente favorável à adição de glicosídeos (Asn-Lys-Ser). Se considerarmos que o tamanho das cadeias de oligossacarídeos adicionadas por *P. pastoris* tem em média entre 8 e 14 resíduos de manose e que cada resíduo tenha entre 1 e 2 kDa (MACAULEY-PATRICK *et al.*, 2005), sugerimos que a presença de bandas com cerca de 66 kDa se deve a eventos de glicosilação da proteína L1.

Apesar de não existir uma sequência consenso para as O-glicosilações, a probabilidade de ocorrência dessas modificações é aumentada quando existe uma abundância incomum de serina/treonina ou quando esses aminoácidos se repetem próximos aos resíduos de prolina. A O-glicosilação também pode ser estimulada por aminoácidos positivos ou negativos dispostos na vizinhança das repetições serina/treonina (DALY & HEARN, 2005). Análises da proteína L1 de HPV-16 também evidenciaram a presença de uma sequência altamente favorável a eventos de O-glicosilação (TPTTSSTSTTTKRKKRKL) precedendo a cauda de histidina. Caso o referido sítio esteja sendo glicosilado, isso poderia justificar os problemas envolvendo reconhecimento dessa cauda. Embora a glicosilação de proteínas recombinante secretadas por leveduras seja indesejável do ponto de vista farmacêutico, devido ao caráter extremamente antigênico dessas modificações para mamíferos, algumas estratégias podem ser utilizadas para contornar este problema, como o emprego de linhagens geneticamente modificadas nas quais os padrões de glicosilação observados são mais próximos aos desempenhados em humanos (CEREGHINO *et al.*, 2002; MACAULEY-PATRICK *et al.*, 2005). Análises posteriores devem ser realizadas para confirmar esses questionamentos.

É provável que o padrão difuso apresentado por alguns clones nos ensaios de imunodeteção se deva também a proteólise do produto recombinante (não visualizada a partir das linhagens controle negativo). Todavia, não foi possível identificar a causa do

ocorrido. O emprego da via extracelular de expressão pode ser vantajoso porque *P. pastoris* tem poucas proteínas extracelulares documentadas (incluindo proteases), o que facilitaria o processo de purificação do produto recombinante (CREGG & CEREGHINO, 2001; CEREGHINO & CREGG, 2000). No entanto, sob altas densidades celulares, a lise das células pode ser aumentada e, conseqüentemente, há liberação de proteases intracelulares no meio de cultura, proporcionando proteólise exacerbada do produto recombinante extracelular (ZHANG *et al.*, 2007). Sinha *et al* (2004), durante a produção extracelular do interferon- τ de ovino em *P. pastoris*, relataram aumento expressivo da degradação a partir de 48 horas de indução. Segundo esses autores, foi observada uma concentração crescente de proteinase A, proteinase B, carboxipeptidase Y e aminopeptidases (quatro classes de proteases vacuolares) no sobrenadante de cultivo a partir de 48 horas de indução, atingindo seu pico em torno de 72 horas. Investigamos a presença de sítios de reconhecimento para as respectivas proteases na sequência da proteína L1 de HPV-16 e encontramos sítios alvos para ação de aminopeptidases. Diferente do que Sinha *et al* (2004) observaram, um significativo grau de degradação da proteína L1 já pôde ser evidenciado nas primeiras 24 horas de indução em todos os clones induzidos. Na tentativa de contornar esse problema, foram realizados ensaios de indução empregando meios complexos, nos quais se adicionam extrato de levedura, peptona e tampão fosfato, mas nenhuma modificação nesse padrão característico do *Western blotting* foi atingida. Talvez a proteína L1 esteja sendo alvo de proteases ainda durante seu tráfego intracelular até sua exportação. Não descartamos, também, a ação de outras proteases, como serino proteases. Futuramente, analisaremos a eficácia do emprego de inibidores de protease e da diminuição da temperatura de indução, ou da combinação dessas estratégias com as demais experimentadas, como sugerido por Macauley-Patrick *et al* (2005).

O promotor do gene *PGK1* de *P. pastoris* foi isolado por Almeida *et al* (2005) e, desde então, seus níveis de expressão foram analisados a partir da produção de α -amilase de *Bacillus subtilis* (ALMEIDA *et al.*, 2005; ARRUDA, 2008) e quimosina de *Bos taurus* (ARAÚJO, 2008). Nos três trabalhos, a produção das proteínas recombinantes sob controle do promotor P_{PGK1} se mostrou igual ou superior àquelas controladas pelo promotor P_{AOX1} . No presente trabalho, embora análises quantitativas sejam necessárias para confirmação, sugerimos que resultados semelhantes foram obtidos para a proteína L1 de HPV-16.

Este é o primeiro trabalho que analisa a expressão extracelular da proteína L1 de HPV-16 mediante utilização dos sistemas baseados no promotor induzível do gene *AOX1* e do

promotor constitutivo do gene *PGK1*. Essa análise é feita sob a perspectiva de clones com múltiplas cópias de cada cassete de expressão e através de duas linhagens de *P. pastoris*. No entanto, os experimentos executados se tratam de análises preliminares. Embora tenham se mostrado eficientes, ambos os sistemas são passíveis de otimização. Ensaio em biorreatores proporcionam níveis de expressão tipicamente maiores do que àqueles observados em frascos (MACAULEY-PATRICK *et al.*, 2005), podendo também destacar diferenças entre os níveis de produção a partir das linhagens recombinantes X-33 e KM71H/pPICZA α -L1H16 (as quais possuem fenótipos diferenciados de utilização do metanol).

O fato do promotor P_{PGK1} ter se mostrado eficiente é animador para seu uso como plataforma industrial. Esse sistema não necessita de metanol, não exige rígidos controles de concentração de O₂ dissolvido nem a troca de fontes de carbono, o tempo de cultivo é reduzido (ALMEIDA *et al.*, 2005) e podem-se baratear os custos de produção mediante emprego de meios de cultura menos refinados, baseados em farelo de soja e açúcar invertido (ARRUDA, 2008).

O presente estudo, portanto, representa uma alternativa atrativa para o desenvolvimento de uma plataforma biotecnológica visando a produção de VLPs de HPV como estratégia profilática acessível às necessidades nacionais. Este sistema poderia, também, ser explorado para obtenção de VLPs de tipos virais mais prevalentes em determinadas regiões do país, como HPV-31 e -33, no intuito de desenvolver vacinas alternativas e mais baratas. Por fim, outras estratégias de imunização com VLPs são passíveis de investigação a partir deste sistema, como abordagens terapêuticas (empregando as VLPs como sistemas de entrega de genes e antígenos) contra o câncer de colo uterino.

8. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste trabalho, os resultados obtidos caracterizam o promotor constitutivo do gene *PGK1* de *P. pastoris* como um atrativo sistema de expressão para a proteína L1 de HPV-16. Em comparação com o sistema comercial baseado no promotor induzível P_{AOX1} , o promotor constitutivo se mostra menos laborioso - quanto à necessidade de monitoramento das concentrações da fonte de carbono e oxigenação e da troca das fontes indutoras da expressão - e capaz de atingir níveis de expressão iguais ou superiores. No entanto, as linhagens recombinantes analisadas produziram proteínas aparentemente glicosiladas. Se confirmada a presença dessas modificações pós-traducionais, analisaremos as alternativas para contornar este problema.

Visando o estabelecimento de uma escala produtiva, outra relevante vantagem é a potencial redução dos custos de produção devidos tanto ao emprego de meios de cultivo mais baratos quanto à utilização de um sistema não comercial, evitando assim o pagamento de *royalties*. Contudo, deve-se notar que os altos custos associados ao emprego do antibiótico ZeocinaTM pode inviabilizar a produção em larga escala. A utilização de diferentes marcas de seleção será motivo de novas análises pelo grupo, posteriormente.

Por se tratar de análises preliminares, a otimização das etapas de produção ainda é capaz de fornecer maiores níveis de expressão. Estratégias de cultivo que promovam a diminuição da degradação proteolítica serão investigadas e metodologias para purificação de L1 e montagem das VLPs, como cromatografia por troca iônica e ultracentrifugação em gradiente de sacarose, serão analisados. Após purificação, as VLPs serão avaliadas quanto à sua funcionalidade imunológica em modelo animal. Por fim, caso seja conveniente, as linhagens desenvolvidas serão empregadas em ensaios com bioreator.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, P.; MISTRY, F.P.; BAPAT, M.R.; SHARMA, G.; REDDY, G.R.; PRASAD, K.S.N.; RAMANNA, V. Evaluation of a new recombinant DNA hepatitis B vaccine (Shanvac-B). **Vaccine**, v. 17, p. 1125-1129, 1999.

ALEIXO NETO, A. Aspectos epidemiológicos do câncer cervical. **Rev Saúde públ**, v. 25(4), p. 326-33, 1991.

ALMEIDA, J.R.; MORAES, L.M.; TORRES, F.A. Molecular characterization of the 3-phosphoglycerate kinase gene (PGK1) from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Yeast**, v. 22, n. 9, p. 725-737, 2005.

ALOULOU, A.; GRANDVAL, P.; DE CARO, J.; DE CARO, A.; CARRIERE, F. Constitutive expression of human pancreatic lipase-related protein 1 in *Pichia pastoris*. **Protein Expr Purif**, v. 47, n. 2, p. 415-421, 2006.

AIRES, K.A.; CIANCIARULLO, A.M.; CARNEIRO, S.M.; VILLA, L.L.; BOCCARDO, E.; PÉREZ-MARTINEZ, G.; PEREZ-ARELLANO, I.; OLIVEIRA, M.L.S.; HO, P.L. Production of human papillomavirus type 16 L1 virus-like particles by recombinant *Lactobacillus casei* cells. **Appl Environ Microbiol**, v. 72, p. 745-752, 2006.

ARAÚJO, J.A. **Produção de quimosina B de *Bos taurus* em *Pichia pastoris***. 2008. 107 p. Dissertação (mestrado) – Universidade de Brasília, Brasília.

ARRUDA, A. **Utilização do promotor do gene PGK1 de *Pichia pastoris* para expressão heteróloga**. 2008. 90 p. Dissertação (mestrado) – Universidade de Brasília, Brasília.

AYRES, A.; AZEVEDO E SILVA, G. Revisão sistemática sobre estudos de prevalência de infecção por HPV no Brasil. **Rev Saúde Pública** (in press).

BAKER, H.V. GCR1 of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a DNA binding protein whose binding is abolished by mutations in the CTTCC sequence motif. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 88, p. 9443-9447, 1991.

BAKER, T.S.; NEWCOMB, W.W.; OLSON, N.H.; COWSERT, L.M.; OLSON, C.; BROWN, J.C. Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. **Biophys J**, v. 60, p. 1445-1456, 1991.

BALDEZ DA SILVA, M.F.P.T.; CHAGAS, B.S.; GUIMARÃES, V.; KATZ, L.M.C.; FELIX, P.M.; MIRANDA, P.M.; LIMA, A.A.; ARRAES, L.C.; MARTINS, D.B.G.; LIMA FILHO, J.L.; STOCCO, R.C.; CROVELLA, S.; FREITAS, A.C.; BEÇAK, W. HPV31 and HPV33 incidence in cervical samples from women in Recife, Brazil. **Genet Mol Res**, v. 8(4), p. 1437-1443, 2009.

BARNABAS, R.V.; GARNETT, G.P. The potential public health impact of vaccines against human papillomavirus. In: Prendivill W, Davies P, eds. The Clinical Handbook of Human

Papillomavirus. Lancaster, United Kingdom: Parthenon Publishing/Parthenon Medical Communications, 2004.

BAYER, M.E.; BLUMBERG, B.S.; WERNER, B. Particles associated with Australia antigen in the sera of patients with leukaemia, Down's Syndrome and hepatitis. **Nature**, v. 218, p. 1057-1059, 1968.

BAZAN, S.B.; DE ALENCAR MUNIZ CHAVES, A.; AIRES, K.A.; CIANCIARULLO, A.M.; GARCEA, R.L.; HO, P.L. Expression and characterization of HPV-16 L1 capsid protein in *Pichia pastoris*. **Arch Virol**, v. 154(10), p.1609-17, 2009.

BELNAP, D.M.; OLSON, N.H.; CLADEL, N.M.; NEWCOMB, W.W.; BROWN, J.C.; KREIDER, J.W.; CHRISTENSEN, N.D.; BAKER, T.S. Conserved features in papillomavirus and polyomavirus capsids. **J Mol Biol**, v. 259, p. 249-263, 1996.

BERNARD, H.U.; BURK, R.D.; CHEN, Z.; VAN DOORSLAER, K.; ZUR HAUSEN, H.; DE VILLIERS, E.T. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. **Virology**, v. 401, p. 70-79, 2010.

BISHOP, B.; DASGUPTA, J.; CHEN, X.S. Structure-based engineering of papillomavirus major capsid L1: controlling particle assembly. **Virol J**, v. 4, p. 3, 2007.

BOSCH, F.X.; MUÑOZ, N.; SHAH, K.V.; MEHEUS, A. Second International Workshop on the epidemiology of cervical cancer and human papillomavirus. **Int J Cancer**, v. 52, p. 171-173, 1992.

BOSCH, F.X.; MANOS, M.M.; MUÑOZ, N.; SHERMAN, M., et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. **J Natl Cancer Inst**, v. 87, p. 796-802, 1995.

BOSCH, F.X.; LORINCZ, A.; MUNOZ, N.; MEIJER, C.J.; SHAH, K.V. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. **J Clin Pathol**, v. 55, p. 244-265, 2002.

BREITBURD, F.; KIRNBAUER, R.; HUBBERT, N.L.; NONNENMACHER, B.; TRINDINH-DESMARQUET, C.; ORTH, G.; SCHILLER, J.T.; LOWY, D.R. Immunization with virus-like particles from cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) can protect against experimental CRPV infection. **J Virol**, v. 69, p. 3959-3963, 1995.

BROWNE, H.M.; CHURCHER, M.J.; STANLEY, M.A.; SMITH, G.L.; MINSON, A.C. Analysis of the L1 gene product of human papillomavirus type 16 by expression in a vaccinia virus recombinant. **J Gen Virol**, v. 69, 1263-73, 1988.

BRYAN, J.T. Developing an HPV vaccine to prevent cervical cancer and genital warts. **Vaccine**, v. 25, p. 3001-3006, 2007.

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

CAMPO, M.S. Vaccination against papillomavirus in cattle. **Clin Dermatol**, v. 15, p. 275-283, 1997.

CAMPO, M.S.; ANDERSON, R.A.; CAIRNEY, M.; JACKSON, M.E. Bovine papillomavirus type 4: from transcriptional control to control of disease. In: “**128th SGM Symposium – Viruses and cancer**”. A.C. Minson Editor, Cambridge University Press, p. 47-70, 1994.

CEREGHINO, G.L. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. **Curr Opin Biotechnol**, v. 13, p. 329-332, 2002.

CEREGHINO, G.P.L.; CEREGHINO, J.L.; ILGEN, C.; CREGG, J.M. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. **Curr Opin Biotechnol**, v. 13, p. 329-332, 2002.

CEREGHINO, J.L.; CREGG, J.M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiol**, v. 24, p. 45-66, 2000.

CHEN, X.S.; GARCEA, R.L.; GOLDBERG, I.; CASINI, G.; HARRISON, S.C. Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. **Mol Cell**, v. 5, p. 557-567, 2000.

CLARE, J.J.; ROMANOS, M.A.; RAYMENT, F.; ROWEDDER, J.E.; SMITH, M.A.; PAYNE, M.M.; SREEKRISHNA, K.; HENWOOD, C.A. Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. **Gene**, v. 105, p. 205-212, 1991a.

CLARE, J.J.; RAYMENT, F.B.; BALLANTINE, S.P.; SREEKRISHNA, K.; ROMANOS, M.A. High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. **Bio/technology**, v. 9, p. 455-460, 1991b.

CLIFFORD, G.M.; SMITH, J.S.; PLUMMER, M.; et al. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a metaanalysis. **Br J Cancer**, v. 88, p. 63–73, 2003.

COFFER, P.J.; KRUIJER, W. EGF receptor deletions define a region specifically mediating STAT transcription factor activation. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 210, p. 74–81, 1995.

COHEN, S.N.; CHANG, A.C.; BOYER, H.W.; HELLING, R.B. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 70(11), p. 3240-3244, 1973.

COIMBRA, E.C. **Desenvolvimento de estratégias vacinais contra o câncer de colo de útero baseadas em “Vírus-Like Particles” e imunização genética**. Em andamento. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

COIMBRA, E.C.; GOMES, F.B.; CAMPOS, J.F.; D’ARC, M.; CARVALHO, J.C.; MARIZ, F.C.; JESUS, A.L.S.; STOCCO, R.C.; BEÇAK, W.; FREITAS, A.C. Production of

L1 protein from different types of HPV in *Pichia pastoris* using an integrative vector. **Braz J Med Biol Res**, v. 44, p. 1194-1298, 2011.

CONGER, K.L.; LIU, J.S.; KUO, S.R.; CHOW, L.T.; WANG, T.S. Human papillomavirus DNA replication. Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human DNA polymerase alpha/primase. **J Biol Chem**, v. 274, p. 2696-2705, 1999.

COS, O.; SERRANO, A.; MONTESINOS, J.L.; FERRER, P.; CREGG, J.M.; VALERO, F. Combined effect of the methanol utilization (Mut) phenotype and gene dosage on recombinant protein production in *Pichia pastoris* fed-batch cultures. **J Biotechnol**, v. 116, p. 321-335, 2005.

COUTINHO, L.C.A. **Produção da Proteína P26 do Vírus da Anemia Infecciosa Equina em Levedura *Pichia pastoris***. 2011. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

CREGG, J.M.; BARRINGER, K.J.; HESSLER, A.Y.; MADDEN, K.R.. *Pichia pastoris* as a host system for transformations. **Mol Cell Biol**, v. 5, p. 3376-3385, 1985.

CREGG, J.M.; CEREGHINO, G.P.L. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiol Rev**, v. 24, p. 45-66, 2001.

CREGG, J.M.; CEREGHINO, G.P.L.; CEREGHINO, J.L.; ILGEN, C. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. **Curr Opin Biotechnol**, v. 13, p. 329-332, 2002.

CREGG, J.M.; CEREGHINO, J.L.; SHI, J.; HIGGINS, D.R. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. **Mol Biotechnol**, v. 16, p. 23-52, 2000.

CREGG, J.M.; SUNGA, A.J.; CEREGHINO, J.L.; CEREGHINO, G.P. L. Expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*. **Genet Eng**, v. 23, p. 157- 69, 2001.

CREGG, J.M.; VEDVICK, T.S.; RASCHKE, W.C. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. **Bio/technology**, v. 11, p. 905-910, 1993.

CREGG, J.M.; TSCHOPP, J.F.; STILLMAN, C.; SIEGEL, R.; AKONG, M.; CRAIG, W.S.; et al. High-level expression and efficient assembly of Hepatitis B surface antigen in methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. **Bio/technology**, v. 5, p. 479-485, 1987.

DALL, M.T.L.; NICAUD, J.M.; TRETON, B.Y.; GAILLARDIN, C.M. The 3-phosphoglycerate kinase gene of the yeast *Yarrowia lipolytica* de-represses on gluconeogenic substrates. **Curr Genet**, v. 29, p. 446-456, 1996.

DALY, R.; HEARN, M.T.W. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. **J Mol Recog**, v. 18, p. 119-138, 2005.

DA SILVA, D.M.; EIBEN, G.L.; FAUSCH, S.C.; WAKABAYASHI, M.T.; RUDOLF, M.P.; VELDER, M.P.; KAST, W.M. Cervical cancer vaccines: emerging concepts and development. **J Cell Physiol**, v. 186, p. 169-182, 2001.

DAY, P.M.; SCHILLER, J.T. The role of furin in papillomavirus infection. **Future Microbiol**, v. 4, p. 1255-1262, 2009.

DEMIOFF, S.J.; SANTANGELO, G.M. Rap1p requires Gcr1p and Gcr2p homodimers to activate ribosomal protein and glycolytic genes, respectively. **Genetics**, v. 158, p. 133-143, 2001.

DENIS, F.; HANZ, S.; ALAIN, S. Clearance, persistence and recurrence of HPV infection. **Gynecol Obstet Fertil**, v. 36, p. 430-40, 2008.

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

DILLNER, J. The serological response to papillomaviruses. **Semin Cancer Biol**, v. 9, p. 423-430, 1999.

DIMAIO, D.; MATTOON, D. Mechanisms of cell transformation by papillomavirus E5 proteins. **Oncogene**, v. 20, p. 7866-73, 2001.

DOORBAR, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer **Clin Sci**, v. 110, p. 525-541, 2006.

FAVRE, M.; RAMOZ, N.; ORTH, G. Human papillomaviruses: general features. **Clin Dermatol**, v. 15(2), p. 181-98, 1997.

FAY, A.; YUTZY, W.H. 4th; RODEN, R.B.; MOROIANU, J. The positively charged termini of L2 minor capsid protein required for bovine papillomavirus infection function separately in nuclear import and DNA binding. **J Virol**, v. 78, p. 13447-13454, 2004.

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

FIFIS, T.; GAMVRELLIS, A.; CRIMEEN-IRWIN, B.; PIETERSZ, G.A.; et al. Size-dependent immunogenicity: therapeutic and protective properties of nano-vaccines against tumors. **J Immunol**, v. 173, p. 3148-3154, 2004).

FOURNIER, A.; FLEER, R.; YEH, P.; MAYAUX, J.F. The primary structure of the 3-phosphoglycerate kinase PGK gene from *Kluyveromyces lactis*. **Nucleic Acids Res**, v. 18, p. 365, 1989.

FRATTINI, M.G.; LAIMINS, L.A. Binding of the human papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer-binding protein. **Proc Natl Acad Sci**, v. 91, p. 12398-12402, 1994.

GALLAGHER, T.Q.; DERKAY, C.S. Recurrent respiratory papillomatosis: update 2008. **Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 16, p. 536-42, 2008.

GAMVRELLIS, A.; LEONG, D.; HANLEY, J.C.; XIANG, S.D.; et al. Vaccines that facilitate antigen entry into dendritic cells. **Immunol Cell Biol**, v. 82, p. 506–516, 2004.

GELLISSEN, G. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 54, p. 741-750, 2000.

GELLISSEN, G.; HOLLENBERG, C.P. Application of yeasts in gene expression studies: a comparison of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* and *Kluyveromyces lactis* – a review. **Gene**, v. 190, p. 87-97, 1997.

GELLISSEN, G.; KUNZE, G.; GAILLARDIN, C.; CREGG, J.M.; BERARDI, E.; VEENHUIS, M.; VAN DER KLEI, I. New yeast expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* and on dimorphic *Arxula adenivorans* and *Yarrowia lipolytica* – A comparison. **FEMS Yeast Res**, v. 5, p. 1079-1096, 2005.

GLAXOSMITHKLINE UK. 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/>>, 2007.

GIMENEZ, J.A.; MONKOVIC, D.D.; DEKLEVA, M.L. Identification and monitoring of protease activity in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol Bioeng**, v. 67, p. 245–251, 2000.

GOODNOUGH, M.C.; HAMMER, B.; SUGIYAMA, H.; JOHNSON, E.A. Colony immunoblot assay of Botulinal toxin. **Appl Environ Microbiol**, v. 59(7), p. 2339-2342, 1993.

GOTTSCHLING, M.; STAMATAKIS, A.; NINDL, I.; STOCKFLTH, A.; BRAVO, I.G. Multiple evolutionary mechanisms drive papillomavirus diversification. **Mol Biol Evol**, v. 24, p. 1242-1258, 2007.

GRANGE, D.C.; PETRONIUS, I.S.; VAN ZYL, W.H. Expression of a *Trichoderma reesei* xylanase gene (XYN2) in *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Environ Microbiol**, v. 62, p. 1036-1044, 1996.

HAKIM, A.A.; DINH, T.A. Worldwide impact of the Human Papillomavirus Vaccine. **Curr Treat Opt Oncol**, v. 10, p. 44-53, 2009.

HANSEN, R.J.; SWITZER, R.L.; HINZE, H.; HOLZER, H. Effects of glucose and nitrogen source on the levels of proteinases, peptidases, and proteinase inhibitors in yeast. **Biochim Biophys Acta**, v. 496, p. 103– 114, 1977.

HANUMANTHA RAO, N.; BABU, P.B.; RAJENDRA, L.; SRIRAMAN, R.; PANG, Y. S.; SCHILLER, J.T.; SRINIVASAN, V.A. Expression of codon optimized major capsid

protein (L1) of human papillomavirus type 16 and 18 in *Pichia pastoris*; purification and characterization of the virus-like particles. **Vaccine**, v. 29(43), p. 7326-34, 2011.

HARFORD, N.; CABEZON, T.; COLAU, B.; DELISSE, A.M.; RUTGERS, T.; DE WILDE, M. Construction and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* strain (RIT4376) expressing hepatitis B surface antigen. **Postgrad Med Journal**, v. 63, p. 65-70, 1987.

HARWOOD, C.A. & PROBY, C.M. Human papillomaviruses and non-melanoma skin cancer. **Curr Opin Infect Dis**, v. 15, p. 101–114, 2002.

HIGGINS, D.R.; BUSSE, K.; COMISKEY, J.; WHITTIER, P.S.; PURCELL, T.J.; HOEFFLER, J.P. Small vectors for expression based on dominant drug resistance with direct multicopy selection. **Methods Mol Biol**, v. 103, p. 41-53, 1998.

HOHENBLUM, H.; GASSER, B.; MAURER, M.; BORTH, N.; MATTANOVICH, D. Effects of gene dosage, promoters and substrates on unfolded protein stress of recombinant *Pichia pastoris*. **Biotechnol and Bioeng**, v. 85, n. 4, p. 327-375, 2004.

HOLLAND, M.J.; HOLLAND, J.P. Isolation and identification of yeast messenger ribonucleic acids coding for enolase, glyceraldehyde- 3-phosphate dehydrogenase, and phosphoglycerate kinase. **Biochemistry**, v. 17, p. 4900–4907, 1978.

HONG, I.; STEPHEN, A.; SHIN, G.C. Evaluation of a New Episomal Vector based on the GAP Promoter for Structural Genomics in *Pichia pastoris*. **J Microbiol Biotechnol**, v. 16(9), p. 1362-1368, 2006.

HOU, L.; WU, H.; XU, L.; YANG, F. Expression and self-assembly of virus-like particles of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in *Escherichia coli*. **Arch. Virol**, v. 154, p. 547-553, 2009.

HOUARD, S.; HEINDERYCKX, M.; BOLLEN, A. Engineering of non-conventional yeasts for efficient synthesis of macromolecules: the methylotrophic genera. **Biochimie**, v. 84, p. 1089-1093, 2002.

HOWLEY, P.M. Papillomavirinae: the viruses and their replication. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.. **Fields Virol**, 3 ed. New York, N.Y.: Raven Press, p. 2045-2076, 1996.

HOWLEY, P.M.; LOWY, D.R. Papillomaviruses and their replication. In: Howley, P.M. & Knipe, D.M. (eds). **Fields Virol**, 4 ed., vol. 2, p. 2197-2229, 2001.

IARC (International Agency for Research on Cancer). IARC Handbook of Cancer Prevention. **Cervical Cancer Screening**, v. 10, IARC Press, Lyon, France, 2005.

IAVI/PATH (International AIDS Vaccine Initiative/Program for Appropriate Technology in Health). HPV Vaccine Adoption in Developing Countries: Cost and Financing Issues. Disponível em <<http://www.iavi.org/HPVreport>>, 2007.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios (PNAD 2008), um panorama da Saúde no Brasil: acesso e utilização dos serviços, condições de saúde e fatores de risco e proteção à saúde. Rio de Janeiro, 2010.

INVITROGEN CORPORATION. Easy Select *Pichia* expression kit: For Expression of Recombinant Proteins using pPICZ and pPICZ α in *Pichia pastoris*. Version I, Invitrogen, Carlsbad, CA USA. 2009.

INVITROGEN CORPORATION. Multi-Copy *Pichia* Expression Kit: For the Isolation and Expression of Recombinant Proteins from *Pichia pastoris* Strains Containing Multiple Copies of a Particular Gene. Invitrogen, Carlsbad, CA USA. 2010.

JAHIC, M.; WALLBERG, F.; BOLLOK, M.; GARCIA, P.; ENFORS, S. Temperature limited fed-batch technique for control of proteolysis in *Pichia pastoris* bioreactor cultures. **Microbial Cell Factories**, v. 2, n. 1, p. 6, 2003.

JEMAL, A.; TIWARI, R.C.; MURRAY, T.; GHAFOR, A.; SAMUELS, A.; et al. Cancers statistics. **CA Cancer J Clin**, v. 54, p. 8-29, 2004.

JESUS, A.L.S. **Desenvolvimento e avaliação de estratégias vacinais contra a papilomatose bovina e sarcoide equino baseadas em virus-like particles e imunização genética**. Em andamento. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

JIANG, Z.; GUANGJIE, T.; BEIBEI, C.; YIHAN, X.; JUEREN, L. Purification and immunogenicity study of human papillomavirus 58 virus-like particles expressed in *Pichia pastoris*. **Protein Expr Purif**, v. 80, p. 203–210, 2011.

KARANAM, B.; JAGU, S.; HUH, W.K.; RODEN, R.B.S. Developing vaccines against minor capsid antigen L2 to prevent papillomavirus infection. **Immunol Cell Biol**, v. 87(4), p. 287-99, 2009.

KAUFMANN, A.M.; SCHENEIDER, A. New paradigm for prevention of cervical cancer. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 130, p. 25-29, 2007.

KINES, R.C.; THOMPSON, C.D.; LOWY, D.R.; SCHILLER, J.T.; DAY, P.M. The initial steps leading to papillomavirus infection occur on the basement membrane prior to cell surface binding. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, p. 20458-20463, 2009.

KIRNBAUER, R.; BOOY, F.; CHENG, N.; LOWY, D.R.; SCHILLER, J.T. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, p. 12180-12184, 1992.

KIRNBAUER, R.; TAUB, J.; GREENSTONE, H.; RODEN, R.; DURST, M.; GISSMANN, L.; LOWY, D.R.; SCHILLER, J.T. Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. **J Virol**, v. 67, n. 12, p. 6929-6936, 1993.

KIRNBAUER, R.; CHANDRACHUD, L.M.; O'NEIL, B.W.; WAGNER, E.R.; GRINDLAY, G.J.; ARMSTRONG, A.; MCGARVIE, G.M.; SCHILLER, J.T.; LOWY, D.R.; CAMPO,

M.S. Virus-like particles of bovine papillomavirus type 4 in prophylactic and therapeutic immunization. **Virology**, v. 219, p. 37-44, 1996.

KOLS, A.; SHERRIS, J. HPV Vaccines: Promise and Challenges. PATH. 2000.

KOTZÉ, L.; SMITH, J.J.; HAAN, R. den.; VAN ZYL, W.H.; GÖRGENS, J.F. Expression of human papillomavirus type 16 (HPV16) L1 protein in *Pichia pastoris*. **Afr J Biotechnol**, v. 10 (2), p. 214-219, 2011.

KUCINSKAITE, I.; JUOZAPAITIS, M.; SERVA, A.; ZVIRBLIENE, A.; JOHNSON, N.; STANIULIS, J.; FOOKS, A.R.; MULLER, T.; SASNAUSKAS, K.; ULRICH, R.G. Antigenic characterisation of yeast-expressed lyssavirus nucleoproteins. **Virus Genes**, v. 35, p. 521-529, 2007.

LAI, W.B.; MIDDELBERG, A.P. The production of human papillomavirus type 16 L1 vaccine product from *Escherichia coli* inclusion bodies. **Bioprocess and Biosyst Eng**, v. 25(2), p. 121 - 128, 2002.

LARSEN, P.M.; STORGAARD, L.; FEY, S.J. Proteins present in bovine papillomavirus particles. **J Virol**, v. 61, p. 3596-3601, 1987.

LEE, F.W.; DA SILVA, N.A. Improved efficiency and stability of multiple cloned gene insertions at the delta sequences of *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 48, p. 339-345, 1997.

LEWIS, T.S.; SHAPIRO, P.S.; AHN, N.G. Signal transduction through MAP kinase cascades. **Adv Cancer Res**, v. 74, p. 49-139, 1998.

LI, M.; BEARD, P.; ESTES, P.A.; LYON, M.K.; GARCEA, R.L. Intercapsomeric disulfide bonds in papillomavirus assembly and disassembly. **J Virol**, v. 72, p. 2160-2167, 1998.

LI, P.C.; ZHANG, X.G.; ZHOU, L.; ZENG, Y. Gene optimization is necessary to express HPV type 6 L1 protein in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Chin J Exp Clin Virol**, v. 17, n. 4, p. 310-314, 2003.

LI, Z.; XIONG, F.; LIN, Q.; D'ANJOU, M.; DAUQULIS, A.J.; YANG, D.S.; HEW, C.L. Low-temperature increases the yield of biologically active herring antifreeze protein in *Pichia pastoris*. **Protein Expr Purif**, v. 21, n. 3, p. 438-445, 2001.

LICO, C.; CHEN, Q.; SANTI, L. Viral vectors for production of recombinant proteins in plants. **J Cell Physiol**, v. 216, p. 366-77, 2008.

LIU, D.W.; ZHANG, Y.; YU, X.; JIANG, C.L.; CHEN, Y.; WU, Y.; JIN, Y.; NIU, J.; QU, N.; LIU, M.; KONG, W. Assembly and Immunogenicity of Human Papillomavirus Type 16 Major Capsid Protein (HPV16 L1) in *Pichia pastoris*. **Chem Res Chin Univ**, v. 23(2), p. 200-203, 2007.

LIU, W.J.; GISSMANN, L.; SUN, X.Y.; KANJANAHALUETHAI, A.; MULLER, M.; DOORBAR, J.; ZHOU, J. Sequence close to the N-terminus of L2 protein is displayed on the surface of bovine papillomavirus type 1 virions. **Virology**, v. 227, p. 474-483, 1997.

LIU, X.S.; JABBAR, I.A.; QI, Y.M.; FRAZER, I.H.; ZHOU, J. Mucosal immunization with papillomavirus virus-like particles elicits systemic and mucosal immunity in mice. **Virology**, v. 252, p. 39-45, 1998.

LORENZATO, F.; HO, L.; TERRY, G.; SINGERS, A.; SANTOS, L.C.; DE LUCENA BATISTA, R.; LUBAMBO, T. The use of human papillomavirus typing in detection of cervical neoplasia in Recife (Brazil). **Int J Gynecol Cancer**, v. 10, p. 143-150, 2000.

LUDMERER, S.W.; MCCLEMENTS, W.L.; WANG, X.M.; LING, J.C.; JANSEN, K.U.; CHRISTENSEN, N.D. HPV11 mutant virus-like particles elicit immune responses that neutralize virus and delineate a novel neutralizing domain. **Virology**, v. 266, p. 237-245, 2000.

LUDWIG, C.; WAGNER, R. Virus-like particles—universal molecular toolboxes. **Curr Opin Biotechnol**, v. 18, p. 537–545, 2007.

MACAULEY-PATRICK, S.; FAZENDA, M.L.; MCNEIL, B.; HARVEY, L.M. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast**, v. 22, p. 249-270, 2005.

MAMMAS, I.N.; SOURVINOS, G.; ZARAVINOS, A.; SPANDIDOS, D.A. Vaccination against Human Papilloma Virus (HPV): Epidemiological Evidence of HPV in Non-genital Cancers. **Pathol Oncol Res**, v. 17, p. 103–119, 2011.

MANSUR, M.; CABELLO, C.; HERNANDEZ, L.; et al. Multiple gene copy number enhances insulin precursor secretion in the yeast *Pichia pastoris*. **Biotechnol Lett**, v. 27 (5), p. 339- 345, 2005.

MASUDA, Y.; PATK, S.M.; OHKUMA, M.; OHTA, A.; TAKAGI, M. Expression of an endogenous and a heterologous gene in *Candida maltosa* by using a promoter of a new-isolated phosphoglycerate kinase (PGK) gene. **Curr Genet**, v. 25, p. 412- 417, 1994.

MCCANCE, D.J. Transcriptional regulation by human papillomaviruses. **Curr Opin Genet Dev**, v. 15, p. 515-519, 2005.

MCCLEMENTS, W.L.; WANG, X.M.; LING, J.C.; SKULSKY, D.M.; CHRISTENSEN, N.D.; JANSEN, K.U.; LUDMERER, S.W. A novel human papillomavirus type 6 neutralizing domain comprising two discrete regions of the major capsid protein L1. **Virology**, v. 289, p. 262-268, 2001.

MELMER, G. Biopharmaceuticals and the industrial environment. In Production of recombinant proteins – Novel microbial and eukaryotic expression systems. Edited by: Gellissen G. Weinheim: Wiley- VCH, p. 361-383, 2005.

MERCK & CO., INC. GARDASIL, Human Papillomavirus Quadrivalent (Types 6, 11, 16, and 18) Vaccine, Recombinant Suspension for intramuscular injection. Disponível em: <http://www.merck.com/product/usa/pi_circulars/g/gardasil/gardasil_pi.pdf>, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE/INCA. Viva Mulher. Câncer do Colo do Útero: Informações Técnico-Gerenciais e Ações Desenvolvidas. Rio de Janeiro: INCA, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE/INCA (2006). Perguntas e respostas mais frequentes. Disponível em <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=327>. Acesso em: 17 out. 2011.

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

MODIS, Y.; TRUS, B.L.; HARRISON, S.C. Atomic model of the papillomavirus capsid. **EMBO J**, v. 21, p. 4754-4762, 2002.

MOHR, I.J.; CLARK, R.; SUN, S.; ANDROPHY, E.J.; MACPHERSON, P.; BOTCHAN, M.R. Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator. **Science**, v. 250, p. 1694-1699, 1990.

MOSCICKI, A.B.; SCHIFFMAN, M.; KJAER, S.; VILLA, L.L. Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. **Vaccine**, v. 24, p. S42-51, 2006.

MOTOYAMA, S.; LADNINES-LLAVE, C.A.; VILLANUEVA, S.L.; MARUO, T. The role of human papilloma virus in the molecular biology of cervical carcinogenesis. **Kobe J Med Sciv**, v. 50, p. 9-19, 2004.

MUÑOZ, N.; BOSCH, F.X.; DE SANJOSE, S.; HERRERO, R.; et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **N Engl J Med**, v. 348, p. 518-527, 2003.

MUÑOZ, N.; CASTELLSAGUE, X.; DE GONZALEZ, A.B.; GISSMANN, L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine**, v. 24(Suppl 3), p. S3-1-S310, 2006.

NAKAUCHI, M.; KARIWA, H.; KON, Y.; YOSHII, K.; MAEDA, A.; TAKASHIMA, I. Analysis of severe acute respiratory syndrome coronavirus structural proteins in virus-like particle assembly. **Microbiol Immunol**, v. 52, p. 625-630, 2008.

NARA, F.; WATANABE, I.; SERIZAWA, N. Cloning and sequencing of the 3-phosphoglycerate kinase PGK gene from *Penicillium citrinum* and its application to heterologous gene expression. **Curr Genet**, v. 23, p. 134-140, 1993.

NATUNEN, K.; LEHTINEN, J.; NAMUJU, P.; SELLORS, J.; LEHTINEN, M. Aspects of prophylactic vaccination against cervical cancer and other human papillomavirus-related cancers in developing countries. **Infect Dis Obstet Gynecol**, v. 2011, p. 1-10, 2011.

NMA (Nucleus Medical Art). Progression of cervical Cancer: medical illustration. Disponível em:

<<http://catalog.nucleusinc.com/chooseexhibit.php?A=2&I=2&TL=1793&ExhibitKeywords=cervical+cancer>>, 2007.

NORONHA, V.; MELLO, W.; VILLA, L.L.; MACEDO, R.; BISI, F.; MOTA, R.; SASSAMOTO, K.; MONTAÍRO, T.; LINHARES, A. Human papillomavirus associated with uterine cervix lesions. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 32, p. 235-240, 1999.

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

PFISTER, H.; FUCHS, P.G. Anatomy, taxonomy and evolution of papillomaviruses. **Intervirol**, v. 37, p. 143-149, 1994.

PFISTER, H. Chapter 8: Human papillomavirus and skin cancer. **J Natl Cancer Inst Monogr**, v. 31, p. 52-56, 2003.

PIPER, P.; CURRAN, B.; DAVIS, M.; et al. A heat shock element in the phosphoglycerate kinase gene promoter of yeast. **Nucleic Acids Res**, v. 16, p. 1333-1348, 1988.

RODEN, R.B.; GREENSTONE, H.L.; KIRNBAUER, R.; BOOY, F.P.; JESSIE, J.; LOWY, D.R.; SCHILLER, J.T. In vitro generation and type-specific neutralization of a human papillomavirus type 16 virion pseudotype. **J Virol**, v. 70; p. 5875-5883, 1996.

ROMANOS, M. Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression. **Curr Opin Biotechnol**, v. 6, p. 527-533, 1995.

ROSENBLATT, C.; WROCLAWSKI, E.R.; LUCON, A.M.; PEREYRA, E.A.G. **HPV na prática clínica**. São Paulo: Editora Atheneu, 2005, p. 137-45.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 800p.

SANDAL, T. Molecular aspects of the mammalian cell cycle and cancer. **Oncologist**, v. 7, p. 73-81, 2002.

SANKARANARAVANAN, R.; ESMY, P.O.; RAJKUMAR, R.; MUWONGE, R.; SWAMINATHAN, R.; et al. Effect of visual screening on cervical cancer incidence and mortality in Tamil Nadu, India: a cluster-randomized trial. **Lancet**, v. 370, p. 398-406, 2007.

SANTI, L.; HUANG, Z.; MASON, H. Virus-like particles production in green plants. **Methods**, v. 40, p. 66-76, 2006.

SAPP, M.; FLIGGE, C.; PETZAK, I.; HARRIS, J.R.; STREECK, R.E. Papillomavirus assembly requires trimerization of the major capsid protein by disulfides between two highly conserved cysteines. **J Virol**, v. 72, p. 6186-6189, 1998.

SAPP, M.; VOLPERS, C.; MULLER, M.; STREECK, R.E. Organization of the major and the minor capsid proteins in human papillomavirus type 33 virus-like particles. **J Gen Virol**, v. 76, p. 2407-2412, 1995.

SCIENCE PHOTO LIBRARY. Disponível em <<http://www.sciencephoto.com/>>, 2011.

SCHEURER, M.E.; TORTOLERO-LUNA, G.; ADLER-STORTHZ, K. Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. **Int J Gynecol Cancer**, v. 15: p. 727–746, 2005.

SCORER, C.A.; CLARE, J.J.; MCCOMBIE, W.R.; ROMANOS, M.A.; SREEKRISHNA, K. Rapid selection using G418 of high copy number transformants of *Pichia pastoris* for high-level foreign gene expression . **Biotechnology**, v. 12, p. 181-184, 1994.

SHEN, S.; SULTER, G.; JEFFRIES, T.W.; CREGG, J.M. A strong nitrogen source-regulated promoter for controlled expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*. **Gene**, v. 216, p. 93-102, 1998.

SILVA, A.M.T.C.; AMARAL, A.M.V.T.; CRUZ, A.D. HPV e Câncer: O papel do papiloma vírus humano na carcinogênese. **Biotechnol Cienc Desenvol**, v. 29, p. 48-54, 2006.

SILVA, J.R.S.N. **Construção de vetores para superexpressão da proteína L1 do HPV16 em *Pichia pastoris***. 2010. Dissertação (mestrado) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo. São Paulo.

SINHA, J.; PLANTZ, B.A.; INAN, M.; MEAGHER, M.M. Causes of proteolytic degradation of secreted recombinant proteins produced in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: case study with recombinant ovine interferon-T. **Biotechnol Bioeng**, v. 89(1), p. 102–112, 2005.

SMITH, J.S.; LINDSAY, L.; HOOTS, B.; KEYS, J.; FRANCESCHI, S.; WINER, R. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-gradecervical lesions: a meta-analysis update. **Int J Cancer**, v. 121, p. 621–632, 2007.

SØRENSEN, H.P. Towards universal systems for recombinant gene expression. **Microb Cell Fact**, v. 30, p. 9-27, 2010.

SOUTHERN, S.A.; HERRINGTON, C.S. Disruption of cell cycle control by human papillomavirus with special reference to cervical carcinoma. **Int J Gynecol Cancer**, v. 10, p. 263-274, 2000.

SREEKRISHNA, K.; BRANKAMP, R.G.; KROPP, K.E.; BLANKENSHIP, D.T.; TSAY, J.; SIMTH, P.L.; WIERSCHKE, J.D.; SUBRAMANIAM, A.; BIRKENBERGER, L.A. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Gene**, v. 190, p. 55-62, 1997.

STANLEY, M.A. Human papillomavirus and cervical carcinogenesis. **Best Prac Res Clin Obstet Gynaecol**, v. 15, n. 5, p. 663-676, 2001.

- STANLEY, M.A. Immune responses to human papillomavirus. **Vaccine**, v. 24(S1), p. S16-S22, 2006.
- STERLING, J.C. Human papillomaviruses and skin cancer. **J Clin Virol**, v. 32, p. 67-71, 2005.
- STOREY, A.; PIM, D.; MURRAY, A.; OSBORN, K.; BANKS, L.; CRAWFORD, L. Comparison of the in vitro transforming activities of human papillomavirus types. **EMBO J**, v. 7, p. 1815-1820, 1988.
- SYRJANEN, S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. **J Clin Virol**, v. 32, p. 59-66, 2005.
- TAKAYA, N.; YANAI, K.; HORIUCHI, H.; OHTA, A.; TAKAGI, M. Cloning and characterization of two 3-phosphoglycerate kinase genes of *Rhizopus niveus* and heterologous gene expression using their promoters. **Curr Genet**, v. 25, p. 524-530, 1994.
- TEWARI, K.S.; TAYLOR, J.A.; LIAO, S.Y.; DISAIA, P.J.; BURGER, R.A.; JOMK, B.J.; HUGHES, C.C.W.; VILLAREAL, L.P. Development and assessment of a general theory of cervical carcinogenesis utilizing a severe combined immunodeficiency murinehuman xenograft model. **Gyn Onco**, v. 77, p. 137-148, 2000.
- TORRES, F.A.G.; MORAES, L.M.P. Proteínas recombinantes produzidas em leveduras. **Biotechnol. Ciênc. Desenvolv.**, v. 29, p. 20-22, 2002.
- TSAI, T.C.; CHEN, S.L. The biochemical and biological functions of human papillomavirus type 16 E5 protein. **Arch Virol**, v. 148, p. 1445-53, 2003.
- TSAO, Y.P.; LI, L.Y.; TSAI, T.C.; CHEN, S.L. Human papillomavirus type 11 and 16 E5 represses p21 (Waf1/Cip1) gene expression in fibroblasts and keratinocytes. **J Virol**, v. 70, p. 7535-9, 1996.
- VANHANEN, S.; PENTTILA, M.; LEHTOVAARA, P.; KNOWLES, J. Isolation and characterization of the 3-phosphoglycerate kinase gene (pgk) from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. **Curr Genet**, v. 15, p. 181-186, 1989.
- VARSANI, A.; WILLIAMSON, A.L.; ROSE, R.C.; JAFFER, M.; RYBICKI, E.P. Expression of human papillomavirus type 16 major capsid protein in transgenic *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi. **Arch Virol**, v. 148, p. 1771-1786, 2003.
- VASSILEVA, A.; CHUGH, D.A.; SWAMINATHAN, S.; KHANNA, N. Effect of copy number on the expression levels of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Protein Expr Purif**, v. 21, p. 71-80, 2001.
- VOUSDEN, K. Interactions of human papillomavirus transforming proteins with the products of tumor suppressor genes. **FASEB J**, v. 7, p. 872-879, 1993.

WANG, X.; WANG, Z.; DA SILVA, N.A. G418 selection and stability of cloned genes integrated at chromosomal delta sequences of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol Bioeng**, v. 49, p. 45-51, 1996.

WERNES, B.A.; LEVINE, A.J.; HOWLEY, P.M. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. **Science**, v. 248, p. 76-79, 1990.

WITTRUP, M.; JAHIC, M.; HULT, K.; ENFORS, S. Inducible versus constitutive expression of a lipase in *Pichia pastoris*: a comparative study using different fermentation techniques. **J Biotechnol**, v. 131, p. 149, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, Department of Immunization, Vaccines and Biologicals, Initiative for Vaccine Research Team. Report of the Consultation on Human Papillomavirus vaccines. World Health Organization; April 2005; Geneva, Switzerland. Geneva: Switzerland; October 2005; WHO/IVB/05.16

WHO/ICO. Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre). Human papillomavirus and related cancers in world. Summary Report. [09/26/2011]. Disponível em: <www.who.int/hpvcentre>, 2010.

WOODMAN, C.B.; COLLINS, S.I.; YOUNG, L.S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. **Nat Rev Cancer**, v. 7(1), p. 11-22, 2007.

YANG, W.C.; OKAYAMA, H.; HOWLEY, P.M. Bovine papillomavirus contains multiple transforming genes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 82, p. 1030-1034, 1985.

XI, S.Z.; BANKS, L.M. Baculovirus expression of the human papillomavirus type 16 capsid proteins: detection of L1-L2 protein complexes. **J Gen Virol**, v. 72, p. 2981-88, 1991.

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

ZHANG, W.; BEVINS, M.A.; PLANTZ, B.A.; SMITH, L.A.; MEAGHER, M.M. Modeling *Pichia pastoris* growth on methanol and optimizing the production of a recombinant protein, the heavy-chain fragment C of botulinum neurotoxin, serotype A. **Biotechnol Bioeng**, v. 70, n. 1, p. 1-8, 2000.

ZHANG, Y.; LIU, R.; WU, X. The proteolytic systems and heterologous proteins degradation in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Ann Microbiol**, v. 57, p. 553-560, 2007.

ZHOU, J.; SUN, X.Y.; STENZEL, D.J.; FRAZER, I.H. Expression of vaccinia recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles. **Virology**, v. 185, p. 251-257, 1991.

ZHOU, J.; SUN, X.Y.; FRAZER, I.H. Glycosylation of human papillomavirus type 16 L1 protein. **Virology**, v. 194, p. 210-8, 1993.

ZHU, T.; GUO, M.; SUN, C.; QIAN, J.; ZHUANG, Y.; CHU, J.; ZHANG, S. A systematical investigation on the genetic stability of multi-copy *Pichia pastoris* strains. **Biotechnol Lett**, v. 31, p. 679–684, 2009.

ZUR HAUSEN, H. Viruses in human cancers. **Science**, v. 254, p. 1167-73, 1991.

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

ANEXOS

Artigo científico publicado: *Brazilian Journal of Medical and 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.

Artigo científico publicado: *African Journal of Microbiology Research*

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

Review

Recent insights into Bovine Papillomavirus

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

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

Accepted 22 November, 2011

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

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

Artigo científico publicado: *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 Therapy and Experimental Studies, 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.

Artigo científico aceito para publicação: *Genetics and Molecular Research*

ARTICLE FOR GENETICS AND MOLECULAR RESEARCH

Title: Expression of Bovine Papillomavirus Type 1, 2 and 4 L1 gene in *Pichia pastoris*

Running Title: Expression of BPV 1, 2 and 4 L1 gene in *Pichia pastoris*

A.L.S. Jesus¹, F.C. Mariz¹, H.M. Souza¹, M.N. Cordeiro¹, E.C. Coimbra¹, L.M. Nascimento², M.C.G. Leitão¹, R.C. Stocco³, W. Beçak³ 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:

Antonio Carlos de Freitas

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

Phone number: +55 81 21268569

Email: antonio.freitas@pq.cnpq.br

ABSTRACT

Papillomaviruses are known to cause benign or malignant lesions in various animals. In cattle, bovine papillomavirus (BPV) is the etiologic agent of the papillomatosis and neoplasia of the upper gastrointestinal tract and urinary bladder. In equine, BPV is related with the equine sarcoid. So far there is not a standard diagnostic test and prophylactic vaccines. Protection against papillomavirus infection is conferred by neutralizing antibodies directed to 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. *Pichia pastoris* has been reported as efficient system for expression of different proteins due to reduced cost and high levels of protein production. In this study, we evaluated *P. pastoris* for expression of L1 gene from BPV1, BPV2 and BPV4. After methanol induction, the recombinants were able to produce L1 proteins of the three different BPV types. However, the levels of heterologous protein were relatively low. To achieve higher levels of heterologous L1 protein, the codon optimization strategy was used in bioreactor conditions. BPV1 L1 protein was identified by monoclonal antibody anti-6xHis. As far we concern, this is the first report of BPV L1 expression in yeast.

Análises *in silico* da proteína L1 de HPV-16 quanto à presença de sítios de glicosilação e degradação por proteases.

MSLWLPSEATVYLPFVPVSKVVSTDEYVARTNIYYHAGTSRLAVGHPYFPIKKPNNKILVPKVSGLQYRVFRI
HLPDPNKFPGPDTSFYNPDTQRLVWACVGVEVGRGQPLGVGISGHPLLNKLDDETENASAYAANAGVDNRECISMD
YKQTQLCLIGCKPPIGEHWGKGSPTCNVAVNPGDCPPELINTVIOGDMVDTGFGAMDFTTLQANKSEVPLDIC
TSICKYPDYIKMVSEPYGDSLFFYLRRQMFVRHLFNRAVAVGENVPDDLYIKSGSGSTANLASSNYFPTPSGSMV
TSDAQIFNKPYWLQRAQGHNNGICWGNQLFVTVDTRSTNMSLCAAISTSETTYKNTNFKEYLRHGEEYDLQFI
FQLCKITLTADVMTYIHSMNSTILEDWNFGLQPPPGGTLEDTYRFVTSQAIACQKHTPPAPKEDPLKKYTFWEVN
LKEKFSADLDQFPLGRKFLLQAGLKAKPKFTLGKRKA TPTTSSTSTTTKRKRKLHHHHH

Figura 26. Análise *in silico* quanto à presença de sítios de glicosilação e de clivagem por proteases na sequência da proteína L1 de HPV-16. As marcações em vinho se referem aos sítios de clivagem pela protease leucina-aminopeptidase; as marcações com letras em vermelho se referem aos sítios de N-glicosilação, enquanto o sítio destacado em amarelo (NKS) indica uma tríade altamente favorável para adição de N-glicossídeos; a marcação em azul claro indica uma região potencialmente susceptível a O-glicosilações; a marcação em verde indica a cauda de histidina.

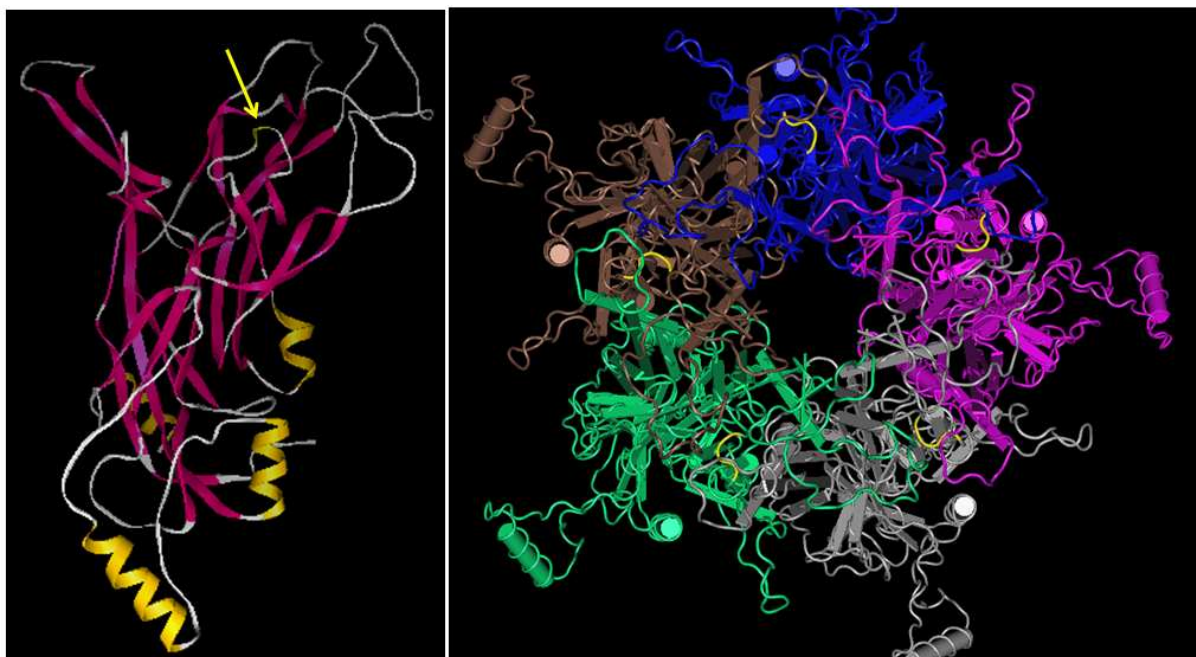


Figura 27. Ilustrações tridimensionais nas quais o sítio NKS para N-glicosilação é destacado em amarelo a partir das cadeias da proteína L1. (A) O monômero de L1. (B) O pentâmero de L1.



Figura 28. Ilustrações tridimensionais nas quais os sítios para clivagem pela protease leucina-aminopeptidase são destacados em amarelo a partir das cadeias da proteína L1. **(A)** O monômero de L1. **(B)** O pentâmero de L1.