

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM BIOQUÍMICA

ELAINE VIRGÍNIA MARTINS DE SOUZA

Título da dissertação:

Clonagem da oncoproteína E6 do papilomavírus humano (HPV) sorotipo 16

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Giovani Rota Bertani

CO-ORIENTADORA:

Prof^ª. Dr^ª. Danyelly Bruneska Gondim Martins

Recife, 2007.

ELAINE VIRGÍNIA MARTINS DE SOUZA

Clonagem da oncoproteína E6 do papilomavírus humano (HPV) sorotipo 16

Dissertação apresentada
para o cumprimento
parcial das exigências para
obtenção do título de
Mestre em Bioquímica
pela Universidade Federal
de Pernambuco.

Souza, Elaine Virgínia Martins de
Clonagem da oncoproteína E6 do papilomavírus humano (HPV) sorotipo 16 /
Elaine Virgínia Martins de Souza . – Recife: O Autor, 2007.

58 folhas: il., fig.

Dissertação (mestrado) – Bioquímica - Universidade Federal de
Pernambuco. CCB, 2007.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Papilomavírus. 2. HPV-16. 3. Oncogene. 4. P. pastoris. 5. E6.
I.Título.

618.14-006 CDU (2.ed.)

UFPE

616.994 CDD (22.ed.)

CCB – 2007-079

BANCA EXAMINADORA

Titulares:

Prof. Dr. Giovani Rota Bertani (Departamento de Bioquímica/UFPE e Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami)

Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho (Departamento de Bioquímica/UFPE e Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami)

Prof. Dr. Gandhi Rádis Baptista (Departamento de Bioquímica/UFPE e Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami)

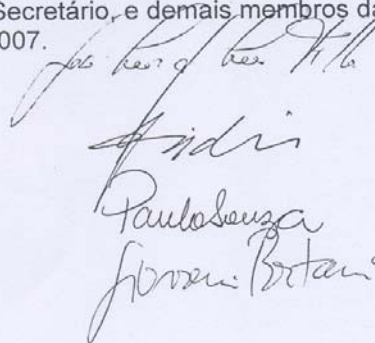
Prof. Dr. P (Paulo Roberto Eleutério de Souza (Associação de Ensino Superior de Caruaru e Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami) Universidade Salgado Oliveira/ Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami)

Suplente:

Profa. Dra. Maria da Paz Carvalho e Silva (Departamento de Bioquímica/UFPE e Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami)

Ata da defesa de dissertação da Mestranda **Elaine Virgínia Martins de Souza**, realizada em 16 de fevereiro de 2007, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Às 09:10 minutos do dia 16 de fevereiro de 2007, foi aberto, na Sala de Aulas do LIKA/UFPE, o ato de defesa de dissertação da mestranda **Elaine Virgínia Martins de Souza**, aluna do Curso de Mestrado em Bioquímica. Iniciando os trabalhos o Prof. Dr. Giovani Rota Bertani, orientador da aluna, em virtude da impossibilidade da presença da Coordenadora do Curso, Profa. Vera Lúcia de Menezes Lima, fez a apresentação da aluna, de seu orientador, ele próprio, de sua co-orientadora, Profa. Dra. Danyelly Bruneska Gondim Martins, da UNIVERSO e Pesquisadora do LIKA/UFPE, e da Banca Examinadora composta pelos professores doutores: Giovani Rota Bertani, na qualidade de Presidente, José Luiz de Lima Filho, Gandhi Rádís Baptista, os três do Depto. de Bioquímica/UFPE, Paulo Roberto Eleutério de Souza, da Associação Caruaruense de Ensino Superior e Pesquisador do LIKA/UFPE. Após as apresentações, o Sr. Presidente convidou a aluna para a apresentação de sua dissertação intitulada: **"Clonagem da oncoproteína E6 do papilomavírus humano (HPV) sorotipo 16"**, e informou que de acordo com o Regimento Interno do Curso, o candidato disporia de até 50 (cinquenta) minutos para apresentação do trabalho e o tempo de arguição para cada examinador, juntamente com o tempo gasto pelo aluno para responder às perguntas seria de 30 (trinta) minutos. A aluna procedeu a explanação e comentários acerca do tema em 35 (trinta e cinco) minutos. Em seguida, o Sr. Presidente convidou a Banca Examinadora para ocupar seus lugares e passou a palavra ao primeiro examinador, o Prof. Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza, em seguida para o Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho, e finalmente para o Prof. Dr. Gandhi Rádís Baptista, os quais agradeceram o convite, fizeram alguns comentários, deram sugestões e iniciaram suas respectivas arguições. Ao final das mesmas, os referidos professores deram-se por satisfeitos. Em seguida, o Sr. Presidente usou da palavra para tecer alguns comentários, agradecer à Banca Examinadora e parabenizar a candidata. Finalmente, a sessão foi suspensa para proceder ao julgamento pela Banca Examinadora, a qual se reuniu na Secretaria do LIKA. Após alguns comentários, a Banca decidiu, por unanimidade, conceder a menção **"Aprovada com Distinção"**. Nada mais havendo a tratar, lavrei a presente ata que vai assinada por mim, Secretário, e demais membros da Banca Examinadora. Recife, 16 de fevereiro de 2007.



The block contains four handwritten signatures in black ink. From top to bottom, they are: the signature of José Luiz de Lima Filho, the signature of Gandhi Rádís Baptista, the signature of Paulo Roberto Eleutério de Souza, and the signature of Giovani Rota Bertani.

ÍNDICE ANALÍTICO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	11
2.1 Câncer do colo do útero no Brasil e no mundo.....	11
2.2 Infecção e diagnóstico.....	11
2.2.1 <i>Classificação do achado citológico.....</i>	14
2.3 Prevenção e tratamento.....	16
2.4 Papilomavírus versus Câncer do Colo do Útero.....	17
2.4.1 <i>O genoma viral.....</i>	21
2.4.2. <i>Oncogenes e oncoproteínas.....</i>	22
2.4.3 <i>Ciclo e integração viral.....</i>	24
2.5 Vacinas profiláticas e terapêuticas.....	27
2.5.1 <i>Vacinas profiláticas.....</i>	28
2.5.2 <i>Vacinas terapêuticas.....</i>	29
2.6 Sistemas de expressão.....	30
2.6.1 <i>Pichia pastoris vesus proteínas recombinantes.....</i>	30
3 JUSTIFICATIVA.....	31
4 OBJETIVOS.....	32
4. 1 <i>Objetivo geral.....</i>	32
4.2 <i>Objetivos específicos.....</i>	32
<i>Artigo a ser enviado para o periódico Virus Gene (IF: 1,4).....</i>	33
5 CONCLUSÃO.....	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
ANEXOS.....	54
ANEXO A	55
ANEXO B	56
ANEXO C	57
ANEXO D	58

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer em primeiro lugar ao meu Deus, o qual me sustentou durante toda minha jornada acadêmica, e sem sua ajuda nada do que realizei seria possível.

Aos meus familiares por toda compreensão e carinho, em especial aos meus pais e minha querida avó Virgínia Martins. E também gostaria de agradecer a Luciano Alves pelo seu amor e atenção.

Aos meus orientadores Prof. Dr. Giovani Bertani e Prof^ª. Dr^ª. Danyelly Bruneska Gondim Martins pelo apoio sem igual. E quero agradecer em especial a Prof^ª. Dr^ª. Danyelly Bruneska Gondim Martins pela sua amizade e suporte nos momentos mais difíceis.

Aos meus amigos de laboratório pela sua dedicação e paciência. E por terem me ajudado na realização deste trabalho.

Aos meus grandes amigos do grupo HPV e ao grupo de Polimorfismos, pela união e alegria em todas as etapas para desenvolvimento deste projeto.

Ao Departamento de Bioquímica da UFPE, aos professores do departamento e em especial a Prof^ª. Dr^ª. Maria da Paz e aos funcionários Albérico, Miron, Neide, João, Djalma e Ademar pela sua contribuição nesta jornada.

Ao Diretor do Laboratório de Imunopatologia Kiezo-Asami (LIKA) Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho por ceder as condições de infra-estrutura e suporte necessárias para a realização deste trabalho. E a todos os funcionários do LIKA pelo carinho.

Aos órgãos financiadores por patrocinar este estudo.

Aos meus irmãos e eternos amigos de graduação Robson Amaro, Dayse Vasconcelos, Isabel Silvânia, Joanna d'Arc, Maíra Mafra e Suany Melo por estarem sempre ao meu lado nos momentos mais difíceis, pois como diz o Provérbio “Em todo tempo ama o amigo, e na angústia se faz o irmão”.

As minhas amigas Joelma Henrique e Norma Maranhão pelos momentos de amizade e ajuda.

E aos meus queridos amigos de turma do mestrado por todos os momentos agradáveis passados juntos e a amiga de turma Juliene Coelho.

E a todos que de forma direta ou indiretamente ajudaram para conclusão deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Coilócitos distribuídos na camada superficial do epitélio	13
Figura 2 (A) Foto do colo do útero com inflamação	17
Figura 2 (B) Verrugas “cutâneas” acometendo a região genital	17
Figura 3. Representação esquemática do genoma HPV	18
Figura 4. Árvore filogenética contendo a sequência de 118 tipos de papilomavírus	20
Figura 5. Representação mostrando o ciclo celular do HPV	25
Figura 6. Representação esquemática da integração do DNA de HPV ao DNA da célula hospedeira, apresentando a sequência deletada nesta inserção	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação segundo Papanicolau e Sistema de Bethesda com suas respectivas interpretação e orientações	15
Tabela 2. Os gêneros de papilomavírus pertencentes à família Papillomaviridae mais estudados e suas propriedades biológicas e clínicas mais importantes	19
Tabela 3. Classificação de HPV's segundo o seu potencial de induzir malignidade em células	21
Tabela 4. Os genes codificados pelo HPV, com seus respectivos tamanhos e funções.....	22

RESUMO

Clonagem da oncoproteína E6 do papilomavírus humano (HPV) sorotipo 16

Cerca de 490.000 novos casos de câncer cervical têm ocorrido entre mulheres do mundo todo a cada ano. No Brasil, a estimativa de incidência aponta o câncer de colo do útero como o terceiro mais comum entre as mulheres no ano de 2006, com estimativa de 19.260 novos casos em todo o país. Segundo o INCA (2006), no estado de Pernambuco, estima-se que ocorram 22,16 novos casos para cada 100.000 mulheres. O papilomavírus humano (HPV) é o principal agente envolvido em lesões benignas e malignas, sendo caracterizados como baixo-risco e alto-risco, respectivamente. Os HPVs de alto-risco, como os sorotipos 16 e 18, são capazes de produzir as oncoproteínas E6 e E7 que alteraram as funções das proteínas regulatórias do ciclo, como as proteínas p53 e retinoblastoma, respectivamente. Devido à dificuldade de cultivo do HPV em cultura de tecidos, a clonagem destes genes representa uma possibilidade de estudos mais avançados. Entre os novos sistemas de expressão de proteínas heterólogas, pode-se destacar *Pichia pastoris* que é facilmente manipulada, e possui a capacidade de expressar a proteína de interesse em altos níveis e também realizar modificações pós-transducionais. Assim, o objetivo do presente trabalho é clonar o gene E6 do HPV 16 em *P. pastoris*. Para tanto, o gene E6 do HPV 16 (477 bp) foi clonado diretamente no vetor pPICZA (3.300 bp), amplificado em *Escherichia coli* DH5α e linearizado com *SacI* para ser integrado ao genoma da levedura por recombinação. Todos os clones obtidos foram submetidos à PCR com primers específicos, linearizações com enzimas e sequenciamento. O resultado obtido com o PCR da *P. pastoris* transformante apresentou tamanho correspondente ao gene E6. A sequência gênica dos nucleotídeos apresentou um “score” de 93% quando alinhado com a sequência gênica da E6 do HPV 16 depositada nos bancos de dados gênicos. Os clones obtidos permitirão a expressão desta oncoproteína por *P. pastoris*, e desta forma, o desenvolvimento de vacinas terapêuticas ou medicamentos sítio-específico capazes de erradicar a doença.

Palavra chave: papilomavírus, HPV-16, E6, oncogene, *P. pastoris*.

e-mail: elainevms@yahoo.com.br

ABSTRACT

Worldwide, about 490,000 new cases of cervical cancer occur among women each year. In Brazil, it is estimated that cervix cancer is the third cancer more common among women, with 19,260 new cases in the country. According to INCA (2006), in Pernambuco state the number may reach to 22.6 new cases to each 100,000 women. Human papillomavirus (HPV) is the main etiologic agent associated with benign and malignant lesions, and has been characterized as low-risk and high-risk, respectively. The high-risk HPVs, like HPV-16 and HPV-18, are able to produce E6 and E7 proteins that affect the function of cellular regulatory proteins, such as p53 and retinoblastoma gene product, respectively. Due to the difficulty to maintain HPV in tissue culture, cloning of HPV genes represents a possibility of advances in virus studies. Among all expression systems for heterologous proteins, *Pichia pastoris* has been indicated once it is easily manipulated and capable to express protein in high level with posttranslational modification. Thus, the aim of this work was to clone HPV-16 E6 gene in *P. pastoris*. Therefore, E6 gene (477 bp) was cloned into pPICZA shuttle vector (3,300 bp), amplified in DH5 α *Escherichia coli* and integrated to *P. pastoris* genome by recombination. All the clones obtained were submitted PCR with specific primers and sequenced. The result obtained with the PCR from *P. pastoris* GS115 pPICZE6.16 presented the correct size, corresponding to E6 gene. The gene sequence demonstrated a 93% score when aligned with the gene sequence of E6 HPV-16 available in NCBI genome databank. The clones obtained will allow E6 expression by *P. pastoris*, and therefore, the development of therapeutic vaccines or site-specific drugs to treat this disease.

Key words: papillomavirus, HPV-16, E6 protein, *Pichia pastoris*, oncogene, recombinant protein.

1 INTRODUÇÃO

Anualmente, cerca de 490.000 novos casos de câncer cervical são diagnosticados no mundo. No Brasil, o câncer do colo do útero é o terceiro mais comum entre as mulheres com estimativa de 19.260 novos casos para 2006. Pernambuco apresenta uma das mais altas incidência de novos casos, sendo de 22,16 para cada 100.000 mulheres. Em 1992, o papilomavirus humano (HPV) foi declarado como principal agente causador de lesões benignas e malignas no colo do útero, o que pode levar ao desenvolvimento do câncer cervical. A capacidade destes vírus de induzir a malignidade tem permitido classifica-los em alto-risco e baixo-risco. Os sorotipos 16 e 18 são capazes de produzir as oncoproteínas E6 e E7 que alteraram as funções das proteínas regulatórias do ciclo. A proteína viral E6 se liga à proteína celular p53, envolvida no controle do ciclo celular, inativando-a. Este fato propicia o desenvolvimento anormal e descontrolado das células infectadas, e consequentemente ao câncer do colo do útero. Vários estudos têm sido desenvolvidos para elucidar o mecanismo de infecção e manutenção do vírus nas células infectadas, bem como para construir estratégias vacinais. Devido à dificuldade de cultivo do HPV em cultura de tecidos, a clonagem destes genes representa uma possibilidade de desenvolvimento de estudos mais avançados em relação à infecção pelo HPV no país de maior incidência na América Latina. Desta forma, a utilização de sistemas de expressão de proteínas heterólogas tem se tornado cada vez mais atraente para obtenção de grandes quantidades de proteína ou peptídeos virais que tenham potencial para auxiliar nas buscas científicas. Dentre os sistemas de expressão disponíveis, podemos destacar a levedura *Pichia pastoris* como adequada para obtenção de alto rendimento de proteína heteróloga uma vez que é facilmente manipulada, pode crescer em metanol, realiza modificações pós-transducionais e produz proteínas com níveis adequados de glicosilação. Tais características, a torna mais indicada para expressão da oncoproteína E6 de HPV-16 quando comparada à *Saccharomyces cerevisiae* - conhecida pela hiperglicosilação de proteínas heterólogas - e à *Escherichia coli*, no qual as proteínas permanecem como corpos de inclusão. Assim, o objetivo do presente trabalho é clonar o gene E6 do HPV 16 em *P. pastoris*. A obtenção de *P. pastoris* recombinante, capaz de expressar E6 de HPV-16, viabilizará a produção de proteínas em quantidade suficiente para permitir estudos cristalográficos e imunológicos visando erradicar esta doença.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Câncer do colo do útero no Brasil e no mundo

Cerca de 490.000 novos casos de câncer cervical tem surgido entre mulheres do mundo todo a cada ano. A incidência desta doença varia em torno de 5 casos para cada 100.000 mulheres em muitos países industrializados, em comparação com os mais de 50 casos por 100.000 mulheres em países em desenvolvimento (FERLAY *et al.*, 2004).

Aproximadamente 80% de todos os casos ocorrem em países subdesenvolvidos. As razões para a permanência de altas taxas de incidência e mortalidade por câncer do colo do útero em países subdesenvolvidos encontram-se: alta frequência dos fatores de riscos, programas preventivos inexistentes ou ineficazes, inexistência de planos educacionais e sociais (PINHO, FRANÇA-JÚNIOR, 2003).

No Brasil a estimativa de incidência aponta o câncer de colo do útero como o terceiro mais comum entre as mulheres no ano de 2006, sendo superado apenas pelo câncer de pele (não-melanoma) e pelo câncer de mama, este câncer constitui a quarta causa de morte por câncer em mulheres. Em 2006, a estimativa foi de 19.260 novos casos por câncer do colo do útero em todo o país, com um risco estimado de 20 novos casos a cada 100.000 mulheres. No estado de Pernambuco esta taxa é ainda maior, chegando à estimativa de 22,16 casos para cada 100.000 mulheres (INCA, 2006).

2.2 Infecção e diagnóstico

A infecção pelo papilomavírus humano (HPV) ocorre por contato sexual e resulta inicialmente em uma discreta lesão intraepitelial em mulheres. Muitas destas lesões desaparecem 6-12 meses depois, provavelmente devido à intervenção do sistema imune. Uma pequena porcentagem, entretanto, persiste podendo progredir para uma lesão intraepitelial de alto grau, carcinoma “in situ” e, carcinoma de células escamosa ou um adenocarcinoma de cérvix quando não ocorre uma intervenção cirúrgica (ZUR HAUSEN, 2002).

Estudos relataram que algumas mulheres infectadas com o vírus do HPV na região do cérvix, não progrediam para um câncer cervical, demonstrando que um número de outros co-fatores deve estar envolvido no processo da patologia. Há três grupos de co-fatores em potencial: (1) co-fatores externos ou ambientais, incluindo contraceptivos, tabagismo, número de filhos (sete ou mais), co-infecção com outros agentes transmitidos sexualmente e hábitos alimentares (aumento da homocisteína sanguínea). (2) Co-fatores virais, como co-infecção com outros tipos e variantes de HPV, (3) co-fatores inerentes ao hospedeiro, incluindo o sistema hormonal, fatores genéticos, e outros fatores do sistema imune (MUNÕZ *et al.*, 2006).

Para que ocorra a infecção pelo HPV é necessário que os vírus penetrem nas células da camada basal do tecido epitelial, e para alguns tipos de HPV é preciso que haja pequenas lesões para que ocorra a infecção. Para os vírus considerados de alto risco, como o HPV-16, a formação de lesões cervicais pode facilitar a infecção de células colunares, e subseqüentemente a infecção da membrana basal do epitélio estratificado da zona de transformação. Controvérsias existem sobre a natureza dos receptores de superfície celular; porém na maioria dos estudos têm-se sugerido a presença de sulfato de heparina como facilitador da entrada do vírus na célula (DOOBAR, 2005; GIROGLOU *et al.*, 2001).

Evidências clínicas indicam que a expressão viral é realizada no queratócito, ou nas células com potencial de maturação. O tempo para infecção e liberação dos vírus é de aproximadamente 3 semanas, tempo necessário para que queratinócitos se diferenciem e descamem. Assim, com o objetivo de permitir a replicação viral, as proteínas virais retardam a condensação nuclear dos queratinócitos em diferenciação, formando os coilócitos (Figura 1). A identificação dos tipos de HPV envolvidos na lesão do cérvix pode resultar em um tratamento mais rápido e eficaz. O teste de Papanicolau, técnica que foi descrita por George Papanicolaou em 1941, fundamenta-se na coleta de amostras para interpretação da morfologia das células que são liberadas da superfície do cérvix. Os critérios incluídos na avaliação das células constituem: a razão do tamanho célula/núcleo, o formato e intensidade da coloração do núcleo, arquitetura nuclear e da cromatina, formato da membrana nuclear e razão entre o volume do citoplasma e do núcleo (SASIENI *et al.*, 1996).

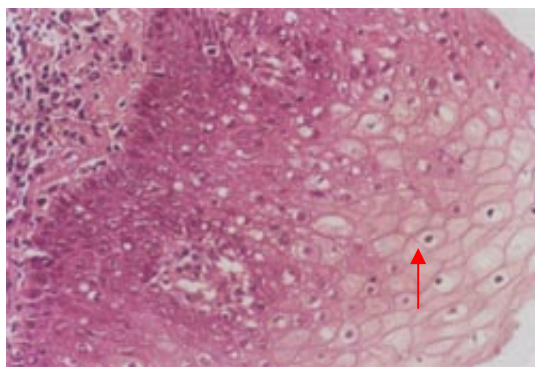


Figura 1 - Coilocitos distribuídos na camada superficial do epitélio (HE-200x) (OLIVEIRA *et al.*, 2003).

Entretanto, cientificamente, existe a possibilidade de uma pequena fração de tumores cervicais serem negativos em relação à presença do HPV, devido à capacidade das células epiteliais em desenvolver câncer espontaneamente ou por alguma mutação gênica (BOSCH *et al.*, 1995).

Os avanços biotecnológicos permitiram detectar com maior eficiência a presença do vírus HPV em amostras coletadas a partir de pacientes infectadas, o que aumentou drasticamente os índices de prevalência. No início de 1980, o uso de “Southern Blot” identificou o vírus HPV em 40-70% dos casos. A introdução da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) aumentou as estimativas para 70-90%. A perspectiva é de chegar a 100% de eficiência no diagnóstico laboratorial com o uso de sondas específicas e condições ideais para o teste (BOSCH, MUNÕZ, 2002).

Apesar das novas tecnologias, ainda há registros de não detecção do DNA de HPV em lesões de câncer cervical. Em estudo com cerca de 1.000 casos de câncer cervical, envolvendo 22 países e usando os *primers consensus* MY09 e MY11 para identificação por PCR, a prevalência de DNA de HPV foi de 93%. Porém, estudos posteriores revelaram que o perfil sorológico dos pacientes classificados como HPVs-negativos apresentava-se de forma similar aos HPVs-positivos, demonstrando que a maioria dos pacientes que obtiveram resultados negativos para a presença do HPV eram na realidade HPVs positivos (ANDERSON *et al.*, 2001).

A hibridização *in situ* (HIS) constitui uma técnica ainda mais sensível, capaz de detectar seqüências específicas de DNA ou RNA, utilizando-se seqüência complementar de ácidos nucleicos (sonda) marcada radioativa ou quimicamente. Métodos mais recentes de amplificação dos sinais de detecção, utilizando a deposição de catalisador nos sítios de hibridização no tecido aumentaram a sensibilidade da HIS, sendo possível

detectar até uma única cópia viral por célula e avaliar o estado físico (epissomal ou integrado ao genoma do hospedeiro) do HPV. A HIS também possibilita estabelecer a correlação com os aspectos histopatológicos (BAGARELLI, OLIANI, 2004; VILLA, 2000). Atualmente, já existem kits comerciais de sondas marcadas específicas para diferentes tipos de HPVs, e tem-se recomendado este tipo de diagnóstico laboratorial juntamente com os procedimentos convencionais da citologia (ZUR HAUSEN, 2002).

2.2.1 Classificação do achado citológico

A classificação de Papanicolau foi descrita no final da década de 20 e amplamente divulgada nos meados da década de 40. Esta classificação sofreu mudanças ao longo do tempo a fim de facilitar o diagnóstico da doença e os resultados obtidos no exame de Papanicolau, passando a relacionar o comportamento histológico das lesões e não mais indicando apenas o número da classe (SOUZA *et al.*, 2004).

Diante disso, o Instituto Nacional do Câncer (*National Cancer Institute* - NCI), em 1988, patrocinou a criação de uma nova e atualizada terminologia a ser aplicada nos laudos da colpocitologia oncótica, a "Classificação de Bethesda", que visava corrigir essas falhas existentes na classificação de Papanicolaou e imprimir mais uniformidade aos laudos citológicos dos esfregaços do colo uterino. As recomendações surgidas passaram a ser chamadas de Sistema de Bethesda - TBS - *The Bethesda System* (NATIONAL CANCER INSTITUTE WORKSHOP, 1989), que foi revisada em 1991. Esta classificação foi atualizada em 2001 com introdução da especificação do tipo de amostra, a notificação de um exame automatizado e a realização de técnicas complementares (teste HPV) (FRAPPART, L. *et al.*, 2001).

Com o TBS foram introduzidos os termos citológicos de lesões intra-epiteliais escamosas de baixo grau (LSIL) e lesões intra-epiteliais escamosas de alto-grau (HSIL). As LSIL compreendem os achados citopatológicos sugestivos de infecção pelo HPV e as neoplasias intra-epiteliais de grau leve (NIC I). Já as HSIL incluem as neoplasias intra-epiteliais de grau moderado (NIC II) e de grau acentuado (NIC III). Embora essa nomenclatura não substitua os termos histológicos, os diagnósticos de LSIL ou HSIL apresentam correspondência com a possibilidade de progressão da patologia (NATIONAL CANCER INSTITUTE WORKSHOP, 1989).

Tabela 1. Classificação segundo Papanicolau e Sistema de Bethesda com suas respectivas interpretação e orientações. http://www.prevencaodecancer.com.br/003_a.htm.

Classificação		Interpretação	Orientação
Papanicolau	Sistema de Bethesda		
Classe I	Negativo para células neoplásicas	NORMAL	Repetir exame em 1 ano ou conforme orientação médica
Classe II	Inflamatório	NORMAL Característico da 2a fase do ciclo ou pode existir algum corrimento	Repetir exame em 1 ano ou conforme orientação médica e tratar inflamação se necessário
Atipia celular escamosa	ASCUS - atipias de células escamosas de caráter desconhecido	Leve suspeita de alteração	Colposcopia e a biópsia dirigida que definirá o tratamento
Atipia celular glandular	AGUS - células glandulares atípicas	Suspeita de alteração	Colposcopia e a biópsia dirigida que definirá o tratamento. Se a mulher estiver na menopausa, é necessário investigar o endométrio.
Classe III	LSIL - lesão intra-epitelial de baixo grau	ALTERADO	Colposcopia e a biópsia dirigida que definirá o tratamento
	HSIL - lesão intra-epitelial de alto grau	ALTERADO	Idem
Classe IV	HSIL - lesão de alto grau	ALTERADO	Idem
Classe V	Suspeita de câncer	ALTERADO	Idem

De acordo com a evolução do quadro clínico do paciente, o Programa Nacional de Combate ao Câncer do Colo Uterino (PNCC) definiu diversas lesões. Estão entre as lesões intraepiteliais de baixo grau (LBG – grau I), as alterações citológicas induzidas pelo HPV, atipias de células escamosas de caráter desconhecido (ASCUS), atipias de células glandulares de significado indeterminado (AGUS) e neoplasia intra-epitelial

grau I (NIC I). As alterações NIC II e III (neoplasias intra-epiteliais de graus II e III) estão classificadas como lesões intra-epiteliais de alto grau (LAG; INCA, 2006).

2.4 Prevenção e tratamento

Medidas efetivas para eliminação do HPV tiveram início há 50 anos com a introdução do teste de Papinicolau. Essas ações permitiram uma redução em mais de 75% da incidência de câncer cervical em países no qual programas foram implementados de maneira eficaz (WRIGHT *et al.*, 2006; PAPANICOLAU, TRAUT, 1997). O exame colpocitológico ou teste de Papanicolaou, dentre os métodos de detecção, tem sido considerado o mais efetivo e eficiente a ser aplicado coletivamente em programas de rastreamento do câncer cérvico-uterino, sendo uma técnica amplamente difundida há mais de 50 anos (PINHO, FRANÇA-JUNIOR, 2003).

Uma vez detectada a infecção, o tipo de tratamento depende de fatores como condição clínica do paciente, idade, estágio da doença, tipo e extensão do tumor (MUNÕZ *et al*, 2006). No estágio inicial, o tratamento pode ser escolhido de acordo com as características da lesão e os aspectos clínicos da mulher. Pode variar desde métodos ablativos (eletro coagulação diatérmica, criocoagulação, termocoagulação e vaporização com laser CO₂) a métodos cirúrgicos (conização a bisturi frio, conização a laser e conização com bisturi de alta frequência, esta última chamada de cirurgia de alta frequência). A cirurgia de alta frequência (CAF) tem recebido apoio entusiasmado em todo o mundo, devido às inúmeras vantagens da técnica, entre elas: tratamento ambulatorial, uso de anestesia local, equipamento simples e de baixo custo, técnica de fácil e rápida execução, amostras histológica de boa qualidade, baixa incidência de complicações e adesão das usuárias (FIGO, 2003).

Como desvantagem, pode apresentar lesão térmica das paredes vaginais, hemorragia (se a profundidade da incisão é grande) e artefatos térmicos, caso a técnica não seja utilizada de forma adequada. A cirurgia radical (histerectomia) e radioterapia são bastante utilizadas em situações em que o paciente já apresenta o tumor, mas estabelecido restrito ao colo do útero, enquanto que a quimioterapia tem sido empregada em protocolos de pesquisa. O tratamento cirúrgico consiste na retirada do útero, porção superior da vagina e linfonodos pélvicos. Pode ser realizada via abdominal ou via vaginal com laparoscopia. Os ovários podem ser preservados nas pacientes jovens. O

tratamento radioterápico pode ser efetuado quando o tratamento cirúrgico for contra-indicado e nos demais casos. Nas pacientes com envolvimento da bexiga e/ou reto a radioterapia pode preceder à cirurgia (FIGO, 2003).

No ano de 1998, motivado pelos dados estatísticos e embasado na orientação da “Cancer Care International” (CCI), o Ministério da Saúde instituiu o PNCC (INCA, 2002), tendo como método de rastreamento o exame citológico de Papanicolaou, e como método de tratamento a CAF para lesões intra-epiteliais pelo método “Ver e Tratar”. Este programa definiu a estratégia organizacional, as intervenções, os critérios para diagnóstico e as condutas clínicas diante dos resultados dos exames citológicos (NETO *et al*, 2001).

2.5 Papilomavírus versus Câncer do Colo do Útero

Por décadas, vários agentes etiológicos foram propostos como indutores do câncer cervical, dentre os quais podemos citar: *Treponema pallidum* (sífilis), *Neisseria gonorrhoeae* (gonorréia), clamídia, e o vírus do herpes simples 2 (BOSCH, MUNÔZ, 2002). Entre 1974 e 1976, estudos começaram a postular e analisar a possibilidade do papilomavírus humano estar envolvido na etiologia do câncer (ZUR HAUSEN *et al.*, 1974). Em 1976, houve duas publicações relatando que o aparecimento de coilócitos em biópsias do cérvix (Figura 2a) era um indicativo da presença de infecção pelo HPV (MEISELS, FORTIN, 1976). Entretanto, apenas na segunda metade da década de 70 teve início um pequeno interesse pelo HPV, devido ao seu envolvimento com “verrugas cutâneas” de lesões benignas em humanos (Figura 2b). Os papilomavírus compõem um grupo diverso de vírus que estão estabelecidos em 20 espécies diferentes, como humanos, aves e répteis.

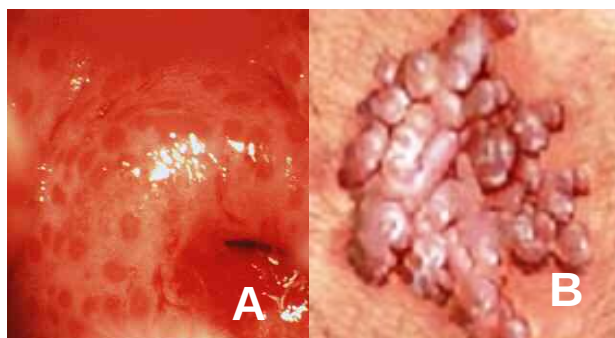


Figura 2. (A) Foto do colo do útero com inflamação (RAMOS, 2007). (B) Verrugas “cutâneas” acometendo a região genital (RAMOS, 2007).

Os primeiros tipos de HPV (Figura 3) isolados diretamente de biópsias de câncer cervical, foram do sorotipo 16 e 18, clonados em 1983 e 1984, respectivamente (ZUR HAUSEN, 2002).

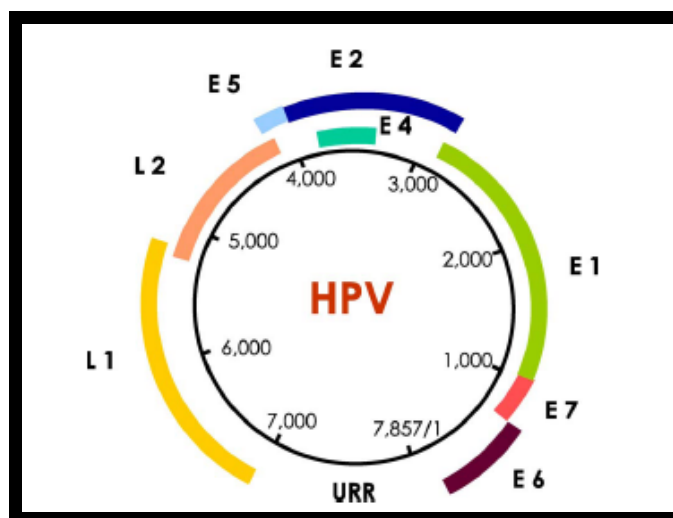


Figura 3. Representação esquemática do genoma HPV (MUNÕZ *et al.*, 2006)

Em novembro de 1991, durante um Workshop realizado pela “International Agency for Research on Cancer (IARC)” e “World Health Organization (WHO)” dados epidemiológicos e laboratoriais evidenciaram a associação entre o HPV e câncer cervical de forma evidente, que a infecção pelo vírus poderia ser considerada como principal causa para desenvolvimento do câncer cervical (MOTOYAMA *et al.*, 2004). Entretanto, apenas em 2001, no 19º Workshop Internacional sobre papilomavírus (Florianópolis - Brasil), após a avaliação dos dados epidemiológicos confirmou-se a hipótese formulada há mais de 20 anos por Gissmann e Zur Hausen, no qual a maior causa antecedente de câncer cervical e anogenital é o papilomavírus (FRAZER, 2002).

Os papilomavírus têm sido originalmente agregados em uma só família com os polyomavirus, o *Papovaviridae*. Esta classificação única baseava-se na similaridade, do não-envelopamento do capsídeo e o genoma de dupla-fita circular. Quando se reconheceu posteriormente que os dois grupos citados acima tinham tamanhos e organização genômica diferentes, eles foram oficialmente reconhecidos pelo “International Committee on the Taxonomy of viruses” (ICTV) como duas famílias distintas, *Papillomaviridae* e *Polyomaviridae* (DE VILLIERS *et al.*, 2004).

Através de dados da biologia, incluindo virologia, a designação por gêneros reúne espécie que são filogeneticamente co-relatas, mas que diferem nas características biológicas (Tabela 2) (DE VILLIERS *et al.*, 2004). Clinicamente, o gênero mais importante do papilomavírus é o “alpha-papillomaviruses” (BERNARD, 2005).

Tabela 2. Os gêneros de papilomavírus pertencentes à família Papillomaviridae mais estudados e suas propriedades biológicas e clínicas mais importantes (Bernard, 2005).

Gênero	Espécie	Tipos	Propriedades
Alpha-papillomaviruses	4	HPV-2, HPV-27, HPV-57	Verrugas epiteliais comuns
	5	HPV-26, HPV-51, HPV-69, HPV82	Lesões em mucosas de alto risco e baixo
	6	HPV-53, HPV-30, HPV-56, HPV-66	Lesões em mucosas de alto risco e benignas
	7	HPV-18, HPV-39, HPV-45, HPV-59, HPV-68, HPV-70	Lesões de alto risco, por exemplo o HPV-18 mais comum em adenocarcinomas do que carcinoma escamoso do cérvix
	8	HPV-7, HPV-40, HPV-43	Lesões cutâneas e mucosas de baixo-risco
	9	HPV-16, HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-52, HPV-58, HPV-67	Lesões em mucosas de alto risco, por exemplo o HPV-16 mais comum em carcinoma escamoso do cérvix do que adenocarcinomas
	10	HPV-6, HPV-11, HPV-13, HPV-44, HPV-74	Lesões de mucosas benignas. Podendo algumas lesões progredirem para lesões malignas
Beta-papillomaviruses	1	HPV-5, HPV-8	Lesões cutâneas malignas e benignas em pacientes imunossuprimidos
Gamma-papillomaviruses	1	HPV-4, HPV-65	Lesões cutâneas benignas
Delta-papillomaviruses	4	Papilomavírus bovino-1	Fibropapilomas em gados e cavalos. Um importante modelo de cultura de células
Kappa-papillomaviruses	1	Papilomavírus de coelho	Lesões cutâneas. Um importante modelo animal
Mu-papillomaviruses	1,2	HPV-1, HPV-63	Lesões cutâneas, freqüentemente ocorrem como verrugas nos pés
Nu-papillomaviruses	1	HPV-41	Lesões cutâneas
Xi-papillomaviruses	1	HPV-3, BPV-4	Papilomas no tubo digestivo. BPV-4 é um importante modelo para as fases da carcinogênese e para pesquisas com vacinação

A introdução do termo “espécie” é biologicamente proveitosa, sendo feita de acordo com as características e relação filogenética (Figura 4) de certos tipos virais, uma vez que cada espécie suporta diferentes tipos de papilomavírus, e possui

propriedades biológicas e patológicas comuns exigidas pelos padrões da ICTV. Por exemplo, todos os tipos de HPVs que formam uma espécie junto com o tipo HPV-2 provocam verrugas epiteliais, e todos os tipos que forma a espécie junto com o tipo HPV-16 são considerados de alto risco presentes em lesões de câncer cervical e precursoras (DE VILLIERS, 2004).

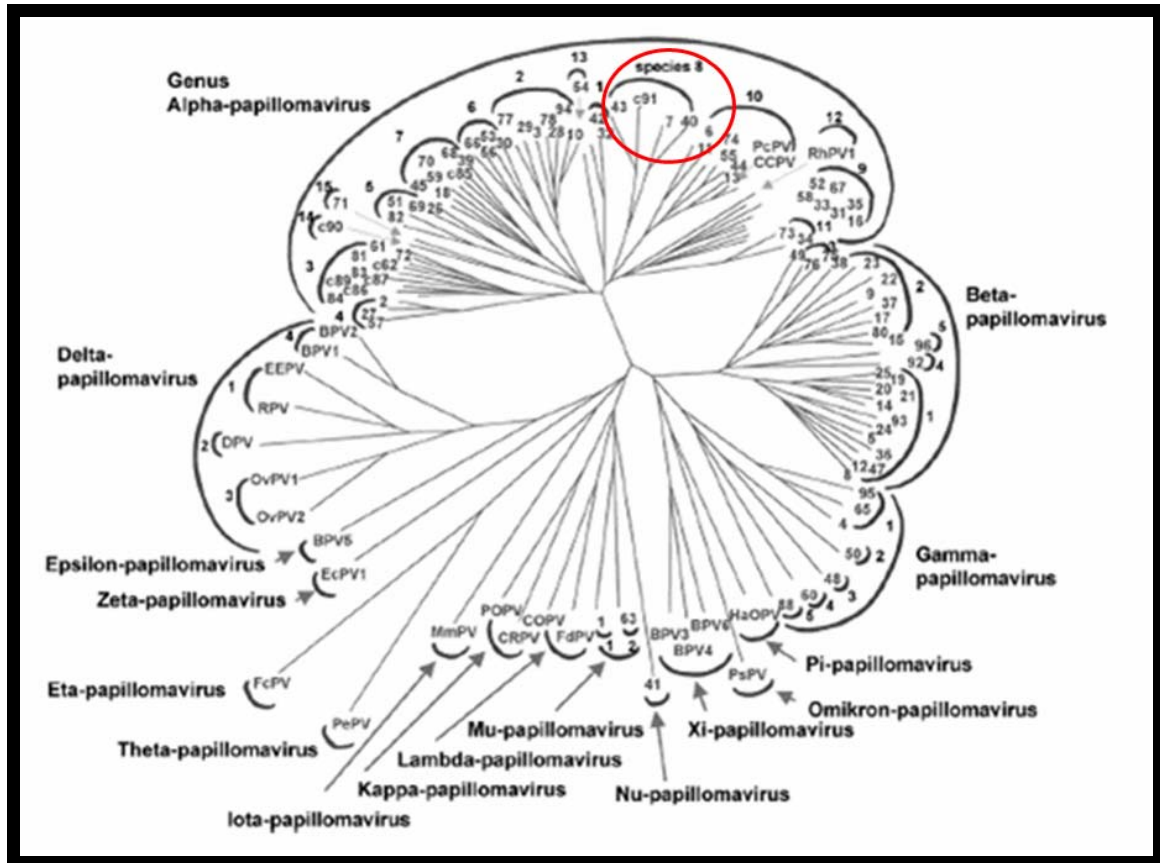


Figura 4. Árvore filogenética contendo a sequência de 118 tipos de papilomavírus. Gerada pelo programa “Treeview” da Universidade de “Glasgow”, com base no gene L1. O semicírculo externo representa o gênero, e o semicírculo interno refere-se à espécie do papilomavírus (DE VILLIERS *et al.*, 2004).

Um tipo de HPV é definido como um genoma completo, quando a sequência gênica da L1 é no mínimo divergente em 10% dos outros tipos de HPV. Esta definição foi introduzida de forma arbitrária, mas pesquisas subsequentes na área demonstraram que o critério de 10% descrevia uma taxa natural (DE VILLIERS *et al.*, 2004). O termo “subtipos” é referido para sequências de L1 que difere entre 2-10% de algum tipo conhecido. As variantes diferem cerca de 2% do isolado original, que neste contexto é referido como “protótipo” ou “referência genômica” (BERNARD, 2005). Estas definições foram inseridas na taxonomia e diagnóstico do papilomavírus depois da

“International Papillomavirus Workshop” em 1995, em Quebec (DE VILLIERS *et al.*, 2004).

Os papilomavírus são identificados pela abreviação PV precedidos de uma ou mais letras indicando a espécie do hospedeiro. Por exemplo, HPV para “human papillomaviruses”, BPV para “bovine papillomaviruses” ou o nome científico do hospedeiro, como exemplo, “MnPV” para *Mastomys natalensis*, que infecta um rato africano. Os tipos de HPVs são identificados por números de acordo com a sequência histórica de suas descrições, como exemplo HPV-1, HPV-2 e entre outros (BERNAND, 2005). Esta forma de identificação dos tipos de HPVs foi introduzida no final de 1970 (DE VILLIERS *et al.*, 2004).

Devido as características os HPVs têm sido agrupados em tipos: cutâneo e mucosas/genitais. Este último ainda pode ser classificado em tipos de alto, intermediário e baixo risco, de acordo com o seu potencial de indução de malignidade em células. Os de alto risco são assim considerados por serem encontrados em carcinomas e displasias, enquanto que o HPV de risco intermediário é mais comuns em lesões displásicas que em carcinomas. As verrugas benignas são provocadas por HPVs de baixo risco (MUNÕZ *et al.*, 2006) (Tabela 3).

Tabela 3. Classificação de HPVs segundo o seu potencial de induzir malignidade em células

HPV	Tipos	Referências
Baixo	6, 11, 40, 42, 44, 54, 61, 70, 72, 81 e 89	WRIGHT <i>et al.</i> , 2006
Intermediário	26, 53, 66, 68, 73 e 82	MUNÕZ <i>et al.</i> , 2003
Alto	16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 58 e 59	BOSCH, MUNÕZ, 2002

O HPV-16 e HPV-18 são os dois tipos mais comuns associados com adenocarcinomas ou carcinomas de células escamosas (ANDERSSON *et al.*, 2001), e por isso os tipos mais estudados e utilizados na produção de vacinas preventivas e terapêuticas.

2.4.1 O genoma viral

O HPV possui um genoma circular de fita dupla de DNA, sendo constituído de cerca de 8.000 pares de bases (pb). O seu genoma é organizado em três regiões: genes que codifica proteínas precoces (“Early”), genes que codifica proteínas tardias (“Late”)

e região reguladora (“Upper regulatory region - URR”) (MOTOYAMA *et al.*, 2004) (Tabela 4).

Tabela 4. Os genes codificados pelo HPV, com seus respectivos tamanhos e funções.

Genes	Tamanho (pb)	Funções
Fonte: NCBI		
E1 e E2	E1 (cerca de 1.940)	Codificar proteínas que são essenciais para replicação do DNA extracromossomal, complementação do ciclo viral e para modular a transcrição de L1 e L2
	E2 (cerca de 1.090)	A E2 também codifica duas proteínas específicas responsáveis pela inibição e indução da transcrição das regiões “early” (MOTOYAMA <i>et al.</i> , 2004)
E5	Cerca de 237	Estimular o crescimento celular (ZUR HAUSEN, 2002)
E6	Cerca de 500	Interagir e degradar p53 (ZUR HAUSEN, 2002; DOOBAR, 2005)
E7	Cerca de 300	Interagir e inativar a proteína do retinoblastoma (pRb) (DOOBAR, 2005; MOTOYAMA <i>et al.</i> , 2004)
L1 e L2	L1 (~ 1.500)	Formar o capsídeo maior e menor do vírus (MUNÕZ <i>et al.</i> , 2006)
	L2 (~ 1.400)	
“URR”	Cerca de 1000 (MUNÕZ <i>et al.</i> , 2006)	Elementos <i>cis</i> requeridos para expressão do gene, replicação do genoma, e empacotamento das partículas virais (MUNÕZ <i>et al.</i> , 2006)

2.4.2. Oncogenes e oncoproteínas

Os HPVs de alto risco infectam primariamente epitélio da mucosa anogenital e são as maiores causas de câncer cervical. Mulheres infectada com HPVs de alto-risco têm 100 vezes mais risco de desenvolver lesões cervicais quando comparadas com mulheres não-infectadas (VON KNEBEL DOEBERITZ, 2002).

Os oncogenes E5, E6 e E7 possuem capacidade de estimular a proliferação celular. A E5 apresenta aspectos importantes no curso inicial da infecção, pois estimula o crescimento celular através da formação de um complexo com o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR-1), com o receptor do fator de crescimento derivados

das plaquetas e com o receptor do fator estimulante de colônias-1. Além disto, também tem sido descrita sua capacidade de inibir a apoptose em células danificadas (ZUR HAUSEN, 2002).

Os mecanismos da E6 e E7 tiveram sua função esclarecida entre o final da década de 80 e início da década de 90 (MOTOYAMA *et al.*, 2004). Dessa forma devido as suas propriedades oncogênicas, E6 e E7 têm sido o maior foco das pesquisas em relação à infecção e carcinogênese em pacientes infectados pelo HPV. As proteínas E6 e E7 de HPVs de alto-risco podem, independentemente, immortalizar células humanas. Mas associadas resultam em aumento na atividade transformante, o que parece ser devido aos efeitos de complementaridade e sinergismo (ZUR HAUSEN, 2006).

A associação da oncoproteína E7 com membros da família das proteínas do retinoblastoma (pRb) já está bem caracterizado. A proteína pRb é um supressor do ciclo celular que normalmente previne a entrada da célula na fase S do ciclo celular, tendo associação com a família de fatores de transcrição E2F, ativadores da expressão de genes que estimula a síntese de DNA na célula. A proteína E7 tem capacidade de se ligar ao pRb e inativá-lo, liberando o E2F (DOOBAR, 2005; MOTOYAMA *et al.*, 2004). Além disso, E7 também estimula a fase S do ciclo celular por intermédio dos genes da ciclina A e ciclina E, e parece bloquear as funções dos inibidores de quinase dependentes de ciclinas WAF1 (também conhecidas como CIP1 e p21) e KIP1 (também chamada de p27). Por indução da amplificação centriolar, E7 pode induzir aneuploidia em células infectadas, contribuindo para o desenvolvimento de tumores (ZUR HAUSEN, 2002).

A indução para fase S de maneira não-programada e descontrolada normalmente leva à apoptose devido ativação da p53; entretanto outra oncoproteína viral chamada E6 interage e degrada a p53, levando à resistência a apoptose. A proteína E6 é responsável por um mecanismo complementar à E7, que resulta na imortalidade das células infectadas e leva a formação do tumor (ZUR HAUSEN, 2002; DOOBAR, 2005; MUNÕZ *et al.*, 2006). A E6 ainda é capaz de interagir com a proteína BAK (proteína pró-apoptose), levando também a resistência à apoptose e ao aumento da instabilidade cromossomal (MUNÕZ *et al.*, 2006; ZUR HAUSEN, 2002).

Todas estas alterações podem ocorrer em pacientes contaminados pelos HPVs sorotipos 16 e 18, considerados de alto risco e pertencentes a família *Papillomaviridae*, ao gênero Alpha-papillomaviruses (BERNAND, 2005).

A associação entre o HPV-16 e HPV-18 com neoplasias têm sido estabelecido através de dados epidemiológicos e estudos de biologia molecular. Os genes do HPV-16

e -18 que são expressos precocemente, incluindo E2, E4, E5, E6 e E7 que são primordiais na patogênese do câncer associado com HPV, desde a regulação de algumas funções como replicação e transcrição do DNA viral como também pela imortalização e transformação de células infectadas (RADHAKRISHNA PILLAI *et al.*, 2002).

Em estudos realizados com 47 pacientes com carcinoma, apresentou-se uma alta prevalência (58%) de infecção com HPV 16 provocando carcinoma em células escamosas, enquanto que apenas 23% foram diagnosticados com HPV 18. Aproximadamente metade dos casos de adenocarcinoma é atribuído para o HPV tipo 18 (ARENDS *et al.*, 1993; ALTEKRUSE *et al.*, 2003).

Duas teorias tentam explicar a prevalência dos tipos de HPV-18 e -16 entre tumores de células escamosas e glandulares, no qual (i) os dois tipos de HPVs podem preferencialmente infectar diferentes tipos de células cervicais; ou (ii) a infecção das células indiferenciadas da lâmina basal pelo HPV-18 pode induzir a uma diferenciação glandular, enquanto a infecção pelo HPV-16 pode induzir a uma diferenciação de células escamosas. Não há, até o momento presente experimentos diretos para comprovar essas hipóteses (ARENDS *et al.*, 1993).

Alguns autores relatam que a integração do HPV-16 ou HPV-18 ao genoma do hospedeiro aumenta a severidade das lesões cervicais, pois a proporção de lesões CIN III que contém HPV integrado aproxima-se da frequência de lesões que poderão progredir para um câncer cervical invasivo (VON KNEBEL DOEBERITZ, 2002; HILLEMANN, WANG, 2006).

Infecções persistentes com HPV de alto risco e integração do seu DNA no genoma de células hospedeira têm sido indicadas na etiologia das doenças malignas e pré-malignas do trato genital feminino (HILLEMANN, WANG, 2006).

2.4.3 Ciclo e integração viral

O ciclo de vida do papilomavírus difere das outras famílias de vírus uma vez que a infecção requer a habilidade das células epiteliais em proliferar (ZUR HAUSEN, 2002). O ciclo tem seu início quando partículas virais alcançam a membrana basal do epitélio, através de pequenas rupturas teciduais. O fato dos vírus infectar preferencialmente células da membrana basal sugere que para que ocorra a manutenção da infecção, o vírus tem que infectar células indiferenciadas. Para tanto o

papilomavírus, presente em tecidos perfeitamente adaptados à diferenciação das células epiteliais de pele ou mucosas, explora a maquinaria celular (ZUR HAUSEN, 2002).

O ciclo viral pode ser dividido em duas etapas: replicação viral e diferenciação celular. Na primeira etapa, ocorre uma replicação silenciosa do genoma nas células da membrana basal, e a expressão dos genes virais é suprimida, embora haja uma expressão limitada dos oncogenes virais resultando em aumento da proliferação de células infectadas e sua expansão lateral no tecido. É nesta fase em que o genoma viral é replicado até atingir cerca de 100 cópias e desta forma se mantém por tempo indeterminado no início da infecção das células. Na segunda etapa, as células basais são impulsionadas até ao compartimento suprabasal, onde elas perdem sua habilidade de divisão e em lugar disso iniciam o programa de diferenciação final (MUNÕZ *et al.*, 2006). Nas camadas mais externas do epitélio da epiderme ou mucosas, partículas virais são formadas e liberadas como consequência da renovação natural das camadas superficiais (ZUR HAUSEN, 2002; MUNÕZ *et al.*, 2006) (Figura 5). Desta forma, a infecção pelo HPV não é acompanhado por inflamação, e não há um sinal óbvio de “perigo” para alertar o sistema imune sobre a presença do vírus. Isto pode resultar em uma infecção persistente e crônica, e o hospedeiro pode ignorar o patógeno por longos períodos (STANLEY, 2005).

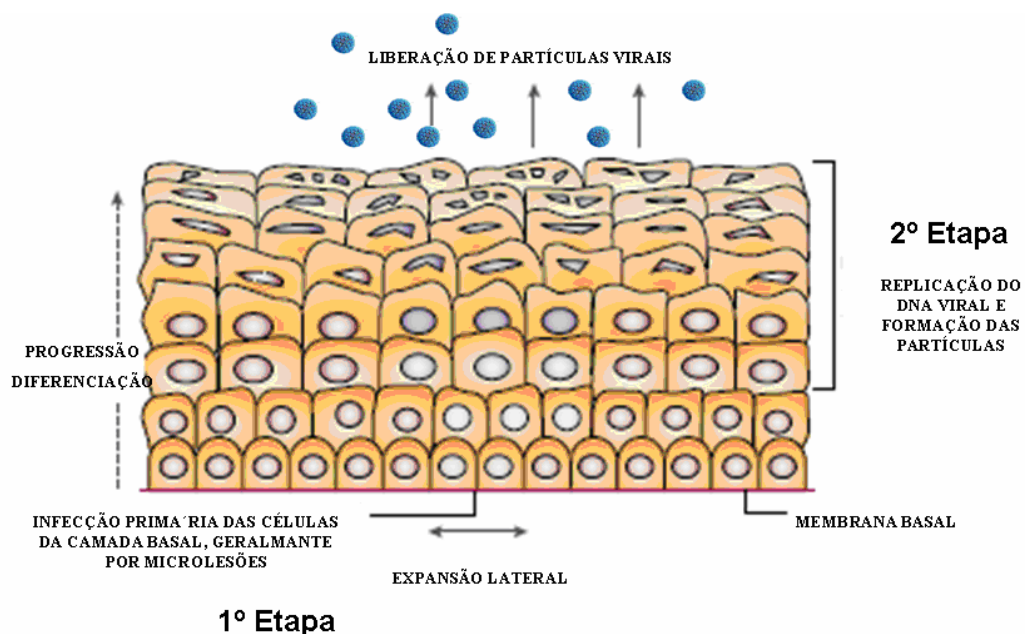


Figura 5. Representação mostrando o ciclo celular do HPV. A infecção das células da camada basal pelo HPV e a liberação das partículas virais que pode infectar tecidos adjacentes (ZUR HAUSEN, 2002).

Este processo ocorre com os diferentes tipos de HPV, principalmente em lesões benignas, no qual o vírus permanece geralmente extracromossomal ou epissomal. Entretanto, além do ciclo viral, os sorotipos de alto risco apresentam capacidade de se integrarem ao genoma do hospedeiro. Em tecidos de pacientes com lesões cancerosas pode ocorrer tanto o DNA viral epissomal como integrado ao DNA da célula hospedeira. Durante o processo de integração do DNA do HPV, ocorre uma quebra na região E1/E2/E4/E5 do genoma viral, o que leva à diminuição da expressão das mesmas. Desta forma, há um descontrole e aumento na expressão das oncoproteínas E6 e E7, devido à diminuição da expressão de E2, que codifica uma proteína que inibe a transcrição destas oncoproteínas, o que pode levar a formação de células malignas (MOTOYAMA *et al.*, 2004). Como a sequência gênica da E5 também é perdida no processo de integração do DNA epissomal com o cromossomo da célula hospedeira, concluiu-se que ela não está obrigatoriamente envolvida em eventos tardios da carcinogênese mediada por HPV. Parte do gene L2 é perdida na integração, mas a L1 permanece intacta após a integração (ZUR HAUSEN, 2002) (Figura 6).

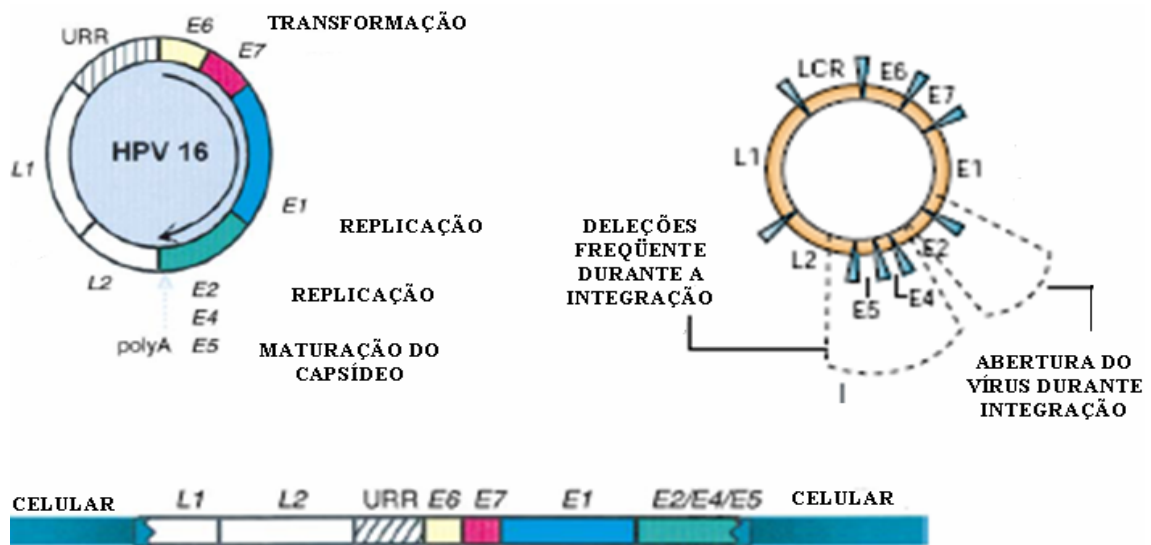


Figura 6. Representação esquemática da integração do DNA de HPV ao DNA da célula hospedeira, apresentando a sequência deletada nesta inserção (ZUR HAUSEN, 2002; VON KNEBEL DOEBERITZ, 2002).

2.5 Vacinas profiláticas e terapêuticas

Na maioria dos indivíduos, a infecção pelo HPV induz uma resposta local e mediada por células eficientes; que resulta na eliminação do vírus e uma proteção subsequente contra alguns tipos de HPV. O Evento de não regressão das verrugas genitais pode ser caracterizada pela falta de uma resposta imune celular adequada nos sítios da infecção (STANLEY *et al.*, 2006 & STANLEY, 2005). Uma vez que a regressão de lesões intraepiteliais de baixo risco e alto risco é obtida através de uma resposta imune humoral e celular contra os antígenos específicos do HPV (ZUR HAUSEN, 2002).

O aumento da incidência e progressão de infecção por HPV em indivíduos imunossuprimidos demonstra a importância de uma resposta imune celular na resolução e controle da infecção por HPV (STANLEY, 2005; FRAZER *et al.*, 2004).

Em alguns indivíduos, há uma resposta imune humoral com a produção de anticorpos contra epítomos da proteína maior do capsídio (L1), entretanto a produção natural ocorre de forma lenta e retardada (DILLNER, 1999). A partir de estudos soroepidemiológicos com o papilomavírus foi possível demonstrar que a infecção pelo vírus é capaz de induzir, naturalmente, baixos títulos de anticorpos específicos, e muitos destes são do tipo IgG, secretados por mucosas (FRAZER, 2002). Isto ocorre, devido a expressão das proteínas dos capsídios nas camadas mais superficiais do epitélio infectado por HPV, não sendo apresentados de forma eficiente ao sistema imune.

Considerando que o HPV tem sido identificado como agente etiológico chave para o desenvolvimento do câncer cervical, vacinas profiláticas e terapêuticas vêm sendo desenvolvidas. A imunização preventiva baseia-se nas proteínas estruturais L1 e L2 do HPV, enquanto que a vacinação terapêutica está fundamentada na resposta imune celular pelas proteínas não-estruturais (SMAHEL *et al.*, 2001).

A WHO estima que vacinas profiláticas efetivas e disponíveis contra HPV não deverão reduzir significativamente a incidência de câncer cervical no globo terrestre antes de 2050, pois mulheres já infectadas com o vírus de alto risco não serão beneficiadas com a vacina profilática. Vacinas terapêuticas contra infecções por HPV representarão uma redução de risco de câncer cervical em mulheres já infectadas (FRAZER *et al.*, 2004).

2.5.1 Vacinas profiláticas

Apesar da baixa titulação de anticorpos produzidos durante uma infecção natural, modelos animais indicaram que os mesmos conferem uma proteção contra infecções posteriores, podendo permanecer por toda vida (WRIGHT *et al.*, 2006). Assim, esta resposta secundária do sistema imune humoral ocorre de forma mais rápida, produzindo altos títulos de anticorpos com uma maior afinidade para o antígeno alvo (STANLEY, 2005).

Empresas e laboratórios de pesquisa acadêmica estão comprometidos com triagens pré-clínica e clínica para testes com vacinas profiláticas contra HPVs de alto risco utilizando uma abordagem baseada na “viral-like particles” (VLPs), partículas derivadas de proteínas estruturais L1, ou L1 e L2 (ZUR HAUSEN, 2002).

A vacina quadrivalente proposta pela MERCK, Co. (New Jersey, USA) contra o HPV protege contra lesões precursoras de câncer cervical e lesões externas causadas pelos tipos de HPV-6, -11, -16 e -18 e foi licenciada para uso nos Estados Unidos pela “Food and Drug Administration” (FDA) em junho de 2006. Uma vacina bivalente tendo como alvo o HPV-16 e -18 está em processo de licenciamento pelos órgãos competentes da Europa. Devido a enorme associação do HPV-16 e HPV-18 com o câncer no mundo inteiro e a limitação dos programas de “screening” baseados na citologia, a expectativa é que a vacinação contra o HPV seja rapidamente adotada em muitos países (WRIGHT *et al.*, 2006).

Ambas as vacinas profiláticas são geradas por tecnologia do DNA recombinante e são compostas por VLPs que são produtos de clonagem dos genes do capsídio maior (L1) dos diferentes tipos de HPV que compõem a vacina. A vacina bivalente é produzida utilizando cultura de células, enquanto que a vacina quadrivalente por leveduras. Estudos apresentaram que as duas vacinas são altamente imunogênicas. Entretanto, a duração da sua proteção ainda é desconhecida, apesar de que, considerando a titulação de anticorpos gerada, a proteção poderia permanecer por mais de 42 meses após da vacinação (WRIGHT *et al.*, 2006).

2.5.2 Vacinas terapêuticas

Conceitos similares desenvolvidos na imunoprevenção para o HPV têm sido também aplicados para imunoterapia. Vacinas quiméricas têm sido construídas com epítomos antigênicos da oncoproteína E7 juntamente com a proteína L1, com a finalidade de gerar VLPs. Tais sistemas tem apresentado um efeito preventivo e terapêutico, com uma resposta imune contra oncoproteínas E7 em modelos animais (ZUR HAUSEN, 2002).

Algumas evidências sugerem que uma resposta imune celular para E2 e E6 pode ser um bom prognóstico para o câncer cervical associado com o HPV. Infecções imunossupressoras como HIV ou paciente pós-transplante são considerados fatores de risco para que uma infecção por HPV torne-se uma lesão pré-maligna ou maligna. Assim, uma imunoterapia para as proteínas codificadas pelo HPV é a chave para um tratamento eficaz em infecções por HPV (FRAZER, 2002).

As proteínas não-estruturais têm apresentado uma alta imunogenecidade, e em alguns casos sua utilização tem levado a uma parcial regressão dos tumores existentes através da redução de células T específicas. Conseqüentemente, as oncoproteínas E6 e E7 do HPV 16 e 18 têm sido alvos em potenciais para o desenvolvimento de vacinas terapêuticas (ZUR HAUSEN, 2002; DAVIDSON *et al.*, 2004; DUGGAN-KEEN *et al.*, 1998).

Duas vacinas semelhantes, TA-HPV e TA-CIN, estão em desenvolvimento pela “Xenova Research”. A TA-CIN é uma fusão protéica das proteínas virais L2/E6/E7, tem mostrado uma resposta de células T em estudos pré-clínicos em modelos animais (DAVIDSON *et al.*, 2004; VAN DER BUNG *et al.*, 2001). Por outro lado, a TA-HPV, uma vacina recombinante de vírus codificando oncoproteínas E6 e E7 do HPV-16 e -18 modificadas, apresentou-se segura e imunogênica em pacientes com câncer cervical avançado, câncer cervical em estágio inicial e neoplasia intraepitelial cervical de alto grau.

Devido à dificuldade existente no cultivo de células virais em laboratório, adventos de clonagem e produção destas oncoproteínas constituem um passo fundamental para o desenvolvimento de medicamentos sítios específicos e até mesmas vacinas, preventivas ou terapêuticas.

2.6 Sistemas de expressão

A *Escherichia coli* representa um dos mais poderosos sistemas de expressão heteróloga, pois seu genoma já foi totalmente mapeado, além de fácil manipulação, crescimento rápido, baixo custo, e eficiência na secreção das proteínas, o que facilita a sua posterior recuperação. Entretanto, pelo fato da *E. coli* ser um organismo procarionte, faltam organelas intracelulares, tais como retículo endoplasmático e complexo de Golgi que estão presentes nos organismos eucariontes, e são responsáveis pelas modificações das proteínas que estão sendo produzidas. Por isso, várias proteínas eucariontes de interesse comercial não puderam ser expressas eficientemente nesse organismo (CINO, 1999).

A *Saccharomyces cerevisiae* após o advento da tecnologia do DNA recombinante, foi geneticamente transformada no final dos anos 70 e assim começou sua larga utilização para obtenção de proteínas heterólogas. Dessa forma, com a introdução da levedura *S. cerevisiae*, muitos dos problemas que havia com *E. coli* foram resolvidos, entre eles podemos citar: ausência de modificações pós-traducionais, conformação incorreta e baixos níveis de expressão. Porém, um problema detectado na produção por *S. cerevisiae* era a hiperglicosilação das proteínas secretadas. Conseqüentemente, outras leveduras têm sido apresentadas como sistemas alternativos de expressão por apresentarem vantagens sobre *S. cerevisiae*. Entre esses novos sistemas pode-se destacar *Pichia pastoris* que é facilmente manipulada, apresenta altos níveis de expressão de proteína intracelular e extracelular, além de realizar modificações pós-transducionais como: glicosilação, formação de pontes de dissulfeto e processamento proteolítico (CEREGHINO *et al.*, 2002).

2.6.1 *Pichia pastoris* versus proteínas recombinantes

Há 30 anos atrás, Koichi Ogata descreveu a habilidade de certas espécies de levedura utilizar o metanol como única fonte de carbono e energia (OGATA *et al.*, 1969). No ano de 1970, aproximadamente, a empresa “Phillips Petroleum Company” desenvolveu um protocolo para crescimento de *P. pastoris* com metanol em cultura contínua, propondo o uso dessa levedura como fonte de alimento animal, por ser capaz

de crescer em altas densidades. Entretanto, foi constatado que utilizando um substrato barato o processo de produção era inviável economicamente, depois da crise do óleo devido ao aumento significativo do metanol. A empresa contratou a “Salk Institute Biotechnology/Industrial Associates, Inc.” (SIBIA, La Jolla, CA) para transformar a *P. pastoris* em um sistema de produção de proteínas recombinantes. Pesquisas coordenadas pela SIBIA isolaram o gene e o promotor do álcool oxidase, gerando vetores, linhagens, e posteriormente um protocolo para manipulação genética da *P. pastoris*. Após 1993, a empresa “Phillips Petroleum Company” concedeu a licença para “Invitrogen Corporation” (Carlsbad, CA) para vender componentes do sistema (CEREGHINO AND CREGG, 2000).

A *P. pastoris* é ideal para expressão de proteínas heterólogas por três razões: facilidade de manipulação genética, expressão da proteína de interesse em altos níveis e capacidade de realizar modificações pós-traducionais na proteína. Por estes motivos a *P. pastoris* tem sido utilizada na clonagem/expressão de proteínas de interesse clínico como: insulina humana, albumina humana do soro, antígenos para vacina contra málaia e colágeno humano tipo I (CEREGHINO *et al.*, 2002).

3 JUSTIFICATIVA

O câncer cervical é o segundo tipo mais comum entre as mulheres no globo terrestre, sendo o mais comum o câncer de mama. A associação de tipos de HPVs de alto risco com lesão neoplásica cervical está bem descrita e pode ocorrer independente de outros fatores de risco, mas felizmente uma pequena fração de mulheres infectadas com HPV eventualmente desenvolverá câncer. Entretanto, este pequeno número, segundo dados da Organização Mundial de Saúde, a partir de 2020 pode chegar à cerca de 15 milhões de novos casos de câncer ao ano no mundo. Mantidas as condições socioculturais atuais, cerca de 70% desses tumores ocorrerão em países dos quais apenas 5% possuem recursos para controle da doença. Aplicando-se o conhecimento científico aliado à tecnologia atual, poder-se-ia reduzir cerca de um quarto a incidência de todos os cânceres e curar a terça parte deles. Com essas medidas, reduzir-se-ia a incidência da doença à metade nos próximos 25 anos segundo a WHO (1998).

A resposta imune constitui um ponto importante na eliminação do vírus, visto que pacientes imunocomprometidos são mais susceptíveis a infecção por HPV (DAEMEN *et al.*, 2003). Dessa forma a expressão gênica da oncoproteína E6 em *Pichia pastoris* e posterior análise estrutural e imunogênica da proteína pode ajudar a elucidar o mecanismo de atuação da HPV 16 na célula, além de permitir o desenvolvimento de vacinas terapêuticas ou medicamentos sítio-específico capazes de erradicar a doença.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Clonagem do oncogene E6 do Papilomavírus humano sorotipo 16 em sistema de expressão de proteínas heterólogas em linhagens da levedura *Pichia pastoris*.

4.2 Objetivos específicos

- 4.2.1- Otimização das condições de amplificação do gene E6 de HPV-16.
- 4.2.2- Purificação dos amplicons de E6.
- 4.2.3- Tratamento dos amplicons de E6 com enzimas de restrição adequadas;
- 4.2.4- Clonagem dos genes E6 no plasmídio pPICZA;
- 4.2.5-Obtenção de células (*E. coli*) transformantes e extração do plasmídio para seqüenciamento;
- 4.2.6- Linearização do vetor para promover a integração no genoma do hospedeiro;
- 4.2.7- Obtenção de células (*P. pastoris*) transformantes;
- 4.2.8- Seleção de recombinantes de *P. pastoris* expressando o gene E6 do HPV sorotipo 16.

Artigo a ser enviado para o periódico Virus Gene (IF: 1,4)

HPV-16 E6 cloning and expression in *Pichia pastoris* recombinant strain

Elaine Virginia Martins Souza.¹ · Giovani Rota Bertani^{1,2} · Danyelly Bruneska^{1,*} · José Luiz de Lima Filho^{1,2}

¹ Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE, Brasil.

² Departamento de Bioquímica – Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE, Brasil.

* Universidade Federal de Pernambuco - Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) - Setor de Biologia Molecular. Cidade Universitária. Recife - PE, Brasil. CEP: 50670-901. Phone/Fax: + 55 (81) 2126 8484 / + 55 (81) 2126 8485.
bruneska@gmail.com

Key words: papillomavirus, HPV-16, E6 protein, *Pichia pastoris*, oncogene, recombinant protein.

ABSTRACT

Cervical cancer is the third disease more common in women and is mainly caused by human papillomavirus (HPV). HPV-16 is a high-risk type that is responsible for 58% of all cervical cancer cases. Three oncogenes are involved in virus development and maintenance inside human cell. E6 is one of the oncogenes that is transcribed in a early stage with the purpose of deregulating the cell cycle by p53 inactivation. The cell cycle deregulation leads to an alteration in cell morphology and physiology, and may cause cancer. In this work, we cloned HPV-16 E6 gene into *Pichia pastoris* expression system in order to obtain large amount of soluble protein, and avoid inclusion bodies from *Escherichia coli* system and hyperglycosylated protein obtained from *Saccharomyces cerevisiae* system.

INTRODUCTION

Invasive cervical cancer is the second most common cancer in women worldwide [1]. Around 10,9 millions of new cancer cases are registered each year and cervical cancer contributes with 493 thousand [2]. Epidemiology studies showed that cervical cancer still remained as major death reason for malignant tumor patients among women [3]. In 1974, some researches began to postulate the relation between HPV and cervical cancer [4]. In 2001, it was assumed that HPV is a risk factor for cervical cancer, that together with other co-factors (long-term use of hormonal contraceptives, high parity, tobacco smoking, immunosuppression, co-infection with HIV, *Chlamydia trachomatis* (CT) and herpes simplex virus type-2 (HSV-2)) can induce the progression from cervical lesions to cervical cancer [5]. The most important HPV types are classified as high-risk or carcinogenic types due to the ability to develop cervical cancer [6, 7]. HPV-16 is responsible for 58% of the prevalence of cervical cancer, while HPV-18 is associated to approximately one half of squamous cell carcinoma. Only 12% of cervical cancer is related to HPV-18 [3, 8]. Structurally, HPV genome consist of 8000 bp composed by early genes (E1 to E7) and late gene (L1 and L2) besides the upper regulatory region (URR) [3, 9]. E5, E6 and E7 are oncogenes involved in the development of cervical cancer. Nevertheless, researches are focused in E6 and E7 proteins due to their ability to immortalize human cell in tissue culture. The synergic effects of these proteins are well known [10]. E6 is capable to inactivate p53, a protein involved in cell cycle control [11]. Once E6p binds to p53, a degradation pathway via the ubiquitin starts, allowing that infected cells remain growing, instead of inducing apoptosis [5, 12].

Papillomaviruses are not able to be propagated in tissue culture and attenuated virus can not be used as vaccine approach due to its oncogenic potential. E6 protein also can not be isolated from natural lesions because of the trace amounts present [13]. Prokaryotic system expression was not successful in protein production without inclusion bodies formation [13], then eukaryotic system are preferred.

Pichia pastoris represents a new system for heterologous protein expression with some advantages like existence of a strong and tightly regulated promoter from the alcohol oxidase 1 (*PAOX1*), gene expression induced by methanol, correct protein delivery system without occurrence of protein hyperglycosylation [14-17]. In order to carry out crystallographic and immunological studies, we cloned E6 gene from high risk HPV-16 into *P. pastoris* genome, obtaining a recombinant strain able to express this oncoprotein in intracellular pathway.

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms

Escherichia coli DH5 α was used as host as well as *Pichia pastoris* GS115 (*his4*) strain, purchased by Invitrogen (San Diego, CA). pPICZA (Invitrogen - San Diego, CA) was used to compose the expression system. Bacterial growth was performed in LB broth (10g/l tryptone, 5g/l yeast extract, 10 g/l NaCl) and low-salt LB broth (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl). *P. pastoris* strain was cultivated in YPD media (1% yeast extract, 2% peptone and 2% dextrose). Recombinant *P. pastoris* were grown in MMH media (1.34% YNB, 4x10⁻⁵% Biotin, 4x10⁻³% Histidine, 0.5% Methanol).

E6 gene cloning procedures

E6 amplification was performed using a pET28a.E6*Nhe* as template (kindly provided by Dr^a. Andrea Balan, USP – SP, Brasil). The PCR reaction was made using 20 ng DNA; 1.5 μ l specific primers (10 pmol) FE6KpnZA (5'-CTGGGGTACCATGCACCAA-3') and RE6ApaZA (5'-TTGTTTCGGGCCCCAGCTGGGT-3'); 2.5 μ l Buffer Taq Platinum 10X; 0.5 μ l Platinum Taq Pol (5 U/ μ l); 0.5 μ l MgCl₂ (50 mM), 0.5 μ l dNTP (40 μ M). Amplifications were performed in Rotor Gene 6.0 (Applied Biosystems, USA) with the following settings: 95°C for 1 min, followed by 40 cycles at 95°C for 30 s, 68°C for 20s (touchdown each 5 cycles) and 72°C for 1 min, and ending with 72°C for 1 min. The amplified products were observed in 1% agarose gel and quantified using Low DNA Mass Ladder. PCR product was purified with QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) and subsequently cloned into pPICZA, using T₄ DNA ligase, following the manufactory instructions. All reagents were purchased by Invitrogen (San Diego, CA). The vector was transformed in *E. coli* DH-5 α competent cells by heat shock and incubated over night in low-salt LB media containing 25 μ g/mL zeocin, under orbital shaker at 37°C. Recombinant colonies were selected by zeocin-resistance. The plasmids were extracted for alkaline lysis according to Sambrook *et al.* (1989) (18). *KpnI* and *ApaI* were used to check E6 gene liberation from pPICZA.E6 to follow cloning steps.

P. pastoris integration assay

Midi-prep plasmid protocol was used to obtain high amount of pPICZA.E6. The plasmid was digested with *SacI*, restriction enzyme that has unique restriction site in pPICZA, allowing vector linearization for efficient integration into *P. pastoris* strain. The recombinants plasmids extracted and linearized were checked on 1% agarose gel, stained with ethidium bromide. Digested plasmid was purified to remove enzymes and enzymatic buffer using MinElute Reaction Cleanup Kit (QIAGEN, USA). LiCl transformation method was used to transform *P. pastoris* cells with shuttle vector pPICZA. Recombinant colonies were selected on YPD plates containing Zeocin (100µg/ml) after 2-3 days incubation at 30°C. To confirm the integration, a colony PCR was performed in Gradient Eppendorf Mastercycler (USA) using a single colony resuspend in water, and treated with lyticase enzyme [19]. AOX1 primers were used in the PCR reaction, programmed for 40 amplification cycles running with 94°C denaturation step for 1 min, 55°C annealing step for 1 min and 72°C extension step for 1 min, including an initial denaturation step of 2 min and final extension step of 7 min. The amplicons molecular weights were analyzed by electrophoresis through 1% agarose gel stained with ethidium bromide.

DNA sequencing

Determination of E6 gene sequence was achieved using a fluorescent-based dideoxy sequencing method using DYEnamic™ ET Dye Terminators in automated DNA sequencing system (MegaBACE 750, GE, Life Science – USA) using specific primers FAOX1 (5'-GACTGGTTCAATTGACAAGC-3') and RAOX1 (5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'). The sequences of the PCR-amplified products were analyzed with basecalling raw data in Sequence Analyzer and submitted to BLASTN (NCBI) to compare the similarity of E6 gene cloned and NCBI databank.

RESULTS

E6 cloning into pPICZA shuttle vector

The template pET28a.E6*Nhe* was used to clone the E6 gene to pPICZA plasmid. Once treated with specific restriction enzymes the amplicon was purified and cloned into pPICZA treated with the same enzymes, with *KpnI* and *ApaI*. The recombinant

plasmid obtained was unable to liberate the target sequence under restriction enzyme treatment. Alternatively, the PCR product was cloned into pPICZA after treatment of both sequences with *KpnI* and *ApaI*. The plasmid extraction was analyzed by electrophoresis as shown in Figure 1.

Selected plasmids were used as template to obtain E6 gene amplification with the aim to confirm the target gene presence (Figure 2A). Restriction enzyme digestion was also used as gene presence confirmation, generating 3782 bp fragment corresponding to pPICZA (3305bp) plus E6 gene (477bp) (Figure 2B). *KpnI* was able to cut the sequence in unique restriction site, but we were not able to cut the plasmid with *ApaI*, despite the presence of this restriction site in the plasmid sequence.

The nucleotide sequencing was performed to confirm the E6 gene sequence in positive plasmids. Alignment of raw data (636 nucleotides sequenced) was performed at NCBI, using Basic Local Alignment Search Tool (BLASTN) to verify the identity. Online software revealed 93% nucleotide identity between the inserted sequence, obtained in Sequence Analyzer Software (GE, Health Care, USA), and HPV-16 E6 sequences in databank. The sequence showed 93% score, E-value 3e-157 of identify between the cloned sequence and NCBI databank. Then, the plasmid obtained can be present as in Figure 3.

E6 integration into *P. pastoris* genome

The recombinant plasmids were digested with *SacI* to proceed with *P. pastoris* GS115 transformation. A high frequency transformation was obtained in YPD plates containing zeocin. To be sure about the integration of the target gene, direct PCR screening of *P. pastoris* clone was performed. The results are presented in Figure 4.

DISCUSSION

E6 cloning in *P. pastoris*

E6 is an oncoproteins from HPV, which transforms human cells by binding p53 protein, cannot be cultivated in laboratory or isolated from natural lesions [13]. In order to obtain an yeast expression system, the *E6* gene was amplified and cloned into a shuttle vector able to integrate to *P. pastoris* genome.

E6 cloning into *P. pastoris* expression system started with PCR of target gene. Touchdown technology was used to obtain specific amplifications. The product was treated with specific restriction enzymes included as adaptors in the forward and reverse primers in order to allow the insertion of E6 sequence in the same reading frame as myc epitope and polyhistidine tag sequences from the pPICZA shuttle vector. An extra sequence was also added to the primer sequence to allow easy direct cloning. After insertion and transformation, the selected colonies grown in zeocin-containing L medium were used to obtain high amount of pPICZAE6.16 (Figure1). The amplification of the target sequence was obtained using specific primers (FE6*Kpn*IZA and RE6*Apa*IZA) under the same conditions, resulting in strong specific amplification (Figure 2A). Additionally, restriction enzyme treatment should liberate E6 gene from pPICZAE6.16. However, only *Kpn*I was able to cut the sequence and result in linear plasmid at the correct size (3781 bp). Probably, *Apa*I restriction site was methylated by the *E. coli* DH-5 α used as host, avoiding the gene liberation. This effect occurs as a modification in the restriction endonucleases specific-sites in DNA of prokaryotes, eukaryotes and viruses. The modification at 5-methylcytosine (^{5m}C) generates a sequence GGG^{m5}CCC that inhibits DNA cleavage in prokaryotes, eukaryotes and viruses [20].

Once pPICZAE6.16 was constructed (Figure 3), an integration was performed to obtain *P. pastoris* GS115 recombinant, generating a Mut⁺ phenotype. This strain has been used to express gene with medical importance like Hepatite B Surface Antigen [21], cistatin [22] and insulin-like growth factor [23].

These results enables the study of expression of E6 protein produced by *P. pastoris*, which is a methylotrophic yeast that can express recombinant protein with more efficiency than other expression systems. The expression of the E7 gene from HPV-16 using *E. coli* demonstrated a stable protein at 4°C for 5 weeks [13], but expression in *P. pastoris* increased the stability time of the protein due the decrease of the toxic levels by its respiratory metabolism. *Schizosaccharomyces pombe* was used as expression system, but showed low yields with maximum of 0.8mg from 5x10¹⁰ cells [24]. HPV-6 E7 gene was cloned into *Saccharomyces cerevisiae* GAL7 expression vector and obtained a yield of 2 μ g/ml of culture after purification steps [25].

Screening of recombinant *P. pastoris* GS115E6.16 colonies is being performed in Erlenmeyer flasks. Additional colonies were stored in deep freezer until fermentative experiments can be done. Further studies could optimize E6 protein by *P. pastoris* to be used in crystallographic and immunological experiments.

Acknowledgment

The authors thank Andrea Balan from “Universidade de São Paulo”, for supplying the template of pET28a.E6*Nhe* containing HPV-16 E6 gene.

REFERENCES

1. Brink A.A., Zielinski G.D., Steenbergen R.D., Snijders P.J., and Meijer C.J., *Cytopathology* 16, 7-12, 2005.
2. Jemal A., Siegel R., Ward E., Murray T., Xu J., Smigal C., and Thun M.J., *CA Cancer J Clin* 56, 106-130, 2006.
3. Chang C.H., Chen T.H., Hsu R.C., Chou P.H., Yang J.J., and Hwang G.Y., *J Clin Virol* 32, 33-37, 2005.
4. Zur Hausen H., Meinhof W., Scheiber W., Bornkamm G.W., *Int J Cancer* 13, 650-6, 1974.
5. Munoz N., Castellsague X., de Gonzalez A.B., and Gissmann L., *Vaccine* 24S3, S1-S10, 2006.
6. Munoz N., Bosch F.X., de Sanjose S., Herrero R., Castellsague X., Shah K.V., Snijders P.J., and Meijer C.J., *N Engl J Med* 348, 518-527, 2003.
7. Wright T.C., Bosch F.X., Franco E.L., Cuzick J., Schiller J.T., Garnett G.P., and Meheus A., *Vaccine* 24 Suppl 3, S251-261, 2006.
8. Altekruze S.F., Lacey J.V., Jr., Brinton L.A., Gravitt P.E., Silverberg S.G., Barnes W.A., Jr., Greenberg M.D., Hadjimichael O.C., McGowan L., Mortel R., Schwartz P.E., and Hildesheim A., *Am J Obstet Gynecol* 188, 657-663, 2003.
9. Motoyama S., Ladines-Llave C. A., Villanueva S. L., Maruo T., *Kobe J Med Sci*, 50, 1-2, 9-19, 2004.

10. zur Hausen H., Nat Rev Cancer 2, 342-350, 2002.
11. Wang W.M., Chung M.H., and Huang S.M., Biochem Biophys Res Commun 303, 932-939, 2003
12. Thomas M., Pim D., and Banks L., Oncogene 18, 7690-7700, 1999.
13. Fernando G.J., Murray B., Zhou J., and Frazer I.H., Clin Exp Immunol 115, 397-403, 1999.
14. Jahic M., Veide A., Charoenrat T., Teeri T., and Enfors S.O., Biotechnol Prog 22, 1465-1473, 2006
15. Bisht H., Chugh D.A., Swaminathan S., and Khanna N., Protein Expr Purif 23, 84-96, 2001.
16. Cereghino G.P., Cereghino J.L., Ilgen C., and Cregg J.M., Curr Opin Biotechnol 13, 329-332, 2002.
17. Zhang W., Li Z.J., and Agblevor F.A., Process Biochem 40, 2073-2078, 2005.
18. Sambrook J., Fritsch E. F. & Maniatis T. 1989. In: Molecular Cloning - A Laboratory Manual. Transfer of DNA from agarose gels to solid supports. 2: 9.34-9.35.
19. Linder S., Schliwa M., and Kube-Granderath E., Biotechniques 20, 980-982, 1996.
20. McClelland M., Nelson M., and Raschke E., Nucleic Acids Res 22, 3640-3659, 1994.
21. Bardiya N., Anaerobe 12, 194-203, 2006.

22. Bai J., Ma D., Lao H., Jian Q., Ye X., Luo J., Xong X., Li Y., and Liang X., J Biotechnol 125, 231-241, 2006.
23. Chen Z., Chen H., Wang X., Ma X. and Huang B., Protein Expr Purif 52, 239-248, 2007.
24. Braspenning J., Manetti R., Zumbach K., Meschede W., Gissmann L., and Tommasino M., Protein Expr Purif 10, 192-201, 1997.
25. Romanos M.A., Hughes F.J., Comerford S.A., and Scorer C.A., Gene 152, 137-138, 1995.

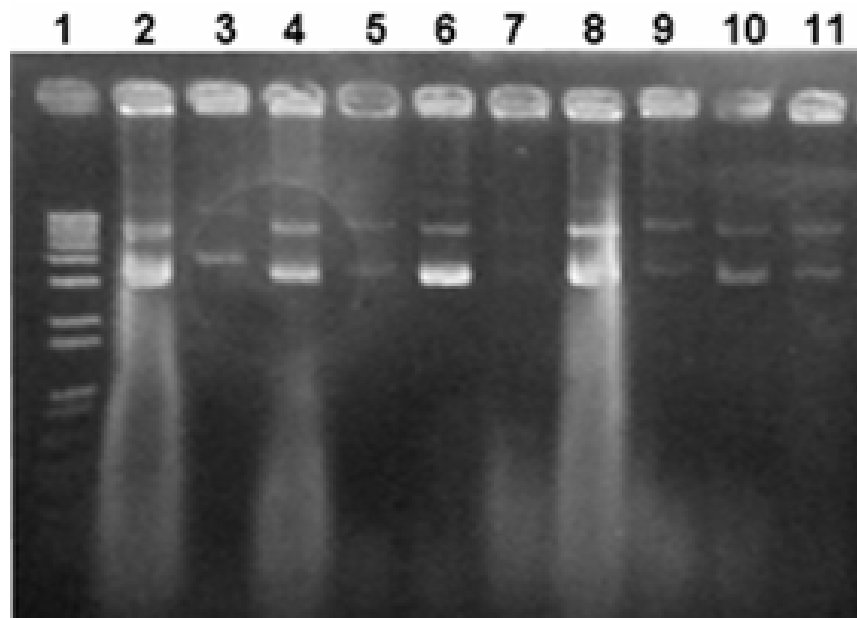


Figure 1. Agarose of red-faced with ethidium bromide showing pPICZA E6.16 clones (1 μ l). Lines: (1) Ladder 1Kb Plus, (2-11) Plasmids extracted.

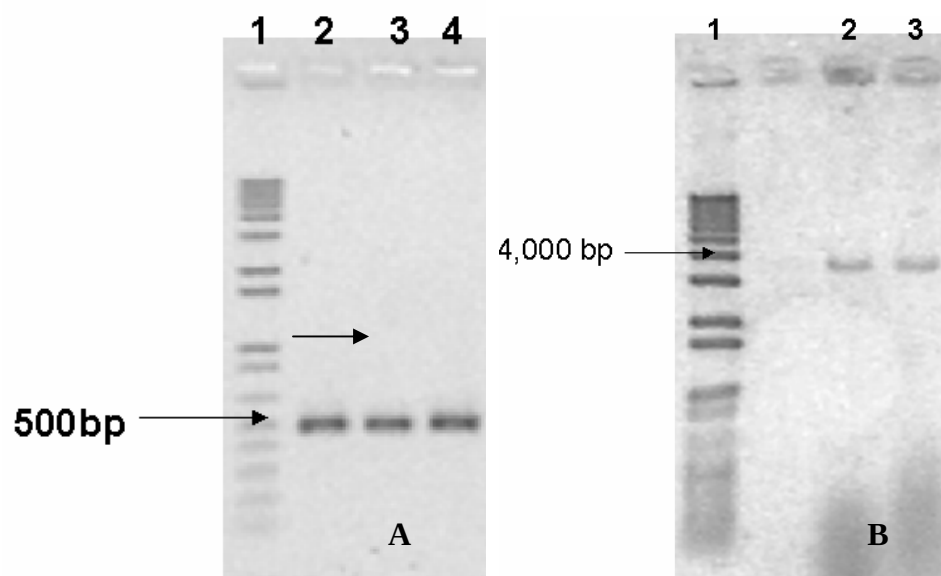


Figure 2. (A) E6 gene (477 bp) amplification, using pPICZA.E6.16 as template and FE6*Kpn*IZA and RE6*Apa*IZA as specific primers, observed in 1% agarose gel. Lines: (1) Ladder 1Kb Plus, (2-4) 3 μ l E6 gene. (B) Enzymatic digestion of pPICZAE6.16 using *Kpn*I to confirms gene presence. Lines: (1) Ladder 1Kb Plus (Invitrogen); (2-3) pPICZA E6.16 treated with *Kpn*I.

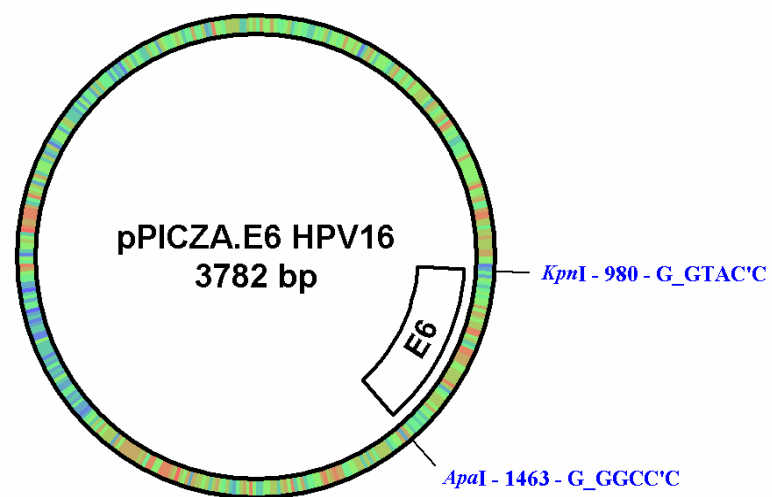


Figure 3. Schematic illustration of recombinant plasmid obtained by the insertion of HPV-16 E6 into pPICZA shuttle vector.

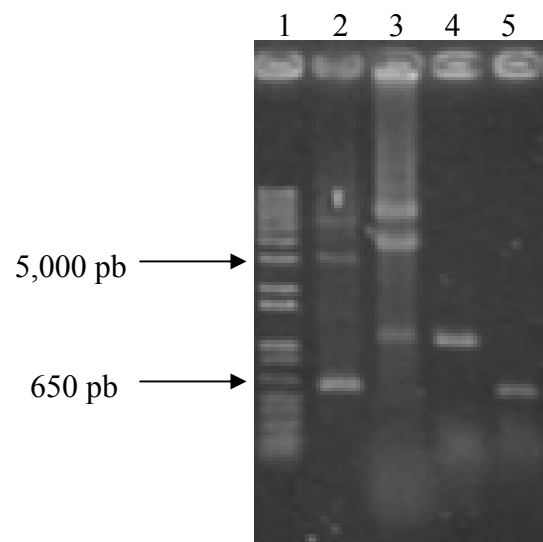


Figure 4. 1% agarose gel showing the direct PCR screening of GS115 *Pichia pastoris* clones containing HPV-16 E6 gene. Lines: (1) Ladder 1Kb Plus, (2) pPICZAØ, (3) pPICZAE6.16, (4) *Pichia pastoris* GS115E6.16, (5) *Pichia pastoris* GS115.

5 CONCLUSÃO

O advento da biologia molecular tem tornado possível estudos mais avançados acerca da estrutura de diferentes proteínas e da capacidade que as mesmas têm de induzir uma reação imunológica. Nós realizamos a clonagem do gene E6 do HPV-16 por recombinação ao genoma da *P. pastoris*, confirmado por seqüenciamento dos genes. Futuramente, a otimização da expressão desta oncoproteína permitirá a obtenção de quantidade suficiente de proteína para analisar sua estrutura, através de experimentos de cristalografia e realizar experimentos imunológicos, visando o desenvolvimento de vacinas terapêuticas ou medicamentos sítio-específicos capazes de erradicar uma doença que acomete mais de 19.000 mulheres no nosso país.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

The 1988 Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytological diagnoses. National Cancer Institute Workshop. Jama, v.262, n.7, Aug 18, p.931-4. 1989.

Altekruse, S. F., Lacey, J. V., Jr., *et al.* Comparison of human papillomavirus genotypes, sexual, and reproductive risk factors of cervical adenocarcinoma and squamous cell carcinoma: Northeastern United States. Am J Obstet Gynecol, v.188, n.3, Mar, p.657-63. 2003.

Andersson, S., Rylander, E., *et al.* The role of human papillomavirus in cervical adenocarcinoma carcinogenesis. Eur J Cancer, v.37, n.2, Jan, p.246-50. 2001.

Arends, M. J., Donaldson, Y. K., *et al.* Human papillomavirus type 18 associates with more advanced cervical neoplasia than human papillomavirus type 16. Hum Pathol, v.24, n.4, Apr, p.432-7. 1993.

Bagarelli, L. B. e Olían, A. H. Tipagem e Estado Físico de Papilomavírus Humano por Hibridização in situ em Lesões Intra-epiteliais do Colo Uterino. Rev Bras Ginecol Obstet, v.26, n.1, p.59-64. 2004.

Bernard, H. U. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. J Clin Virol, v.32 Suppl 1, Mar, p.S1-6. 2005.

Bosch, F. X., Manos, M. M., *et al.* Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. J Natl Cancer Inst, v.87, n.11, Jun 7, p.796-802. 1995.

Bosch, F. X. e Munoz, N. The viral etiology of cervical cancer. Virus Res, v.89, n.2, Nov, p.183-90. 2002.

Cereghino, G. P., Cereghino, J. L., *et al.* Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. Curr Opin Biotechnol, v.13, n.4, Aug, p.329-32. 2002.

Cereghino, J. L. e Cregg, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. FEMS Microbiol Rev, v.24, n.1, Jan, p.45-66. 2000.

Cino, J. High-yield protein production from *Pichia pastoris* yeast : A protocol for benchtop fermentation. American biotechnology laboratory (Am. biotechnol. lab.) v.17, n.6, p.10-12. 1999.

Daemen, T., Riezebos-Brilman, A., *et al.* Eradication of established HPV16-transformed tumours after immunisation with recombinant Semliki Forest virus expressing a fusion protein of E6 and E7. Vaccine, v.21, n.11-12, Mar 7, p.1082-8. 2003.

Davidson, E. J., Faulkner, R. L., *et al.* Effect of TA-CIN (HPV 16 L2E6E7) booster immunisation in vulval intraepithelial neoplasia patients previously vaccinated with TA-HPV (vaccinia virus encoding HPV 16/18 E6E7). Vaccine, v.22, n.21-22, Jul 29, p.2722-9. 2004.

De Villiers, E. M., Fauquet, C., *et al.* Classification of papillomaviruses. Virology, v.324, n.1, Jun 20, p.17-27. 2004.

Dillner, J. The serological response to papillomaviruses. Semin Cancer Biol, v.9, n.6, Dec, p.423-30. 1999.

Doorbar, J. The papillomavirus life cycle. J Clin Virol, v.32 Suppl 1, Mar, p.S7-15. 2005.

Duggan-Keen, M. F., Brown, M. D., *et al.* Papillomavirus vaccines. Front Biosci, v.3, Dec 1, p.D1192-208. 1998.

Ferlay J., Bray F., *et al.* GLOBOCAN 2002: Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. Lyon, France:IARC Press; 2004. IARC Cancer Base, N. 5, V. 2.0.

Figo, 2003. Staging classifications and clinical practices guideline of gynecology cancers. Disponível em: <<http://www.figo.org/>>. Acesso em: 21 jul. 2005.

Frappart, L., Fontanière, B., *et al.*, 2001. Citopatologia do colo uterino - atlas digital. Disponível em: <<http://screening.iarc.fr/atlas cytobeth.php?cat=A0&lang=4>>. Acesso em: 6 fev. 2007.

Frazer, I. Vaccines for papillomavirus infection. Virus Res, v.89, n.2, Nov, p.271-4. 2002.

Frazer, I. H., Quinn, M., *et al.* Phase 1 study of HPV16-specific immunotherapy with E6E7 fusion protein and ISCOMATRIX adjuvant in women with cervical intraepithelial neoplasia. Vaccine, v.23, n.2, Nov 25, p.172-81. 2004.

Giroglou, T., Florin, L., *et al.* Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. J Virol, v.75, n.3, Feb, p.1565-70. 2001.

Hillemanns, P. e Wang, X. Integration of HPV-16 and HPV-18 DNA in vulvar intraepithelial neoplasia. Gynecol Oncol, v.100, n.2, Feb, p.276-82. 2006.

Inca. Estimativa 2006 - Incidência de Câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer / Ministério da Saúde. Rio de Janeiro, p.98. 2005

Meisels, A. e Fortin, R. Condylomatous lesions of the cervix and vagina. I. Cytologic patterns. Acta Cytol, v.20, n.6, Nov-Dec, p.505-9. 1976.

Motoyama, S., Ladines-Llave, C. A., *et al.* The role of human papilloma virus in the molecular biology of cervical carcinogenesis. Kobe J Med Sci, v.50, n.1-2, Jan, p.9-19. 2004.

Munoz, N., Castellsague, X., *et al.* Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. Vaccine, v.24S3, Aug 21, p.S1-S10. 2006.

Neto, A. R. e Riba, J. C. L. Avaliação dos Métodos Empregados no Programa Nacional de Combate ao Câncer do Colo Uterino do Ministério da Saúde. Rev Bras Ginecol Obstet, v.23, n.4, p.209-216. 2001.

Ogata, K., Nishikawa, H., *et al.* Yeast capable of utilizing methanol. Agr. Biol. Chem., v. 33, 1519-1520. 1969.

Oliveira, M. C., Andrade, M. D. C., *et al.* Aspectos morfológicos que sugerem a presença do papilomavírus humano (HPV) em lesões do epitélio de revestimento da mucosa oral. Rev Bras Patol Oral, v.2, n.2, p.34-43. 2003.

Papanicolaou, G. N. e Traut, H. F. The diagnostic value of vaginal smears in carcinoma of the uterus. 1941. Arch Pathol Lab Med, v.121, n.3, Mar, p.211-24. 1997.

Pinho, A. A. e França-Junior, I. Prevenção do câncer de colo do útero: um modelo teórico para analisar o acesso e a utilização do teste de Papanicolaou. Rev Bras Saúde Matern Infant, v.3, n.Mar, p.95-112. 2003.

Radhakrishna Pillai, M., Sreevidya, S., *et al.* Human papillomavirus type 16 E6 and E7 gene variations in Indian cervical cancer. Gynecol Oncol, v.87, n.3, Dec, p.268-73. 2002.

Ramos, S. D. P., 1997-2007. Gineco - Ginecologia, Obstetrícia, saúde da mulher. Disponível em: <<http://www.gineco.com.br/>>. Acesso em: 6 fev. 2007.

Santos, R. 2002-2006. Conceitos da prevenção do câncer. Disponível em: http://www.prevencaodecancer.com.br/003_a.htm. Acesso em: 6 fev. 2007.

Sasieni, P. D., Cuzick, J., *et al.* Estimating the efficacy of screening by auditing smear histories of women with and without cervical cancer. The National Co-ordinating Network for Cervical Screening Working Group. Br J Cancer, v.73, n.8, Apr, p.1001-5. 1996.

Smahel, M., Sima, P., *et al.* Modified HPV16 E7 Genes as DNA Vaccine against E7-Containing Oncogenic Cells. Virology, v.281, n.2, Mar 15, p.231-8. 2001.

Souza, J. H. K. D., Kali, I. V., *et al.* Evaluation of cervical slides previously diagnosed as ASCUS: interassay and interobserver comparison. Rev Bras Ginecol Obstet, v.26, n.3, p.233-240. 2004.

- Stanley, M. Immune responses to human papillomavirus. Vaccine, Sep 19. 2005.
- Stanley, M., Lowy, D. R., *et al.* Chapter 12: Prophylactic HPV vaccines: Underlying mechanisms. Vaccine, v.24 Suppl 3, Aug 21, p.S106-13. 2006.
- Van Der Burg, S. H., Kwappenberg, K. M., *et al.* Pre-clinical safety and efficacy of TA-CIN, a recombinant HPV16 L2E6E7 fusion protein vaccine, in homologous and heterologous prime-boost regimens. Vaccine, v.19, n.27, Jun 14, p.3652-60. 2001.
- Villa, L. L. Conhecendo o HPV: patologia do trato genital inferior, colposcopia e cirurgia de alta frequência. In: N. V. Martins e Pereyra, E. G. (Ed.). Biologia Molecular: conceitos e princípios básicos. São Paulo: Frôntis Editorial, 2000. p.137-144
- Von Knebel Doeberitz, M. New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. Eur J Cancer, v.38, n.17, Nov, p.2229-42. 2002.
- Wright, T. C., Bosch, F. X., *et al.* Chapter 30: HPV vaccines and screening in the prevention of cervical cancer; conclusions from a 2006 workshop of international experts. Vaccine, v.24 Suppl 3, Aug 21, p.S251-61. 2006.
- Zur Hausen, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. Nat Rev Cancer, v.2, n.5, May, p.342-50. 2002.
- _____. Perspectives of contemporary papillomavirus research. Vaccine, v.24 Suppl 3, Aug 21, p.iii-iv. 2006.
- Zur Hausen, H., Meinhof, W., *et al.* Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. Int J Cancer, v.13, n.5, May 15, p.650-6. 1974.

ANEXOS

ANEXO A
RESUMOS APRESENTADOS EM CONGRESSO

DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSENSOR FLUORIMÉTRICO BASEADO NA AGREGAÇÃO DE SISTEMAS COLOIDAIS POLIANILINA/AU E DNA DE PAPILOMA VÍRUS HUMANO

César A. S. Andrade^{1*}, Maria V. B. dos Santos², Danyelly B. G. Martins³,
Elaine M. Souza³, Jayme D. Ribeiro-Filho², Clécio G. dos Santos²,
José L. Lima-Filho³, Celso P. de Melo²

¹Centro Acadêmico de Vitória - Universidade Federal de Pernambuco

55.608-680, Vitória de Santo Antão, PE, Brasil. *E-mail: cesar@df.ufpe.br

²Departamento de Física - Universidade Federal de Pernambuco. Recife, PE, Brasil.

³Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - Universidade Federal de Pernambuco. Recife, PE, Brasil.

Neste trabalho, pela utilização de fitas de DNA de determinado microrganismo, nós propomos a exploração da alta especificidade do DNA pela sua fita complementar no desenvolvimento de um biosensor fluorimétrico simples e eficiente. Papiloma vírus humano é o nome genérico de um grupo de vírus que infectam a pele e pode causar verrugas nas mãos e pés, ou sobre os órgãos genitais. A detecção direta de DNA é baseada na hibridização molecular entre fitas simples de DNA e a sua fita complementar. O sensor que nós propomos será baseado na atração eletrostática das nanopartículas de metal-polímero e as fitas de DNA alvo. Nós temos inicialmente demonstrado como a mudança no pH da solução pode afetar a luminescência e propriedades dielétricas dos sistemas coloidais de Au/polianilina e, por um controle adequado das condições de preparações fomos capazes de variar a intensidade e o perfil do espectro de luminescência. A microscopia eletrônica de varredura confirma a existência de favorecimento de agregação linear das nanopartículas metal-polímero causada pela interação dipolo-dipolo e a microscopia eletrônica de transmissão revela que o diâmetro médio das nanopartículas está na faixa de 2-4nm. Além disso, medidas de impedância das correspondentes soluções coloidais demonstram que a modificação do nível de pH da solução afeta o grau de condutividade dos nanocompósitos. Finalmente, nós demonstramos que pelo controle do grau de protonação do polímero condutor é possível controlar a interação das nanopartículas de Au/polianilina (que atuam como polications) com os grupos fosfato do DNA (um poliânion), fato confirmado pela microscopia de fluorescência.

Apoio: CNPq

DEVELOPMENT OF FLUORIMETRIC BIOSENSORS BASED ON
AGGREGATION OF COLLOIDAL POLYANILINE/AU SYSTEMS
AND HUMAN PAPILOMA VIRUS DNA

César A. S. Andrade¹, Maria V. B. dos Santos², Danyelly B. G. Martins³, Elaine M. Souza³, Jayme D. Ribeiro-Filho³, Clécio G. dos Santos², José L. Lima-Filho³, Celso P. de Melo^{2*}

¹Centro Acadêmico de Vitória - Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)
55608-680, Vitória de Santo Antão, PE, Brazil.

²Departamento de Física - Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)
50.670-901 Recife, PE, Brazil. *E-mail: celso@df.ufpe.br

³Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)
50.670-901 Recife, PE, Brazil.

In the present work, we use solution chemistry methods to prepare fluorescent (gold nanoparticles/conducting polymer) composites that have promising characteristics for use as fluorimetric sensors for the presence of pathogens. By using single strand DNA of a chosen microorganism as a template for the growth of the conducting polymer chains, we propose to exploit the high specificity of the DNA for its complementary single helix to develop simple and very efficient fluorimetric biosensors. We discuss preliminary results of using a Human Papilloma Virus (HPV) template for the growth of Au/polyaniline composites. HPV is the generic name of a group of viruses that infect the skin and can cause warts on the hands or feet, or on the genitals. The devise of new mechanisms of control of the optical, magnetic and electronic properties of nanoparticles continues to be a matter of great interest, since those are size- and shape-dependent characteristics (Bruchez et al., *Science*, Vol. 281, 2013 1998). In recent years, single or double stranded DNA molecules have been used as convenient templates for synthesizing highly organized nanostructured materials and for the fabrication of sensors and nanoelectronic devices (Porath et al., *Nature*, Vol. 403, 635, 2000). Most direct DNA detection is based on the molecular hybridization between single-stranded DNA probes and their complementary single stranded DNA targets (Pouthas et al., *Applied Physics Letters*, Vol. 84, 1594, 2004). The sensor we propose will be based on the electrostatic attraction of metal-polymer nanoparticles and the stranded DNA targets. We have initially shown how the change in the pH of the solution can affect the luminescence and dielectric properties of Au/polyaniline colloidal systems and, by an adequate control of the preparation conditions, we have been able to vary both the intensity and profile of the luminescence spectra. While scanning electron microscopy confirms the existence of a favored linear aggregation of the metal-polymer nanoparticles caused by dipole-dipole interaction (Liao, et al., *Colloids and Surfaces A*, Vol. 223, 177, 2003), transmission electron microscopy reveals that the diameters of the nanoparticles are in the 2-4 nm range. Furthermore, impedance measurements of the corresponding colloidal solutions show that the change on the pH level of the solution not only affects the degree of conductivity of the nanocomposites, but also determines the size of the colloidal particles and their aggregation characteristics. Finally, we have also shown that by controlling the degree of protonic doping of the conducting polymer it is possible to allow for the interaction of these Au/PANi nanoparticles (that act as polycations) with the phosphate groups of DNA (a polyanion), a fact that is confirmed by fluorescence microscopy. The possible implications of these results for the development of electro-optical devices are discussed.

ANEXO B
RELATÓRIO

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM BIOQUÍMICA**

ELAINE VIRGÍNIA MARTINS DE SOUZA

CLONAGEM DO ONCOGENE E6 DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO SOROTIPO 18

RELATÓRIO DE ATIVIDADES

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Giovani Rota Bertani

CO-ORIENTADORA:

Prof^ª. Dr^a. Danyelly Bruneska Gondim Martins

Recife, 2007.

1 Introdução

Cerca de 490.000 novos casos de câncer cervical tem ocorrido entre mulheres do mundo todo a cada ano (FERLAY *et al*, 2004). No Brasil, a estimativa de incidência aponta o câncer de colo do útero como o terceiro mais comum entre as mulheres no ano de 2006, com estimativa de 19.260 novos casos em todo o país. Segundo o INCA (2006), no estado de Pernambuco, estima-se que ocorram 22,16 novos casos para cada 100.000 mulheres.

O papilomavírus humano (HPV) é o principal agente envolvido em lesões benignas e malignas, caracterizado como baixo-risco e alto-risco (MUNÕZ *et al*. 2006). Os HPVs de alto-risco, como os sorotipos 16 e 18, são capazes de produzir as oncoproteínas E6 e E7 que alteraram as funções das proteínas regulatórias do ciclo, como as proteínas p53 e retinoblastoma, respectivamente (ZUR HAUSEN, 2002).

A identificação dos tipos de HPV envolvidos na lesão do cérvix pode resultar em um tratamento mais rápido e eficaz. Atualmente, o teste de Papanicolaou, técnica que foi descrita por George Papanicolaou em 1941, tem sido aplicado como principal método de exame preventivo. Esta técnica se fundamenta na coleta de amostras para interpretação da morfologia das células que são liberadas da superfície do cérvix (SASIENI *et al*, 1996).

Os avanços biotecnológicos permitem detectar com maior eficiência a presença do vírus HPV em amostras coletadas a partir de pacientes infectadas, com a utilização de “Southern Blot” , Reação da polimerase em cadeia (PCR) com o uso de *primers consensus*, e hibridização *in situ* (HIS) (BOSCH, MUNÕZ, 2002). Apesar destas tecnologias, ainda há registros de não detecção do DNA de HPV em lesões de câncer cervical.

Trabalhos recentes têm descrito a utilização de DNA fita simples ou dupla como molde para sintetizar materiais nanoestruturado altamente organizado e para a fabricar de aparelhos sensores nanoelétricos (PORATH *et al*, 2000). Muitas detecções diretas de DNA são baseadas na hibridização da sonda de fita simples de DNA com a sua fita complementar (POUTHAS *et al*, 2004). Os biosensores têm apresentado um rápido desenvolvimento na área de diagnóstico.

Neste trabalho, para a utilização de fitas de DNA de HPV, nós propomos a exploração da alta especificidade do DNA pela sua fita complementar no desenvolvimento de um biosensor fluorimétrico simples e eficaz.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Detecção direta de DNA pela hibridização molecular entre as fitas simples de DNA e a sua fita complementar (E6 de HPV sorotipo 16).

2.2 Objetivo específico

- Amplificação do gene E6 de HPV-16 e 18;
- Purificação dos amplicons de E6;
- Ligação do DNA às nanopartículas fluorescentes

3 Metodologia

3.1 Nanopartículas

As nanopartículas utilizadas foram fornecidas pelo Departamento de Física da UFPE e são alvo de patente para o grupo do Prof. Dr. Celso Melo. Estas nanopartículas são constituídas de ouro e polianilina (Au/PANi), em uma combinação fluorescente, visível sob luz UV, que se comporta como polication e é capaz de se ligar aos grupos fosfato do DNA (poliânions).

3.2 Reação de polimerização em cadeia (PCR) da E6. HPV 16 e 18

O plasmídeo pET28a/E6, contendo o gene E6 de HPV 16, foi utilizado como molde para amplificação da sequência gênica desejada. Os oligonucleotídeos 5'-GCTGAATTCATGCACCAA-3' (FE6*EcoRI*/ZA - sense) e 5'-CGTTCTAGAATCAGCTGGGT-3' (RE6*XbaI*/ZA - anti-sense) foram utilizados na amplificação da E6. A reação foi preparada utilizando 20 ng DNA; 0,5 µl primers específico (10 pmol); 2,5 µl Tampão Taq Platinum 10X; 0,5 µl Platinum Taq Pol (5 U/µl); 0,5 µl MgCl₂ (50 mM), 0,5 µl dNTP (40 µM), com volume final de 25 µl. As

condições de ciclagem foram realizadas em Rotor Gene 3000 (Uniscience, Cobertt Research) como descritas a seguir: 1 seg a 95°C; 30 repetições de: 1min a 95°C, 30 seg a 56°C -Towchdown (diminuição de 4°C a cada ciclo) e 30 seg a 72°C concluindo com a incubação de 1 min a 72°C.

O gene E6 de HPV sorotipo 18 foi amplificado a partir do plasmídeo pBR322 contendo o genoma do HPV-16, utilizando os primers sense FE6.18 *Kpn*/ZA (5'-GGTACCATGGCGCGCTTTGA-3') e RE6.18 anti-sense *Apa*I/ZA(CHT) (5'-GGGCCCTACTTGTGTTTCTCT-3'), sob as seguintes condições: 20 ng DNA; 1.5 µl primers específico (10 pmol); 2.5 µl Tampão Taq Platinum 10X; 0.5 µl Platinum Taq Pol (5 U/µl); 0.75 µl MgCl₂ (50 mM), 0.5 µl dNTP (40 µM). A reação de PCR foi realizada em Gradiente Mastercycle (Eppendorf) nas seguintes condições: 1 min a 95°C seguido de 40 ciclos com etapas de 30 seg a 95°C, 20 seg a 68° C, 1min a 72°C, seguida de uma ciclagem final de 1min a 72 °C.

Uma pequena amostra do produto da amplificação foi visualizado através da eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio. Os amplicons gerados, antes de serem ligados às nanopartículas, foram purificados utilizando o Kit QIAquick PCR Removal Purification (QIagen), para eliminar todos os resíduos de enzimas, sais e primers da reação, e o DNA foi mantido em água ultrapura .

3.3 Ligação do DNA às nanopartículas

O DNA amplificado de E6 de HPV16 foi ligado a uma lâmina de vidro silanizada (para remoção dos grupamentos OH) em alta temperatura (aproximadamente 95° C) para permitir a abertura da dupla fita de DNA. Posteriormente, é adicionada uma solução de nanopartículas fluorescente ressuspensas em etanol diluído. Esta mistura é adicionada à placa contendo o DNA fita simples imobilizado. Ao material é adicionado uma preparação pré-aquecida a 95°C, que foi submetido à secagem para iniciar a etapa de lavagem. Este material é lavado, suavemente, com água ultrapura para possibilitar a visualização da intensidade de fluorescência obtida a partir da concentração de DNA aderido às nanopartículas fluorescentes. As amostras foram observadas em microscópio de fluorescência e as imagens captadas por câmera digital.

4. Resultados e Discussão

Para visualização do efeito obtido pela interação entre os grupos fosfato do DNA e as nanopartículas fluorescentes, foram realizados testes de: (1) adesão do DNA fita simples de HPV-16 na lâmina silanizada, (2) ligação prévia do DNA à nanopartícula, (3) adesão da nanopartícula à lamina silanizada e (4) adesão do DNA fita simples à lamina silanizada com posterior ligação deste à fita complementar e aplicação das nanopartículas fluorescentes.

Quando a solução de nanopartículas é adicionada diretamente à lamina, não ocorre fixação, resultando em efeito aquoso indefinido (Figura 1).

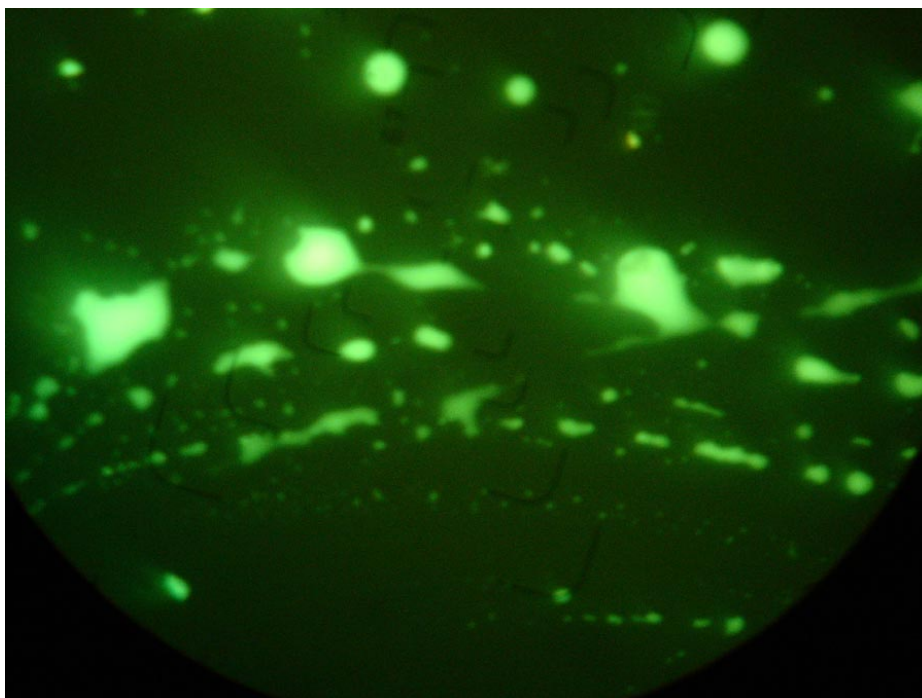


Figura 1. Foto da lamina silanizada com adição de nanopartículas à sua superfície quando exposta à luz ultravioleta em microscópio de fluorescência (ampliação de 100x).

Quando foi realizada a adição da fita simples da sequência gênica da E6 de HPV-16 à lamina seguida da fita complementar e posterior aplicação das nanopartículas de Au/PANi a visualização em microscópio de fluorescência apresentou-se bem diferente da anterior, com pontos específicos sinalizadores da ocorrência da ligação (Figura 2).

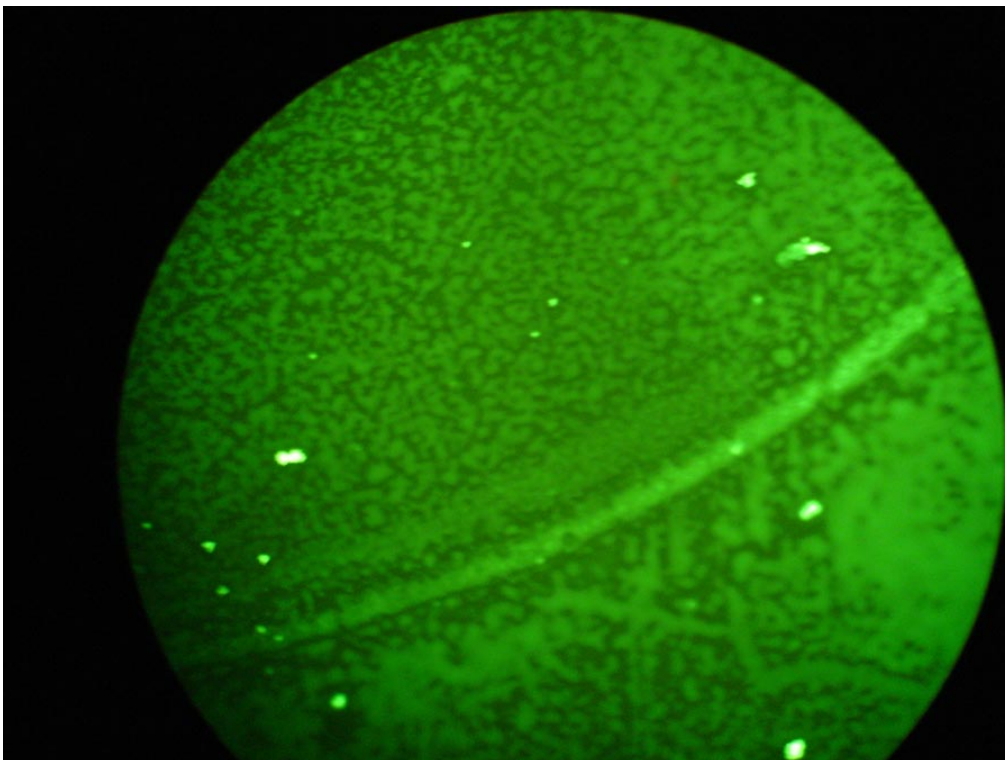


Figura 2. Foto da lâmina silanizada contendo 10 μ l do DNA fita simples da E6 de HPV-16 aderido à sua fita complementar e às nanopartículas, sob o foco de um microscópio de fluorescência e aumento de 100x.

Esta preparação apresentou alta fluorescência, o que pode dificultar uma quantificação precisa. Desta forma, foi adicionada uma etapa de lavagem ao protocolo final para garantir a retirada de excesso de DNA não aderido à lamina e de nanopartículas não aderidas aos grupos fosfatos ou aderidas à DNA não imobilizado. Desta forma, foi possível obter uma imagem mais limpa do sistema fluorescente (Figura 3).

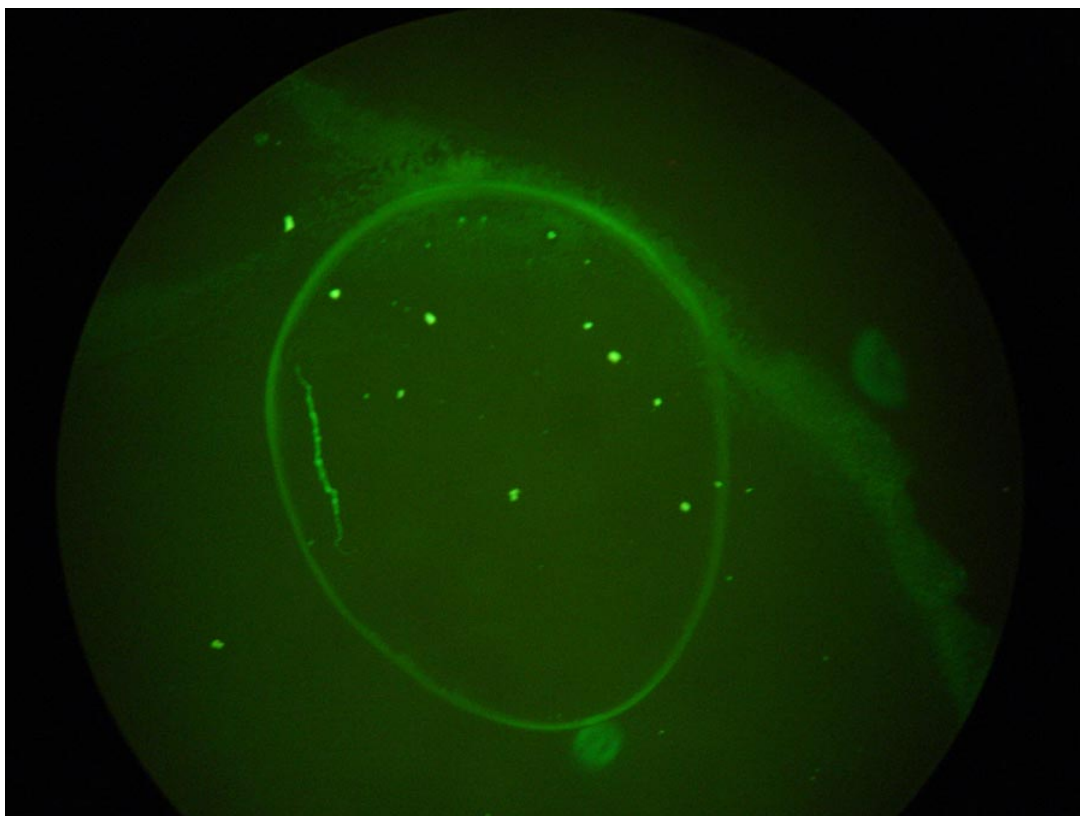


Figura 3. Foto da lamina silanizada contendo o 1 μ l DNA fíta simples da E6 de HPV-16 aderido à sua fíta complementar e às nanopartículas, com adicional etapa de lavagem, sob o foco de um microscópio de fluorescência e aumento de 100x.

A visualização em microscópio fluorescente, utilizando uma quantidade diminuta de solução de DNA, permitiu observar a localização da gota aplicada na lamina pelo halo indicativo, onde este apresenta naturalmente excesso de DNA devido à forças intermoleculares e a tensão superficial da água.

Em experimentos adicionais, foi observado que a mudança no pH da solução pode afetar a luminescência e propriedades dielétricas dos sistemas coloidais de Au/polianilina. A microscopia eletrônica de varredura confirmou a existência de favorecimento de agregação linear das nanopartículas metal-polímero causada pela interação dipolo-dípolo e a microscopia eletrônica de transmissão revela que o diâmetro médio das nanopartículas está na faixa de 2-4 nm. Além disso, medidas de impedância das correspondentes soluções coloidais demonstram que a modificação do nível de pH da solução afeta o grau de condutividade dos nanocompósitos. Adicionalmente, foi possível demonstrar que pelo controle do grau de protonação do polímero condutor é possível controlar a interação das nanopartículas de Au/polianilina (que atuam como polycations) com os grupos fosfatos do DNA (poliânions), como observado pela microscopia de fluorescência.

5 Referências bibliográficas

Porath D, Bezryadin A, de Vries S, Dekker C. Direct measurement of electrical transport through DNA molecules. Nature. 2000 Feb 10;403(6770):635-8.

Pouthas F, Gentil C, Côte D, Bockelmann U. DNA detection on transistor arrays following mutation-specific enzymatic amplification Appl. Phys. Lett. 84, 1594 (2004)

Zur Hausen. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. Nat Rev Cancer, v.2, n.5, p.342-50. 2002.

Bosch FX, Munoz N. The viral etiology of cervical cancer. Virus Res, v.89, n.2, Nov, p.183-90. 2002.

Munoz N, Castellsague X, *et al*. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. Vaccine, v.24S3, Aug 21, p.S1-S10. 2006.

Sasieni, P. D., Cuzick, J., *et al*. Estimating the efficacy of screening by auditing smear histories of women with and without cervical cancer. The National Co-ordinating Network for Cervical Screening Working Group. Br J Cancer, v.73, n.8, Apr, p.1001-5. 1996.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM BIOQUÍMICA**

ELAINE VIRGÍNIA MARTINS DE SOUZA

CLONAGEM DO ONCOGENE E6 DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO SOROTIPO 18

RELATÓRIO DE ATIVIDADES

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Giovani Rota Bertani

CO-ORIENTADORA:

Prof^ª. Dr^a. Danyelly Bruneska Gondim Martins

Recife, 2007.

1 INTRODUÇÃO – PROBLEMÁTICA

Cerca de 490.000 novos casos de câncer cervical tem ocorrido entre mulheres do mundo todo a cada ano. A incidência desta doença varia de 5 casos para cada 100.000 mulheres em muitos países industrializados, em comparação mais de 50 casos por 100.000 mulheres em países em desenvolvimento (Ferlay *et al*, 2004). Aproximadamente 80% de todos os casos ocorrem em países subdesenvolvidos, devido a programas preventivos inexistentes ou ineficazes (Tonon *et al*, 2006).

No Brasil, a estimativa de incidência aponta o câncer de colo do útero como o terceiro mais comum entre as mulheres em 2006, sendo superado apenas pelo câncer de pele (não-melanoma) e pelo câncer de mama, sendo a quarta causa de morte por câncer em mulheres. Em 2006, deverão surgir 19.260 novos casos por câncer do colo do útero em todo o país, com um risco estimado de 20 novos casos a cada 100.00 mulheres. No estado de Pernambuco a taxa estimada é de 22,16 casos para cada 100.000 mulheres (INCA, 2006).

Infecções persistentes com o papilomavírus humano (HPV) de alto risco e integração do seu DNA no genoma de células hospedeira, tem sido indicado na etiologia das doenças malignas e pré- malignas no trato genital feminino (Hillemanns, Wang, 2006). Pesquisas têm demonstrado que a integração do HPV 18 e 16 aumenta a severidade das lesões cervicais.

O HPV é um vírus de dupla hélice de DNA curto da família *Papoviridae*, o HPV é formado por cerca de 8000 nucleotídeos, com o DNA circular (Chang *et al*, 2005).

O genoma do HPV é dividido em três regiões: genes codificados precocemente ou “early” (E1, E6 ou E7), genes codificados tardiamente ou “late” (L1 e L2) e uma região regulatória (URR). As regiões de genes codificados antecipadamente e tardios são expressas em proteínas, mas a região URR não é codificada (Park *et al*, 1995).

Os papilomavírus são agentes infecciosos caracterizados por espécies que possuem um tropismo celular. O ciclo da infecção e o crescimento viral são totalmente dependentes da diferenciação celular (Stanley, 2005), necessitando dessa forma da habilidade de proliferação das células epiteliais da mucosa ou epiderme (Zur Hausen *et al*, 1996). Os HPVs estão ligados com os cânceres vulvar, vaginal, de pênis, anal e perianal e provoca cerca de 20% dos cânceres oral, de laringe e nasal.

O DNA do papiloma vírus humano é curto, não-enovelado e possui um grande tropismo por células epiteliais. O seu genoma compreende entre 7.000 a 8.000 pares de

base de dupla fita, sendo DNA circular. Mais que 100 tipos diferentes têm sido identificados em humanos. Alguns desses tipos de HPVs, especialmente 16, 18, 31,33 e 58, apresentam funções específicas no desenvolvimento do câncer cervical (Nemes *et al*, 2006).

Dentre os tipos de HPV de alto risco, os tipos 16 e 18 são os mais associados com o carcinoma do cervical, e foram clonados em 1983 e 1984, respectivamente (Dürst *et al*, 1983 & Boshart *et al*, 1984).

O potencial oncogênico do Papilomavírus reside na expressão das proteínas precoce E6 e E7 após infecção celular. Estas proteínas são expressas em tecidos malignos e são capazes de imortalizar uma variedade de tipos de células humanas em cultura (Münger *et al*, 1989).

Várias funções têm sido descritas da E6 e E7, porém observações iniciais revelaram que a E6 interage com p53, e E7 interage com a proteína do retinoblastoma (pRB), impedindo a atuação desses supressores tumorais na regulação do ciclo celular. A interação da E6 com a proteína p53 e a pró-apoptose da proteína BAK (Jackson *et al*, 2000), resultam em resistência celular à apoptose e aumento da instabilidade cromossomal. Em adição, ativação da telomerase (Veldman *et al*, 2001) e a postulação da inibição da degradação da SRC da família das quinases pela oncoproteína E6 (Oda *et al*, 1999), influenciando todas as funções importantes em relação á estimulação do crescimento. Tem-se especulado que as estabilizações de formas ativas de membros específicos da família de quinases SRC apresentam contribuições para a transformação do fenótipo do HPV (Oda *et al*, 1999).

Por indução da amplificação centriolar, E7 induz aneuploidia em células infectadas, contribuindo para o desenvolvimento de tumores (Duensing *et al*, 2001).

As oncoproteínas E6 e E7 podem, independentemente, imortalizar células humanas, com uma redução da eficiência (Band *et al*, 1990 & Halbert *et al*, 1991). Entretanto, a associação da E6 com a E7 resultam um aumento da atividade transformante, o que parece ser devido aos efeitos de complementaridade e sinergismo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Clonar o oncogene E6 do Papilomavírus humano sorotipo 18 em sistema de expressão de proteínas heterólogas em linhagens da levedura *Pichia pastoris*.

2.2 Objetivos específicos para E6 do HPV 18

- 2.2.1-Aperfeiçoar as condições de amplificação do gene E6 de HPV-18;
- 2.2.2-Purificar os amplicons de E6;
- 2.2.3- Tratamento dos amplicons de E6 com enzimas de restrição adequadas;
- 2.2.4- Clonagem dos genes E6 no plasmídio pPICZA;
- 2.2.5-Obtenção de células (*E. coli*) transformantes e extração do plasmídio para seqüenciamento;
- 2.2.6- Linearização do vetor para promover a integração no genoma do hospedeiro;
- 2.2.7- Obtenção de células (*Pichia pastoris*) transformantes;
- 2.2.8- Seleção de recombinantes de *P. pastoris* expressando o gene E6 do HPV sorotipo 18.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Microrganismos

Utilizou-se a linhagem DH-5 α de *Escherichia coli*. A linhagem bacteriana foi mantida em meio L (1% triptona, 0,5% extrato de levedura; 0,25% NaCl, 2% agar, 1ml 1N NaOH).

3.2 Plasmídios

O gene E6 do HPV sorotipo 18 foi clonado diretamente no vetor pPICZA (INVITROGEN), de acordo com as condições determinadas pelo fabricante. Os fragmentos e plasmídios foram purificados utilizando colunas livres de endotoxinas (Qiagen Inc., Valencia, CA).

3.3 Reação de polimerização em cadeia (PCR) da E6. HPV 18

A amplificação da seqüência da E6 do HPV 18 utilizou-se os primers específicos conforme a tabela 1. O molde de DNA para a seqüência E6 do HPV 18 foi o plasmídeo pBR 322/HPV 18.

Tabela 1. Oligonucleotídeos forward e reverse da sequência da E6 do HPV tipo 18.

<i>Nome do oligo</i>	<i>Sequência do oligo</i>	<i>Características</i>
FE6.18 KPN/ZA	5' GGT ACC <u>ATG</u> GCG CGC TTT GA 3'	64°C 20 nucleotídeos
RE6.18 APAI/ZA	5' GGG CCC <u>TAC</u> TTG TGT TTC TCT 3'	64°C 21 nucleotídeos

A reação do PCR sendo composta de DNA molde, oligos, dNTP, MgCl₂, Taq Buffer e 1 U da enzima Platinum Taq DNA polimerase (INVITROGEN), para o volume final de 25µl. As reações ocorreram no Rotor Gene 3000(Uniscience, Cobertt Research):

- E6. HPV 18_ 1. 1' a 95°C
- | | |
|----------------|-------------|
| 2. 30'' a 95°C | } 40 ciclos |
| 3. 20'' a 64°C | |
| 4. 1' a 72°C | |
| 5. 1' a 72°C | |
| 6. 1' a 25°C | |

O produto da amplificação foi visualizado através da eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio. Para purificação dos amplicons utilizou-se o kit da QIAGEN (QIAquick PCR removal Purification Kit).

3.4 Tratamento do inserto e plasmídeo com enzimas

O inserto E6 de HPV-18 e o plasmídeo pPICZA foram submetidos a uma clivagem por enzimas de restrição específicas (*KpnI* e *ApaI*), permitindo a inserção da sequência no vetor pPICZA, “*in frame*”.

A purificação do tratamento enzimático realizou-se utilizando um kit da QIAGEN (QIAquick Nucleotide Removal Kit).

3.5 Clonagem da proteína E6 do papilomavírus do tipo 18.

O vetor de clonagem e expressão pPICZA foi utilizado como recipiente para o gene E6 do HPV 18. As concentrações dos produtos purificados foram mensuradas através da

utilização de um “ladder” quantitativo (Low DNA Mass Ladder/ INVITROGEN). Posteriormente em razão molecular 3:1, o produto purificado foi ligado ao plasmídeo pPICZA, sob ação da enzima T₄ DNA ligase a 23°C por uma hora. Após verificação da ligação do inserto ao vetor por gel de agarose, células competentes de *E. coli* DH-5 α foram transformadas pelo método de choque térmico. As células de *E. coli* transformadas foram selecionadas pelo plaqueamento em meio L contendo zeocina (25 μ g/mL) nas condições pré-determinadas pelo fornecedor.

3.6 Extração plasmidial (pPCIZA/E6.18)

Os plasmídeos foram extraídos por lise alcalina utilizando o Método de Sambrook modificado, 1989. Após extração dos plasmídios foram purificados em colunas (Microcon) e tratados com RNase por 30 minutos.

3.7 Linearização

O pPCIZA/E6.18 possui aproximadamente 3800 pb, dessa forma foram utilizadas as enzimas *Apa*I, *Kpn*I e *Eco*R I separadamente para clivar o plasmídeo em um único sítio de restrição. E com a eletroforese foi visualizado o tamanho aproximado em pares de bases dos plasmídeos.

4. resultados e discussão

4.1 Amplicons

Utilizamos os oligonucleotídeos (forward e reverse), conforme especificado na tabela 1 para amplificação do gene E6 do HPV 18, e os amplicons foram purificados e visualizados em gel de agarose a 0,8% (Figura 1).

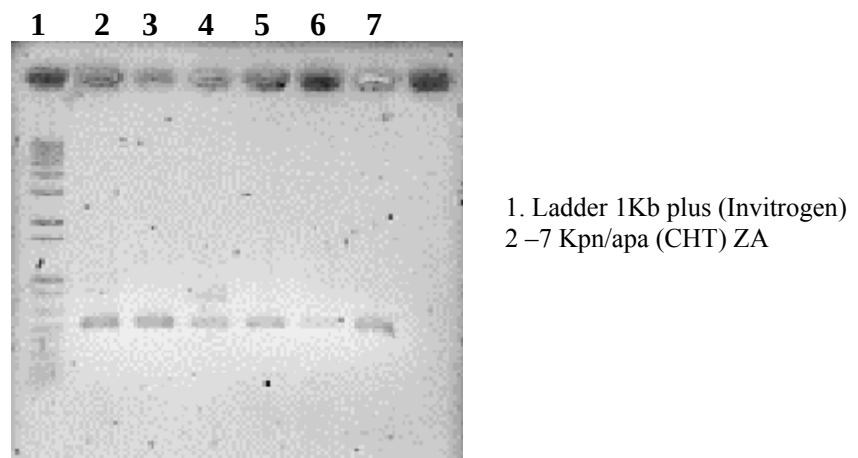


Figura 1. Corrida eletroforética dos amplicons HPV18.E6 purificado

4.2 Extração plasmidial

Após transformação das células fez-se extração plasmidial dos clones selecionados. E submeteram-se as amostras a uma corrida eletroforética em gel de agarose, onde é possível visualizarmos o DNA plasmidial nas suas três formas (Super Enovelado, Circular Relaxado e Linear) (Figura 2).

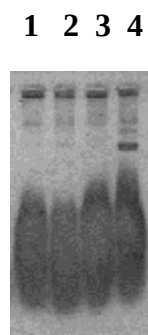


Figura 2. Gel de agarose 0,8% da extração do pPICZAE6.18. 1-4 Plasmídeo extraído pPICZA E6.18

4.3 Linearização

A linearização por enzimas de restrição comprovou a presença de um fragmento de aproximadamente 3800 pb, onde o gene E6 do HPV 18 possui 477pb e o plasmídeo pPICZA aproximadamente 3.305 pb (Figura 3 A e B). No experimento utilizaram-se as enzimas *ApaI* e *kpnI* separadamente, que tiveram os seus sítios incluídos na sequência a partir dos primers, e a enzima *EcoRI* também foi utilizada já que o plasmídeo pPICZA possui um único sítio de restrição para esta enzima.

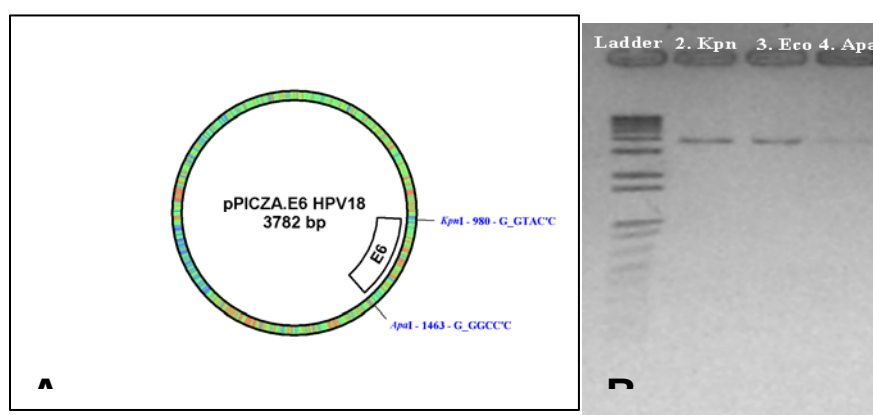


Figura 3. (A) Esquema do pPICZAe6.18 (B) Gel de agarose 0,8% da linearização do pPICZA/ E6.18 com as enzimas *Kpn I*, *Eco I* e *ApaI*.

5 Perspectivas

Seqüenciamento dos clones pPICZA/E6 18 para confirmação da ligação do inserto com o vetor. A transformação de células de leveduras, como também sua expressão em *P. pastoris*, será de acordo com as instruções do fabricante (INVITROGEN). O metanol será utilizado como indutor do sistema AOX durante o crescimento das leveduras nos processos de batelada ou batelada alimentada. Após o término do cultivo o sobrenadante as células serão separadas para recuperação da proteína-alvo. A purificação da proteína heteróloga será realizada em coluna cromatográfica revestida com níquel que permitirá recuperar apenas as proteínas com cauda de histidina. Esta etapa permitirá a utilização das proteínas em processos mais avançados como testes de imunogenicidade, produção de anticorpos e análise da estrutura cristalográfica.

5. Referências bibliográficas

- Ausubel *et al.* Current Protocols in molecular biology, vol 2. New York: John Wiley & Sons, Inc. (1989).
- Band, V., Zaychowski, D., Kulesa, V. & Sager, R. Human papillomavirus DNAs immortalize normal human mammary epithelial cells and reduce their growth factor requirements. Proc. Nati. Acad. Scr. USA , 87, p. 463-467. 1990.
- Boshart, M. et al. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer and cell lines derived from genital cancer. EMBOJ , 3, p. 1151-1157.1984.
- Chang, C. H., Chen, T. H., *et al.* The prevalence of HPV-18 and variants of E6 gene isolated from cervical cancer patients in Taiwan. J Clin Virol, v.32, n.1, Jan, p.33-7. 2005.
- Inca. Estimativa 2006 - Incidência de Câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer / Ministério da Saúde. Rio de Janeiro, p.98. 2005
- Duensing, S., Duensing, A., *et al.* Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein-induced abnormal centrosome synthesis is an early event in the evolving malignant phenophyte . Cancer Res, 6, p. 2356-2360. 2001.
- Durst, M., Gissmann, L., *et al.* A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. Proc Natl Acad Sci U S A, v.80, n.12, Jun, p.3812-5. 1983.
- Nemes *et al.* Expression of p16INK4A, p53, and Rb proteins are independent from the presence of human papillomavirus genes in oral squamous cell carcinoma. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod;102, p.344-52. 2006
- FERLAY J., BRAY F., ET AL. GLOBOCAN 2002: CANCER INCIDENCE, MORTALITY AND PREVALENCE WORLDWIDE. LYON, FRANCE:IARC PRESS; 2004. IARC CANCER BASE, N. 5, V. 2.0.
- Halbert, C. L., Demers, G. W., *et al.* The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. J Virol, v.65, n.1, Jan, p.473-8. 1991.
- Hillemanns, P. e Wang, X. Integration of HPV-16 and HPV-18 DNA in vulvar intraepithelial neoplasia. Gynecol Oncol, v.100, n.2, Feb, p.276-82. 2006.
- Munger, K., Phelps, W. C., *et al.* The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. J Virol, v.63, n.10, Oct, p.4417-21. 1989.
- Oda, H., Kumar, S.& Howley, P.M. Regulation of the Src family tyrosine kinase Blk through E6Ap-mediated ubiquitination. Proc. Nati. Acad. Sci. USA , 96, p. 9557-9562. 1999.

Park, T. W., Fujiwara, H., *et al.* Molecular biology of cervical cancer and its precursors. Cancer, v.76, n.10 Suppl, Nov 15, p.1902-13. 1995.

Sambrook J., Fritsch E. F. & Maniatis T. 1989. In: Molecular Cloning - A Laboratory Manual. Transfer of DNA from agarose gels to solid supports. 2: 9.34-9.35.

Stanley, M. Immune responses to human papillomavirus. Vaccine, Sep 19. 2005.

Tonon, S. A., Basiletti, J., *et al.* Human papillomavirus type 16 molecular variants in Guarani Indian women from Misiones, Argentina. Int J Infect Dis, Jul 18. 2006.

Veldman, T., Horikawa, I., Barret, J. C. & Schiegel, R. Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type16E6 oncoprotein. J. Virol , 75, p. 4467-4472. 2001.

Zur Hausen, H. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. Biochim Biophys Acta, v.1288, n.2, Oct 9, p.F55-78. 1996.

ANEXO C
BLASTN (NCBI)

Score = 563 bits (284), Expect = 3e-157
 Identities = 452/482 (93%), Gaps = 21/482 (4%)
 Strand=Plus/Plus

```

Query   1      ATGCACCAAAAAGAGAACTAGNAATGTTTCAGGACCCACAGGAGCGACCCAGAAAAGTTACC 60
      |||
Sbjct   1      ATGCACCAAAAAGAGAACT-GCAATGTTTCAGGACCCACAGGAGCGACCCAGAAAAGTTACC 59

Query  61      ACAGTTATGCACAGAGCTGCAAAACAACTATACATGATATAATATTAGAATGTGTGTACTG 120
      |||
Sbjct  60      ACAGTTATGCACAGAGCTGCAAAACAACTATACATGATATAATATTAGAATGTGTGTACTG 119

Query  121     CAAGCAACAGTTACTGCGACGTGAGGTATATGACTTTTGCTTTTCGGGATTTATGCATAGT 180
      |||
Sbjct  120     CAAGCAACAGTTACTGCGACGTGAGGTATATGACTTTTGCTTTTCGGGATTTATGCATAGT 179

Query  181     ATATAGAGATGGGAATCCATATGCTGTATGTGATAAAATGTTTAAACGTTTATATTCTACA 240
      |||
Sbjct  180     ATATAGAGATGGGAATCCATATGCTGTATGTGATAAAATGTTTAAA-GTTT-TATTCTA-A 236

Query  241     AATTAGTGAGTATAGACATTATTGTTATAGCTTGTATGGAAAACAACATTAGAACAGCAAT 300
      |||
Sbjct  237     AATTAGTGAGTATAGACATTATTGTTATAGTTTGTATGG-AACAACATTAGAACAGCAAT 295

Query  301     ACAAGCAAAACCGTTGTGTGATTTGTTAAATTAGCGTGTATTAACCTGTCAAAACAGCCACT 360
      |||
Sbjct  296     ACAAA-CAAAACCGTTGTGTGATTTGTT-AATTAG-GTGTATTAA-CTGTCAAA-AGCCACT 350

Query  361     GTTGTCTTTGAAAAGCAAAAAGCAAAAAGACTATCTGGACCAAAAAGCAAGATTTCCATTAAT 420
      |
Sbjct  351     G-TGTCC-TGAA--GAAAAGC-AAAGAC-ATCTGGA-CAAAAAGCAAAAGATTCCA-TAAT 402

Query  421     ATAAAGGGGTCGCGTGGACCGGT-GATGTATGTCTTGTGCAAGATCATCAAGAACACGTA 479
      ||
Sbjct  403     AT-AAAGGGGTCG-GTGGACCGGTGATGTATGTCTTGTTCAGATCATCAAGAACACGTA 460

Query  480      GA   481
      ||
Sbjct  461      GA   462

```

ANEXO D
INSTRUÇÕES DE AUTORES DO PERIÓDICO DO TRABALHO

Virus Genes

Editors-in-Chief: Y. Becker; G. Darai
ISSN: 0920-8569 (print version)
ISSN: 1572-994X (electronic version)
Journal no. 11262
Springer US
[Online version available](#)
[Online First articles available](#)

[Description](#)

|

[Editorial Board](#)

|

[Most viewed articles](#)

Instructions for Authors

Virus Genes

[Online Manuscript Submission](#)

[Manuscript Style](#)

[Full Papers and Review Articles](#)

[Short Communications \(3 pages\)](#)

[Style Manuals](#)

[Proofing](#)

[Copyright](#)

[Offprints](#)

[Springer Open Choice](#)

—

Online Manuscript Submission

Springer now offers authors, editors and reviewers of Virus Genes the use of our fully web-enabled online manuscript submission and review system. To keep the review time as short as possible, we request authors to submit manuscripts online to the journal's editorial office. Our online manuscript submission and review system offers authors the option to track the progress of the review process of manuscripts in real time. Manuscripts should be submitted to: (please use the URL below)

The online manuscript submission and review system for Virus Genes offers easy and straightforward log-in and submission procedures. This system supports a wide range of submission file formats: for manuscripts - Word, WordPerfect, RTF, TXT and LaTeX; for figures - TIFF, GIF, JPEG, EPS, PPT, and Postscript. PDF is not an acceptable file format.

NOTE: In case you encounter any difficulties while submitting your manuscript online, please get in touch with the responsible Editorial Assistant by clicking on "CONTACT US" from the tool bar.

Authors are requested to download the Consent to Publish and Transfer of Copyright form from the journal's online submission system (see the URL provided below). Please send a completed and duly signed form either by mail or fax to the Editorial Office of Virus Genes as instructed on the form. Authors should still follow the regular instructions for authors when preparing their manuscripts (see below).

When submitting your manuscript, please identify the virus considered as Human, Animal, Plant, Insect, or Other. This will help us to process and review your manuscript more quickly.

Manuscript Style

All manuscripts, including references, should be submitted in English (original and 3 copies), and typed double-spaced on 22 x 29 cm (8 1/2 x 11") white bond paper. Liberal margins (2.5 cm) should be left at the top and bottom of each page as well as on the sides. One printed page comprises approximately 500 words, and/or equivalent space for figures, tables, etc.

Full Papers and Review Articles

Title page

Title of paper should concisely present the major finding of the study.

- Full names of authors (not initials) with mailing and e-mail addresses. Indicate submitting author with an asterisk.
- Running title of three to six words.
- Six key words.
- Indicate to whom proofs should be sent.
-

Abstract page

Provide information on major accomplishments.

- Introduction, materials and methods, experimental approach, results, discussion and interpretation of results, conclusions, acknowledgments, references.
- The text should follow the abstract and begin on a new page, as should references, tables, and legends.
- Metric units and Celsius temperatures should be used throughout.
- Abbreviations should be defined in the abstract and again when they first appear in the text.
- References should be cited in numerical order, the numbers being placed in parentheses.
- Citations of personal communications and unpublished data should be avoided unless absolutely necessary. When used, such citations should appear with initials in the text only, e.g., ("E.D. Smith, personal communication"), and not in the reference list.

References

Number in the order in which they appear in the text.

- Abbreviate titles of periodicals according to the style of the Index Medicus.
- Follow the format (arrangement, punctuation) shown below:
- Journal Articles:
Geysen H.M., Barteling S.J., and Meloen R.H., Proc Natl Acad Sci USA 82, 178–182, 1985.
(Please list all authors, do not use "et al."; do not add extraneous punctuation.)
- Chapter in a Book:
Davidson A. and Rixon F. in Becker Y. (ed). Recombinant DNA Research and Viruses. Martinus Nijhoff Publishing, Boston, 1985, pp. 103–124.
- Book:
Becker Y., Molecular Virology. Martinus Nijhoff Publishing, Boston, 1983, p. 26.

Tables

Tables should supplement, not duplicate, the text.

- Tables should be numbered consecutively in arabic numerals in order of appearance in the text, and typed on separate pages.
- Abbreviations used in a table should be footnoted (use lowercase letters in italics) and explained below the table in the order in which they appear in the table, if they have not been previously used. Any material that is not self-explanatory should also be footnoted and explained.

Figure legends

Be sure that legends and figures correspond.

- Identify all abbreviations used in a figure at the end of each legend, if the abbreviation has not been used in the text.

Figures

- Submit one glossy print 13 cm x 18 cm (5 x 7") and three photocopies of each figure. If the photocopies are not adequate for evaluation, as may be the case for photomicrographs, submit three glossy prints.
- On the back of each print, indicate figure number, senior author's surname, and top of illustration; all of this should be written lightly with soft, black pencil.
- Submit written permission from author(s) and publisher for any figure which has been published previously.
- Do not use clips on prints; submit them in an envelope backed by cardboard.
- Any lettering or scale of measurement used in an illustration must be large enough to be legible in the event of half-size reduction.
- Do not send original art-work.
- Computer generated data (sequences, computer graphics) must be printed with a quality printer and a new ribbon, and should be camera-ready.
- Color can be used without charge for the electronic edition of the journal but will appear in the printed version of the journal at the author's expense. The cost for color reproduction in the printed journal is \$1,150.00 per article, charged to the author.

Short Communications (3 pages)

Letters to the Editor (1/2–1 page); Follow the general rules laid down above. A separate title page and abstract page are required. One table or figure may be included if required; if references are needed, they should follow the format given above. The full names and full addresses of the writers should be on the title page.

Submission of sequence data to GenBank: When submitted manuscripts include or describe original nucleotide or amino acid sequence data, the sequence should be submitted to GenBank and an accession number obtained from GenBank to be included at the proof stage.

Instructions on how to submit data may be found in the printed data submission form made available by our editorial offices or the staff at GenBank (see address below), and in an on-line version of the form available via electronic mail from gb-sub%life@lanl.gov or as an editable ASCII file on 5 1/4" or 3 1/2" DOS and Apple Macintosh floppy diskette.

An accession number will be sent to you by GenBank within seven days (48 hours, if received via electronic mail) once a submitted sequence has been received, processed, and the annotation accompanying it deemed complete and internally consistent with the sequence data. The sequence data should be submitted in computer readable form. Submitted manuscripts containing sequence data should include the footnote: "The nucleotide sequence data reported in this paper have been submitted to the GenBank nucleotide sequence database and have

been assigned the accession number XNNNNN." This footnote should appear on the title page of the manuscript.

You may contact GenBank for further information, help or submissions at:

genbank@lanl.gov (electronic mail)
gb-sub@lanl.gov (electronic mail, submissions only)

(505) 665-2177 (U.S.A. Telephone number)
GenBank (postal service)
Mail Stop K710
Los Alamos National Laboratory
Los Alamos, NM 87545
U.S.A.

All non-electronic mail submissions (floppy disk, tapes and printed copy) should be sent to the above address. If you encounter problems with any aspect of the sequence submission process, the staff at GenBank will be happy to assist you or identify someone in your locale who has agreed to facilitate sequence submission to GenBank.

Style Manuals

The following two books are recommended as guides in writing scientific papers; they are particularly useful in providing standard abbreviations for measurements and other scientific terms:

- CBE Style Manual: prepared by the Committee on Form and Style of the Council of Biology Editors, published by the American Institute of Biological Sciences, Arlington, Virginia, 1978.
- Writing Scientific Papers in English; O'Connor M., Woodford F.P. (eds.). Elsevier, Amsterdam/Oxford/New York, 1976.

The following book is an extremely valuable general, nonscientific style manual:

The Elements of Style. Strunk W. Jr., White EB, MacMillan, New York, 1972.

Proofing

Please be sure to include your e-mail address on your paper. If your paper is accepted, we will provide proofs electronically. Your cooperation is appreciated. The proofread copy should be returned to the Publisher within 72 hours.

Copyright

Authors will be asked, upon acceptance of an article, to transfer copyright of the article to the Publisher. This will ensure the widest possible dissemination of information under copyright laws. Open access articles (an option available for authors, against payment of an Article Processing Fee via the Springer Open Choice program) do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, they agree to the Springer Open Access Licence. Details about the program and a link to the Open Access Licence can be found on the Springer Open Choice web pages: www.springer.com/openchoice

Offprints

Each group of authors is entitled to 50 free offprints of their paper. Additional offprints may be ordered through the offprint form provided with the proofs.

Springer Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer now provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springers online platform SpringerLink. To publish via Springer Open Choice, upon acceptance please visit the link below to complete the relevant order form and provide the required payment information. Payment must be received in full before publication

or articles will publish as regular subscription-model articles. We regret that Springer Open Choice cannot be ordered for published articles.
www.springer.com/openchoice