

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

JANAINE CAVALCANTI CARVALHO

**EXPRESSÃO INTRA E EXTRACELULAR DA PROTEÍNA L1 DE HPV
16, A PARTIR DA CONSTRUÇÃO pPICZAH16 pPICZA α H16, EM
CÉLULAS DE *Pichia pastoris*.**

**RECIFE
2011**

JANAINE CAVALCANTI CARVALHO

**Expressão do gene L1 selvagem de HPV16 em
Pichia pastoris pelas vias intra e extracelular por
meio de vetor integrativo**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Inovação
Terapêutica da Universidade Federal de
Pernambuco, para a obtenção do Título de
Mestre em Inovação Terapêutica.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas

**RECIFE
2011**

Carvalho, Janaine Cavalcanti

Expressão intra e extracelular da proteína L1 de HPV 16, a partir da construção PpicZal1h16 pPICZA α L1H16, em células de *Pichia pastoris*/ Janaine Cavalcanti Carvalho. – Recife: O Autor, 2011.

77 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Antonio Carlos de Freitas

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

Inclui bibliografia

- 1. Papilomavírus humano 2. Leveduras 3. Proteínas I. Freitas, Antonio Carlos de II. Título.**

579.2445

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2012-097

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: CARVALHO, Janaine Cavalcanti

Título: Expressão do gene L1 selvagem de HPV16 em *Pichia pastoris* pelas vias intra e extracelular por meio de vetor integrativo

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica

Aprovada em: 07/10/2011

Banca Examinadora

Prof(a). Dr. Antonio Carlos de Freitas

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

Prof(a). Dr. Neide Santos

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

Prof(a). Dr. Paulo Roberto E. Souza

Instituição: Universidade Federal Rural de Pernambuco

Assinatura: _____

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

REITOR

Prof. Dr. Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE-REITOR

Prof. Dr. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Profa. Dra. Ângela Maria Isidro Farias

VICE- DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Profa. Dra. Silvia Regina Arruda de Moraes

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

Profa. Dra. Suely Lins Galdino

**VICE- COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

Profa. Dra. Ana Cristina de Almeida Fernandes

Se você tiver grandes sonhos...
Seus erros produzirão crescimentos
Seus desafios produzirão oportunidades,
Seus medos produzirão coragem (Augusto Pury)

AGRADECIMENTOS

É difícil descrever, em palavras, os sentimentos ao finalizar a dissertação, o qual foi um processo de amadurecimento pessoal, profissional e acadêmico. Em meio a muitas sensações vivenciadas nesta fase está a certeza da conquista de mais um ideal, o qual só foi possível com muita determinação, perseverança e apoio de muitas pessoas importantes, sem as quais este trabalho não seria concluído.

A Jesus Cristo, fonte de vida e salvação para o mundo. Dedico a Ti, por ter derramado suas bênçãos sobre mim, e permitiu-me essa vitória em minha vida, pois, “Tudo posso Naquele que me fortalece”

Aos meus pais Joana Darc e José Carlos, exemplo de honestidade e determinação, educaram-me e ensinaram-me os valores éticos e humanos ao longo da vida. Essas pessoas com firmeza guiaram-me e incentivaram-me a prosseguir com humildade, respeito e perseverança. As minhas irmãs Jessyca e Jennyfe, meus pedacinhos do céu, sem as quais eu não seria completa. Meu eterno agradecimento a vocês que mesmo com as dificuldades e a saudade não pouparam esforços para realização deste sonho...

Gostaria de deixar aqui os meus mais sinceros agradecimentos, em especial, ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio Carlos, com quem eu despertei para “gostar” do HPV, por acreditar em mim, pelos ensinamentos, conselhos, pelas valiosas sugestões, pela amizade e pela sua preocupação em formar profissionais capacitados e éticos.

Aos meus amigos do LEMTE ... faltam palavras para descrever as pessoas que contribuíram para meu crescimento e amadurecimento profissional e pessoal ao longo desses anos. A Jack (gracinha1) pela amizade, sempre convicta de seus ideais, pelo seu jeito sincero e acolhedor, pelos momentos partilhados e ajuda mútua que tivemos ao longo desses anos, e por todas as guloseimas divididas, Carol (gracinha 2) por sempre me fazer sorrir mesmo quando o mundo estava uma bagunça, Elyda (queridinha) por toda a amizade e conselhos (mulherrrrrr) por sempre está presente mesmo distante, Eliane exemplo de garra, perseverança e simplicidade, com quem tive o imenso prazer de conviver durante esses anos, pelo apoio incondicional. Obrigada Elite!!! A Pávla uma menina pequena e loira, sempre alegre e brincalhona, pela sua forma extrovertida e compromissada de dividir conhecimentos, por sempre se preocupar comigo e apoiar. A Barbara (Barbarela) por toda ajuda prestada, pelas conversas, por toda motivação. A Angélica (Angel) por toda a força que me deu e incentivo para conseguir meus objetivos, a Karen (renren) que mesmo estando a pouco tempo conosco nunca mediu esforços para me ajudar, Karin (rinrin) e Luciana que sempre me acompanharam mesmo na distancia sempre se preocupando como o andamento e sempre disponível para qualquer ajuda. A Cybelle (*in memoriam*) pelo exemplo de determinação, a Nayara (Nay) que com seu jeito calmo consegue tranquilizar qualquer pessoa. Ao Marcelo (Tchetchinha) amigo e cúmplice de longas datas, companheiro desde o início, por toda sabedoria dividida, pelas risadas estomacais e por todo o apoio, esse menino é uma enciclopédia!!!! Ao André, prestativo e atencioso, pelos tapinhas na cabeça enquanto eu estava trabalhando mas acima de tudo pela ajuda e aprendizagem científica compartilhada, a Filipe (Los) pela presteza e simpatia, que de forma solícita sempre me atenderam, e por suas pérolas (no fim tudo dá certo, e se ainda não deu certo é porque não chegou o fim), a Breno (queridinho) por suas peripécias, grande figura!! A Billy (Boy) por toda torcida e ajuda de forma efetiva, ao Erinaldo que chegou no finalzinho mas que mesmo assim ainda deu uma mãozinha. A todos os que passaram pelo laboratório que mesmo de longe me davam força dizendo para eu pensar positivo que tudo iria dar certo.

Aos meus amigos Thaisa, Wayde, Monique, Kyllderes, Liu, Lícia, André Ribas por toda a força que me deram e por me acompanhar sempre na alegria e na tristeza, por não deixar de torcer por mim um só minuto, sempre pensando positivo e me fazendo acreditar, por me incluir em suas famílias.

Aos funcionários do Departamento de Genética, Dona Zizi e Seu Romildo, sempre prestativos.

A coordenadora do PPGIT, exemplo de otimismo e maneira alegre de ser e lidar com a causa acadêmica, pela atenção, carinho e sorriso sempre presentes, e pela sincera e admirável dedicação.

RESUMO

CARVALHO, J.C.. Expressão do gene L1 selvagem de HPV16 em *Pichia pastoris* pelas vias intra e extracelular por meio de vetor integrativo. 2011. 76f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

O câncer cervical é a segunda maior causa de mortes entre mulheres no mundo. Esta neoplasia maligna está relacionada com a presença do Papilomavírus Humano (HPV), sendo o tipo 16 responsável por 60% dos casos. O HPV infecta o tecido epitelial mucoso ou cutâneo e é responsável pelo aparecimento de verrugas ou papilomas benignos que tendem a regredir naturalmente na maioria dos casos, mas que ainda assim causam prejuízos aos indivíduos infectados e aos sistemas públicos de saúde, sendo a papilomatose considerada a doença sexualmente transmissível mais prevalente no mundo, tornando essencial a aplicação de estratégias de combate à esta infecção. Vacinas baseadas em *Virus-like particles* (VLPs), formadas a partir das proteínas capsidiais L1 e L2 - que induzem a formação de anticorpos neutralizantes - já estão comercialmente disponíveis. Contudo, possuem um preço elevado considerando, principalmente, os países em desenvolvimento. A imunidade humoral é direcionada contra os epítomos conformacionais da proteína L1 que compõe 90% da estrutura capsidial. Para produção das VLPs os genes das proteínas capsidiais são expressos em sistemas heterólogos e o produto resultante é purificado. A escolha de um sistema mais simples e barato para essa expressão é fundamental para a redução do custo das vacinas. Uma alternativa promissora é a levedura *Pichia pastoris*. Este trabalho propôs a produção extracelular e intracelular da proteína L1 de HPV16, que teve seu gene inserido no vetor pPCIZA α e pPCIZA, respectivamente. As construções pPICZA α L1H16 e pPICZAL1H16 foram integradas no genoma da levedura *Pichia pastoris* e a transcrição do gene L1 e a expressão da proteína foram confirmadas por RT-PCR e imunodeteção em Dot Blot. A busca de uma melhor expressão da proteína L1 de HPV 16, em células de *P. pastoris*, é uma etapa essencial na busca do desenvolvimento de uma estratégia vacinal mais economicamente viável baseada em VLPs.

PALAVRAS-CHAVE: Papilomavírus Humano, Proteína L1, Sistema de Expressão, VLP, *Pichia pastoris*.

ABSTRACT

CARVALHO, J.C.. Expression of HPV16 L1 gene wild in *Pichia pastoris* by intra-and extracellular pathways through integrative vector. 2011. 76f. Dissertation (Master). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

The Cervical cancer is the second leading cause of death among women worldwide. This malignancy is related to the presence of human papillomavirus (HPV) being the type 16 responsible for 60% of the cases. HPV infects cutaneous or mucosal epithelial tissue and is responsible for the appearance of benign papillomas or warts that tend to regress naturally in most cases, but still cause damage to infected individuals and public health systems, with papillomatosis being considered the most prevalent sexually transmitted disease worldwide, making essential to implement strategies to combat this infection. Vaccines based on viruslike particles (VLPs), formed from the capsid proteins L1 and L2 - that induce the formation of neutralizing antibodies - are already commercially available. However, they are expensive considering mainly the developing countries. Humoral immunity is directed against conformational epitopes of the L1 protein which represents 90% of the capsid structure. In order to produce VLPs the capsid protein genes are expressed in heterologous systems and the resulting product is purified. The choice of a simpler and cheaper system for this expression is fundamental to reduce the cost of vaccines. A promising alternative is the *Pichia pastoris* yeast. This paper proposed the extracellular and intracellular generation of HPV16 L1 protein, which had its gene inserted into the vectors pPCIZA α e pPCIZA, respectively. The pPICZA α L1H16 and pPICZAL1H16 plasmids were integrated into the *Pichia pastoris* yeast genome and the L1 gene transcription and protein expression were confirmed by RT-PCR and immunodetection in Dot Blot. The search for better expression of HPV 16 L1 protein, in cells of *P. pastoris*, is an essential step in the quest to develop a more economically viable vaccine strategy based on VLPs.

KEY-WORDS: Human Papillomavirus, L1 protein, Expression System, VLP, *Pichia pastoris*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 O Papilomavírus humano (HPV)	3
2.2. Classificação dos Papilomavírus	6
2.3 Biologia Molecular e Ciclo Viral do Papilomavírus Human	7
2.4 Transformação pelo HPV	11
2.5 HPV x Câncer cervical	16
2.6. Vacina preventiva contra o Papillomavirus VLPs.	19
2.7 Sistema Heterólogo de expressão	21
2.8 Levedura <i>Pichia pastoris</i>	23
2.9 Vetor de Expressão pPCZA e pPCIZ α	25
3. OBJETIVOS	28
3.1. Geral	28
3.2. Específicos	28
4. MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 Material	28
4.2 Métodos	28
4.2.1 Construções pPICZA α L1H16 e pPICZAL1H16	29
4.2.2 Transformação da levedura <i>Pichia pastoris</i> com pPICZAL1H16 e pPICZA α L1HPV16	30
4.2.3 PCR de colônia	30
4.3 Análise da expressão da proteína L1	31
4.3.1. Indução dos clones para expressão do gene L1	31
4.3.2 Processamento das amostras protéicas (recuperação da proteína L1)	31
4.3.3. Extração de RNA total dos recombinantes de <i>P.pastoris</i>	32
4.3.4 Síntese de cDNA e RT-PCR para análise da transcrição do gene L1	32
4.3.5 Avaliação da expressão de L1 através de Dot Blot	33
5. RESULTADOS	34
5.1 Análise dos transformantes da células de <i>P. pastoris</i> recombinantes X33/pPICZA α L1H16	34
5.1.1 Análise de integração das construções pPICZA α L1H16 e pPICZAL1H16 ao genoma da levedura por PCR de Colônia	34
5.1.2 Análise da transcrição do gene L1 por RT-PCR	35
5.1.3 Detecção da produção da proteína L1 por SDS-PAGE	36
5.1.4 Detecção da produção da proteína L1 por Dot Blot	37
6. DISCUSSÃO	38
7. CONCLUSÃO	41
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	42
9. ANEXO.	54

1. INTRODUÇÃO

O câncer cervical é a segunda causa mais frequente de morte em mulheres em todo o mundo e 99% dos cânceres cervicais são causados por infecção com papilomavírus humano (HPV) (Pisani *et al.*, 1990; Schadlich *et al.*, 2009). A prevalência do HPV, em geral, aumentou significativamente de 85,9% em estudos publicados de 1990-1999 para 92,9% em estudos publicados entre 2006 e 2010 (Li *et al.*, 2011). Mais de 120 genótipos diferentes de HPV têm o potencial de infectar mucosas e células epiteliais cutâneas. Os 40 genótipos de HPV que infectam mucosa são classificados em tipos de baixo e alto risco, dependendo de sua associação com a neoplasia intra-epitelial cervical e o câncer (Bernard *et al.*, 2010).

Os HPVs dos tipos 16 e 18 são associados ao maior risco de câncer cervical registrados no mundo. Há evidências de que a infecção pelo HPV tem aumentado nas últimas décadas, tornando hoje a papilomatose humana a doença sexualmente transmissível mais prevalente no mundo. A prevalência de HPV16, incluindo as infecções simples e múltiplas, aumentou significativamente de 51,8% em 1990-1999 para 60,0% no período de 2006-2010, enquanto que em relação ao HPV18 a prevalência não alterou significativamente (Li *et al.*, 2011).

O câncer de colo uterino ainda é um problema de saúde pública nos países em desenvolvimento, assim como é o principal fator de risco para o câncer cervical, o segundo maior causador de mortes em mulheres, principalmente naquelas de nível social e econômico baixo. Os custos econômicos e sociais das infecções pelo HPV são elevados, sendo a pesquisa e o desenvolvimento de métodos profiláticos e terapêuticos importantes para o controle dessa doença.

Atualmente, existe grande preocupação com a melhoria do diagnóstico das infecções por HPV, visto que, em países em desenvolvimento, a triagem citológica vem falhando em promover a redução na incidência de câncer cervical. Dessa forma, o desenvolvimento de vacinas para prevenir infecções pelo HPV tem se tornado uma questão fundamental. A produção de uma vacina eficiente contra HPVs de alto risco pode levar a uma grande redução nas taxas de incidência e mortalidade do câncer do colo de útero.

Recentemente, duas vacinas profiláticas, Gardasil® (Merck Sharpe & Dohme) e Cervarix® (GlaxoSmithKline; GSK), foram introduzidas no mercado. Estas são

baseadas na principal proteína estrutural do capsídeo viral, L1, a qual pode se rearranjar em partículas semelhantes ao vírus, VLPs (virus-like particles) [Kimbauer *et al.*, 1992]. Estas vacinas são produzidas artificialmente através da utilização de diferentes sistemas de expressão heteróloga, (Noar, Roy, 2003). Estas estruturas são morfológica e imunologicamente similares a vírions autênticos, exceto por não conterem o genoma viral e não serem infecciosos (Breiturd e Coursaget 1999).

A levedura metilotrófica *Pichia pastoris* representa uma opção de sistema heterólogo, eficiente e de baixo custo para a produção de altos níveis de proteínas recombinantes e portanto, passível de ser estabelecido como plataforma para o desenvolvimento de VLPs dos diferentes tipos de HPVs relacionados a problemas de saúde pública. Neste trabalho propomos avaliar a produção da proteína L1 do HPV16 em células da levedura *Pichia pastoris* pelas vias intra e extracelular, utilizando vetor integrativo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O Papilomavírus humano (HPV)

O papilomavírus foi inicialmente classificado como um membro da família *Papovaviridae*, juntamente com o poliomavírus e o SV40 (vírus símio 40). Porém, o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (CITV) considerou que os papilomavírus pertencem a uma família taxonômica distinta, *Papillomaviridae* (De Villiers *et al.*, 2004).

Os papilomavírus são espécie-específicos e infectam mamíferos, répteis e pássaros (Doorbar, 2005; Scheurer *et al.*, 2005). Como exemplos podem ser citados aqueles que infectam bovinos - BPV (*Bovine Papillomavirus*), coelhos – CRPV (*Cottontail Rabbit Papillomavirus*) e cães - COPV (*Cannine Oral Papillomavirus*) (Ferreira *et al.*, 2002; Ozbun, 2002).

Os HPVs provocam o aparecimento de verrugas (Figura 1) e são especialmente importantes por causarem câncer cervical (cerca de 6% de todos os cânceres humanos) Eles infectam o epitélio e são mantidos na camada basal das células como plasmídeos extracromossômicos que se replicam em etapas sincronizadas com os cromossomos. As partículas virais infecciosas são geradas nas camadas epiteliais mais externas à medida que as células começam a diferenciar-se e antes que sejam eliminadas da superfície (Alberts *et al.*, 2004). A expressão das proteínas virais é fortemente regulada e dependente da diferenciação celular (Scheurer *et al.*, 2005).



Figura 1: Papilomas no trato genital feminino (Pérez-Lopes, 2003)

Existem duas classificações para os HPVs. A primeira relaciona-se com o tropismo do vírus pelo tipo de epitélio podendo ser dividido em: cutaneotrópicos, tipos virais capazes de infectar a epiderme; e mucosotrópicos, tipos virais capazes de infectar

mucosas em geral. Os mucosotrópicos podem ainda ser classificados em baixo risco e alto risco ou oncogênicos. (tabela 1) (Villa, 1998).

CLASSIFICAÇÃO	TIPOS
Alto risco estabelecido	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82
Alto risco provável	26, 53, 66
Baixo risco estabelecido	6, 11, 13, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 62, 70, 72, 74, 81

Tabela 1. Classificação epidemiológica dos tipos de HPV.

Mulheres portadoras dos tipos 16 e 18 apresentam significativo risco de desenvolverem processo maligno na cérvix uterina quando comparadas a infecção por outros tipos de HPV, sendo que o tipo 16 ocorre em aproximadamente 80% dos tumores HPV positivos (Pinto, 2002; Jordão, 2003; Carvalho *et al.*, 2005; Mahdavi, *et al.*, 2005). A correlação entre tipos de HPV com a formação de lesões malignas ficou mais evidente após os estudos nos quais se identificou a presença do DNA viral em 84 a 99,7% dos cânceres cervicais (Bosch *et al.*, 2002; Walboomers *et al.*, 1999)

Os HPVs 6 e 11 são relacionados com a indução de condilomas exofíticos que podem ocorrer em região vulvar, vaginal, anal, peniana, orofaríngea, cavidade bucal e laringe, sendo detectados nas lesões intraepiteliais de baixo grau e considerados de baixo risco (Figura 2) (Gompel *et al.*, 1990).

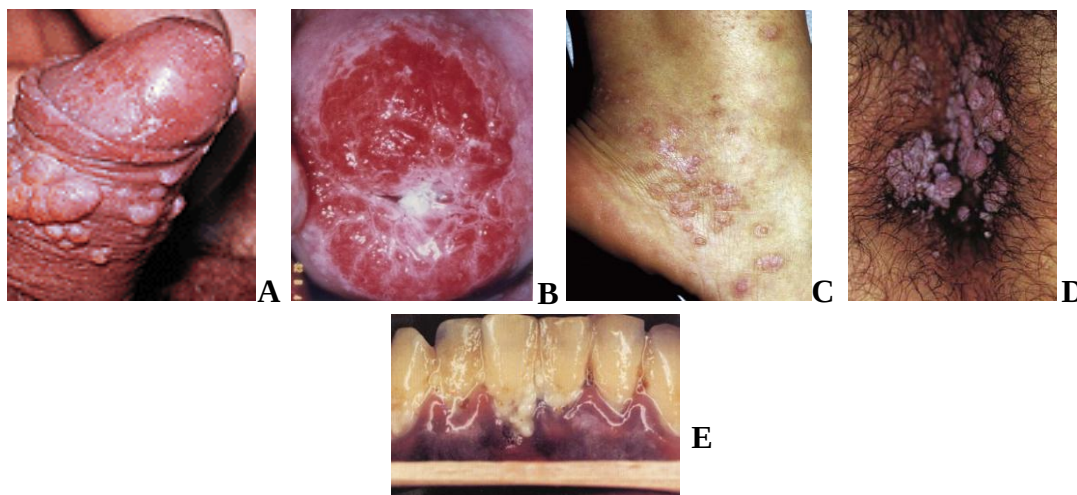


Figura 2. Lesões clínicas provocadas por HPV. (A) Papilomas na região peniana (Pérez-Lopes, 2003); (B) Colo do útero com lesão (Saloney, 2007); (C) Verrugas cutâneas (Douvier & Dalac, 2004);

(D) Papilomas na região anal, (Douvrier & Dalac, 2004);(E) Papilomas na mucosa oral (Douvrier & Dalac, 2004).

Li *et al.*, (2010) realizaram uma meta-análise dos dados de prevalência HPV publicados entre 1990 e 2010, incluindo um total de 243 estudos e 30.848 ICC (Câncer Cervical Invasivo). O HPV16 foi o tipo mais comum em todas as regiões (variando de 52% na África e 67% na Europa Ocidental / Central Ásia), e o HPV18 o segundo tipo mais comum (variando de 14% na Ásia Oriental e 20% na Oceania). A prevalência de HPV16, incluindo ambas as infecções simples e múltiplas, aumentou significativamente de 51,8% em 1990-1999 para 60,0% em 2006-2010. Na América do Sul a prevalência foi de 91,1%. (Figura 3).

No Brasil, o HPV 16 é o mais prevalente em todas as regiões, todavia, há variações em relação aos outros tipos. O tipo 18 é o segundo mais prevalente nas regiões Norte, Sudeste e Sul, enquanto que o 31 e 33 são os segundos mais prevalentes nas regiões Nordeste e Central (Rabelo-Santos *et al.*, 2003).

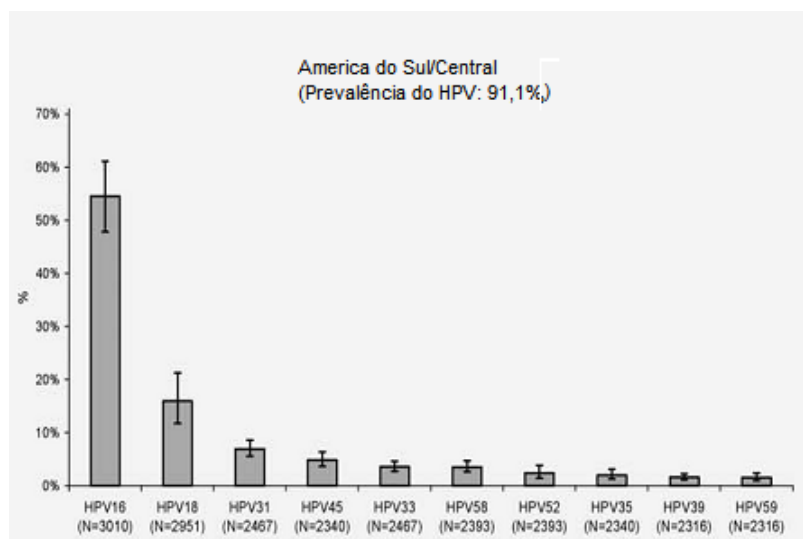


Figura 3: Os dez mais frequentemente tipos de papilomavírus humano (HPV) detectado em câncer cervical invasivo (CCI) 1990-2010 na America do sul. (Li., *et al*, 2010)

A associação do HPV com alguns tipos de neoplasias foi detectada, primeiramente, em cânceres do trato anogenital, incluindo cérvix, vulva, vagina, pênis e ânus. Além destes, estão também associados ao HPV, alguns tipos de cânceres de cabeça, pescoço (Syrjanen, 2005) e pele (Sterling, 2005).

2.2. Classificação dos Papilomavírus

Os papilomavírus são classificados como membros da família *Papillomaviridae*, oficialmente reconhecida pelo *International Committee on the Taxonomy of Viruses* (ICTV) (De villiers, *et al.*, 2004). A classificação antiga na família *Papovaviridae*, junto com os poliomavírus foi abandonada. Desde os estudos de Zur Hausen (Zur Hausen, 1976), a classificação dos tipos de HPV era feita baseando-se na hibridização, e a designação era baseada na comparação das sequências de nucleotídeos reconhecidas por endonucleases de restrição, que promovia a clivagem do DNA do vírus de forma característica para cada tipo em questão (Pfister, 1989).

A cada novo tipo de papilomavírus era atribuída uma denominação numérica conforme a ordem de sua identificação. Para ser considerado um novo tipo o DNA viral deveria ter uma sequência de bases nitrogenadas com menos de 50% de homologia das demais sequências conhecidas e os que apresentavam uma homologia maior que 50% e menor que 100% eram considerados subtipos (Fisher, 1994). Mais recentemente, um critério de classificação determinava que um novo tipo de HPV só fosse reconhecido caso existisse uma diferença de mais de 205pb nas sequências de nucleotídeos das regiões E6, E7 e L1, comparando-se com outros tipos previamente identificados. Uma diferença menor que 2% entre estas sequências seriam consideradas como subtipos (Stewart *et al.*, 1996)

Com o surgimento da técnica de sequenciamento genômico, a taxonomia está sendo voltada para completa identificação da sequência nucleotídica do DNA viral. Cerca de 100 tipos de HPV foram totalmente sequenciados, porém, muitos ainda estão sem classificação (De villiers, *et al.*, 2004).

Segundo estudos de patogenia, os tipos de HPV são divididos em grupos de alto-risco e baixo risco com diferentes sítios de replicação, porém, a análise da árvore filogenética propõe que os HPVs sejam classificados em supergrupos A,B e E, segundo o alinhamento da sequência de base. Dentro do supergrupo A, os tipos 16, 31, 33, 35 e 58 (grupo A9), 18, 39, 45, 59, 68 e 70 (grupo A7), 26, 51 e 81 (grupo A5), e 53, 56 e 66 (grupo A6), são aqueles tidos como de alto-risco. Ainda no supergrupo A estão incluídos os tipos 6, 11 e 44 (grupo A10), 34 e 73 (grupo A11), 40 e 43 (grupo A8), 42 (grupo A1), 61, 72, 81, 83, 84 e CP6108 (grupo A3), e 57 (grupo A4) que são patogenticamente classificados como tipos de baixo-risco (Muñoz *et al.*, 2003). Embora os vírus do supergrupo A (também conhecidos como papilomavírus alfa) incluam membros primários cujo tropismo está dirigido para as mucosas, há representantes com replicação no tecido cutâneo, como os HPV2 e HPV10, apresentando ciclos de vida

característicos que não se estendem para evolução de outros grupos de papilomavírus Alfa (Myers *et al.*, 1994; Middleton *et al.*, 2003; Phe *et al.*, 2002; De villiers, *et al.*, 2004).

O supergrupo B contém inúmeros papilomavírus humanos. Dentre os tipos presentes destaca-se tipos oportunistas, como o HPV5 do subgrupo B1 (também conhecido como papilomavirus Beta). No subgrupo B2, classificam-se tipos como HPV 4 (também conhecido como papilomavírus Gamma), causador de verrugas cutâneas semelhantes aquelas causadas pelos papilomavírus do supergrupo A. Os demais HPVs estão contidos no supergrupo E sendo classificados com Um e Nu-papilomavirus. Dentre eles destaca-se o HPV1 por ser o mais bem estudado deste grupo, causando verrugas palmares semelhantes aquelas causadas pelo HPV2 do supergrupo A. (Myers *et al.*, 1994; De villiers, *et al.*, 2004).

2.3 Biologia Molecular e Ciclo Viral do Papilomavírus Humano

Os Papilomavírus Humanos são epiteliotrópicos e têm cerca de 55nm de diâmetro. Apresentam um genoma com DNA fita-dupla, circular, composto de 7200 a 8000 pares de base com peso molecular de 5.2×10^6 daltons. Este possui três regiões identificadas: uma região precoce (*early*, E) que codifica proteínas envolvidas na replicação e transcrição do DNA viral assim como da transformação celular hospedeira; uma região tardia (*late*, L) contendo dois genes – L1 e L2 – os quais codificam proteínas do capsídeo viral e uma longa região de controle (LCR) ou região de regulação (URR) que apresenta sequências ativadoras e repressoras da transcrição viral, além da origem de replicação, variando de 400 pares de base a 1 Kb, localizadas entre os genes L1 e E6 (Alvarenga, 2000; Burd, 2003; Kisseljov, 2000; Silva *et al.*, 2003; Stanley, 2001) (Figura 4).

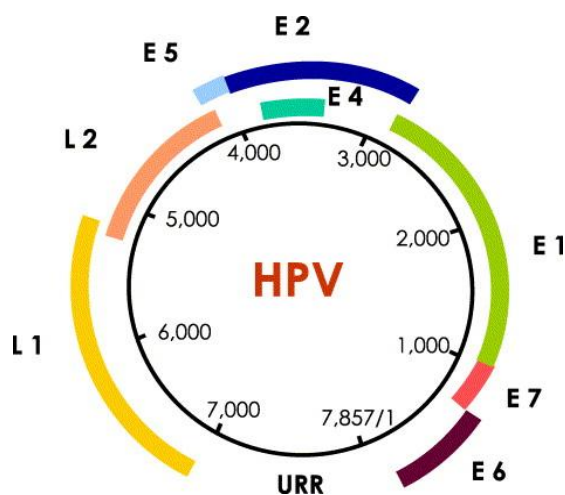


Figura 4. Genoma do HPV. DNA circular de aproximadamente 8 Kb, mostrando o arranjo dos genes não estruturais (E) e estruturais (L), e a região de regulação (URR) (Muñoz *et al.*, 2006).

O capsídeo icosaédrico é formado a partir da expressão dos genes da região tardia, que compõe aproximadamente 40% do genoma viral e é composta pelas ORFs (*open reading frames*) L1 e L2. A proteína L1 compõe 90% do capsídeo, com peso molecular aparente de 54 – 58 kDa, formando pentâmeros que se associam à proteína L2, com peso molecular aparente de 68 – 76 kDa (da Silva *et al.*, 2001), a qual é necessária para a organização do genoma (Plesa *et al.*, 2003). O capsídeo contém 360 cópias da proteína L1 e 12 cópias da proteína L2, organizados em 72 capsômeros (figura 5) [Modis *et al.*, 2002].

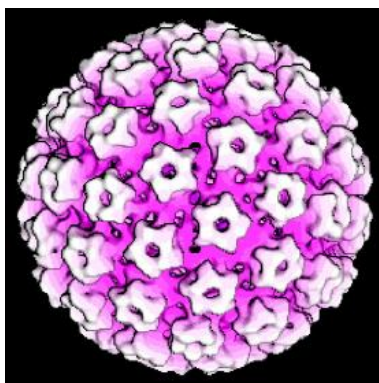


Figura 5. Morfologia do papilomavírus. (adaptado de Stanley *et al.*, 2006).

Entre as proteínas não estruturais estão: a E1 e a E2 que participam da replicação e transcrição viral, a E4 que parece contribuir indiretamente para a replicação do genoma viral, além de auxiliar na liberação dos vírions, porque age no citoesqueleto, e a E5, E6 e E7 designadas como oncoproteínas devido à capacidade de transformar células induzindo o aparecimento de tumores. A E7 une-se com a proteína Rb (proteína do retinoblastoma) causando proliferação celular incontrolada. Quando a proteína viral E6 liga-se a p53 (proteína responsável pela apoptose), esta é degradada causando a perda da função de reparo do DNA e impedindo a apoptose (Franco, 2005). A afinidade de E6/p53 e E7/pRB variam de acordo com a menor ou maior oncogenicidade do vírus. Acredita-se que as oncoproteínas dos tipos 16 e 18 formem complexos de alta afinidade com a p53 e pRB resultando numa maior agressividade viral (McLachlin & Crum, 2001).

O DNA viral dentro da célula do hospedeiro pode assumir duas formas: a epissomal e a integrada. Na forma epissomal, o DNA viral permanece circular no

núcleo da célula do hospedeiro, não estando integrado ao DNA da mesma. Essa forma é encontrada nas verrugas genitais e lesões de menor gravidade. Para a integração do genoma viral ao DNA da célula hospedeira, que ocorre nas lesões de maior gravidade, como o carcinoma “in situ” e invasivo, esse deve ser linearizado, pela quebra do DNA viral entre a região E1 e L1, resultando na ruptura ou perda do gene E2 (Pereyra & Parellada, 2003). Tal fato assume grande importância, pois a proteína E2 tem a função de regular negativamente a transcrição dos genes E6 e E7 (Berumen *et al.*, 1997).

Nas lesões cervicais não cancerosas, o genoma do HPV é encontrado exclusivamente na forma de epissomos. Porém, em carcinomas cervicais, os genomas de HPV de alto-risco são encontrados na forma integrada no DNA da célula hospedeira. A integração do DNA viral é uma etapa que acelera o processo de malignidade em câncer cervical, onde frequentemente ocorre a ruptura da região E2 (Jeon *et al.*, 1995).

O ciclo de replicação viral está diretamente relacionado ao processo de diferenciação celular epitelial do hospedeiro. O papilomavírus humano infecta as células basais do epitélio por meio de lesões presentes na mucosa escamosa. Uma vez nas células, a expressão dos genes virais é controlada e a replicação inicia-se em função da maturação epitelial (Figura 6). Este processo é associado com a expressão de genes estruturais tardios e a produção de capsídeos virais e/ou proteínas tardias (L1 e L2), na superfície epitelial. (Pinto, 2002; Fedrizzi *et al.*, 2004; Mahdavi *et al.*, 2005).

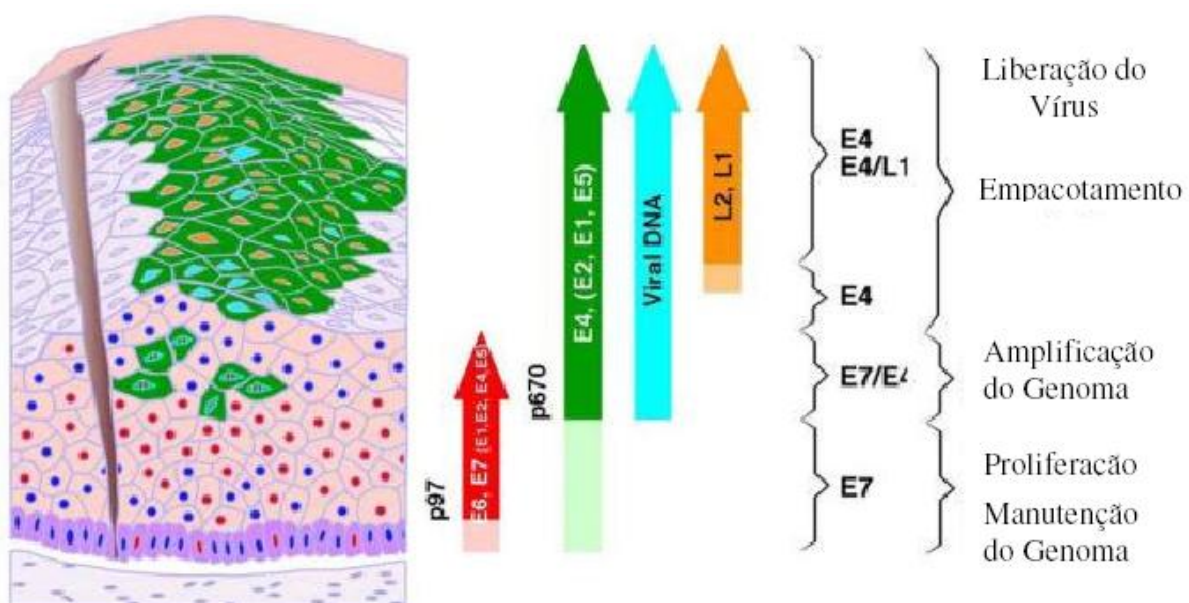


Figura 6. Ciclo de vida do HPV em relação à diferenciação celular. (adaptado de Zheng & Baker, 2006).

Durante a divisão celular, as células migram da camada basal para a região suprabasal e começam a se diferenciar. Os queratinócitos, por sua vez, terminam seu ciclo celular, logo que são destacados do pavimento membranar, e as células infectadas por HPV uma vez que atingem a camada suprabasal entram na fase S do ciclo celular (Doorbar, *et al.*, 1997). A entrada na fase S resulta na amplificação de genomas virais em mil cópias por célula (Figura 7). Paralelamente à amplificação do DNA, existe a síntese das proteínas E1 e E4 juntamente com proteínas do capsídeo (L1 e L2), resultando na formação dos vírions (Jeon, *et al.*, 1995).

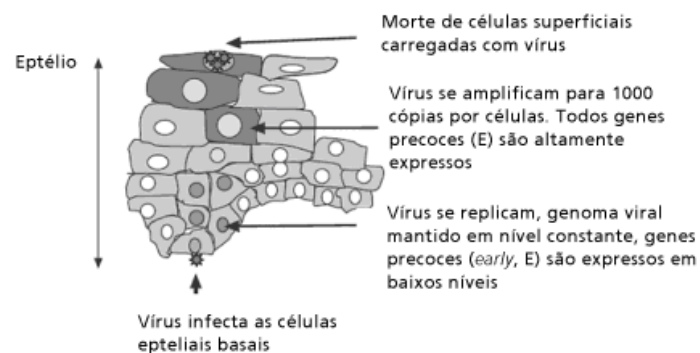


Figura 7. Ciclo de infecção do HPV. Entrada do vírus no tecido epitelial através de microtrauma e estabelecimento da infecção na camada basal (adaptado de Stanley, 2001 e Stubenrauch, *et al.*, 1999)

Nas infecções produtivas, o tempo entre a infecção e a liberação dos vírus é de aproximadamente três semanas, que corresponde ao tempo necessário para o queratinócito basal passar pela diferenciação completa e descamação. Não há morte citopática ou lise celular como consequência da replicação do HPV ou da liberação das partículas virais, visto que o queratinócito é uma célula destinada à descamação, longe dos sítios de vigilância imunológica. Sendo assim, a infecção por HPV não é acompanhada por inflamação e, assim, não há sinal de perigo óbvio para alertar o sistema imune sobre a presença do vírus. Isto pode resultar em infecção crônica, persistente (Stanley *et al.*, 2005). Estima-se que o tempo de infecção até o surgimento da NIC 3 (Neoplasia Intraepitelial Cervical de nível 3) oscile entre 1 e 10 anos (Nadal & Manzione, 2006), sendo a sua persistência advinda de sua maior habilidade de esquivar-se do sistema imune (Villa, 2003).

Existem certos fatores que podem influenciar diretamente a carcinogênese, relacionada com os elementos do HPV; por exemplo, os fatores imunológicos (resposta imune local, humoral e a AIDS), polimorfismo da proteína p53, tabagismo e contraceptivos orais são os principais adjuvantes do HPV no desenvolvimento da neoplasia intra-epitelial escamosa (Pinto *et al.*, 2002).

2.4 Transformação pelo HPV

O ciclo celular normal progride da seguinte forma: a célula permanece a maior parte do tempo na fase G1; quando então entra em processo de divisão celular e passa pela fase S (síntese de DNA); seguindo pela fase G2; e então dá início ao processo mitótico, fase M; após este episódio as células entram na fase G0, fechando o ciclo e estabelecendo um relativo repouso celular (Doorbar, 2005).

Os proto-oncogenes são responsáveis pela regulação do ciclo celular. Outras proteínas que atuam neste processo como a p15 e p16 bloqueiam componentes essenciais para a progressão do ciclo celular como CDK (*cyclindependent kinases*) impedindo o avanço do ciclo da fase G1 para S. Outros inibidores são pRB, p53 (Gross & Barrasso, 1999; Rivoire *et al.*, 2001).

Segundo Rivoire *et al.* (2006), mutações são capazes de modificar proto-oncogenes, tornando-os oncogênicos, causando multiplicação celular excessiva. Esta via se estabelece pelo fato de que essas mutações levam o proto-oncogene a expressar em excesso sua proteína estimuladora do crescimento ou a produzir uma forma mais ativa. Já os genes supressores tumorais contribuem para o desenvolvimento de câncer quando são inativados por mutações. Assim, modificações genéticas nestas células em processo de divisão podem superar estas defesas e contribuir para a formação do câncer.

As células humanas possuem mecanismos de controle da divisão celular. Um destes mecanismos de ação é a morte celular programada, chamada de apoptose, a qual ocorre quando componentes essenciais estão lesados ou o controle do sistema desregulado. O desenvolvimento de células tumorais implica em escape a este mecanismo (Rivoire *et al.*, 2001). A proteína p53 desempenha um papel fundamental na prevenção da tumorigênese, pois responde a estímulos potencialmente oncogênicos através da ativação de mecanismos protetores, como a parada do ciclo celular e a apoptose. Sabe-se que, na ocorrência de defeitos de DNA, p53 é secretada e interrompe o ciclo celular na fase G1. Esta parada permite que se efetue o reparo do DNA. Se for

bem sucedido, p53 ativa o gene *mdm2*, cujo produto liga-se à própria p53, liberando o ciclo celular. Se o reparo do DNA falhar, p53 ativa genes indutores de apoptose, notadamente *bax*, que se opõe naturalmente ao gene *bcl-2*, antiapoptótico (Cotran *et al.*, 2000; Berkson *et al.*, 2005).

A oncoproteína E6 do HPV é um polipeptídeo constituído por aproximadamente 150 aminoácidos, caracterizada pela presença de quatro segmentos Cys-X-X-Cys, os quais permitem a formação de duas pontes de zinco. Esses segmentos são estritamente conservados nas proteínas E6 em toda a família do HPV. Ainda não está claro se esses segmentos Cys-X-S-Cys são essenciais para permitir a ligação de E6 ao DNA da célula hospedeira. A proteína E6 do HPV possui várias propriedades biológicas importantes, dentre estas destaca-se a sua capacidade de ligação à proteína p53, a qual protege a integridade do genoma (Zur Hausen, 1996; Rapp Chen, 1998; Terai, 2001; Scully, 2002).

A associação de E6 com a p53 é medida por uma proteína celular adicional, denominada proteína associada a E6 (E6-AP). Uma vez a associação estabelecida, a proteína E6 estimula a degradação da p53. Esse processo mediado pela proteína E6 requer ATP e envolve o caminho proteolítico ubiquina-dependente. Essa ligação E6-p53 e posterior degradação da última impedem a ação supressora tumoral da p53 no núcleo celular, permitindo que as células afetadas falhem na parada do ciclo celular em G1, perpetuando o dano no DNA celular (Sugerman, 1997; Villa, 1997; Zur Hausen, 1999; Summersgill *et. al.*, 2000)

A interação da E6 com a p53 parece ser a principal causa da instabilidade cromossômica das células infectadas por HPVs de alto risco. Contudo, E6 também pode associar-se com as outras proteínas pró-apoptóticas, incluindo Bak e Bax (Zur Hausen, 1996;2000, Doobar, 2005). Em adição, a proteína E6 revela um marcado pleiotropismo na ligação com a proteína ligante de cálcio ERC55, com a proteína de adesão focal paxilina e com a proteína GAP (E6TP1). Essas interações podem produzir consequências funcionais substanciais nas células expressando E6 (Zur Hausen, 2000)

Ademais, E6 pode aumentar a atividade da telomerase, outro fator envolvido na carcinogênese (Zur Hausen, 1999; McMurray *et al.*, 2001;Scully, 2002). Destaca-se que a habilidade da E6 para ativar a telomerase não se correlaciona com sua habilidade para degradar a p53 (Rapp Chen, 1998). A presença da proteína E6 é considerada um fator predisponente para desenvolvimento de cânceres associados ao HPV (Doorbar, 2005) (Figura 8).

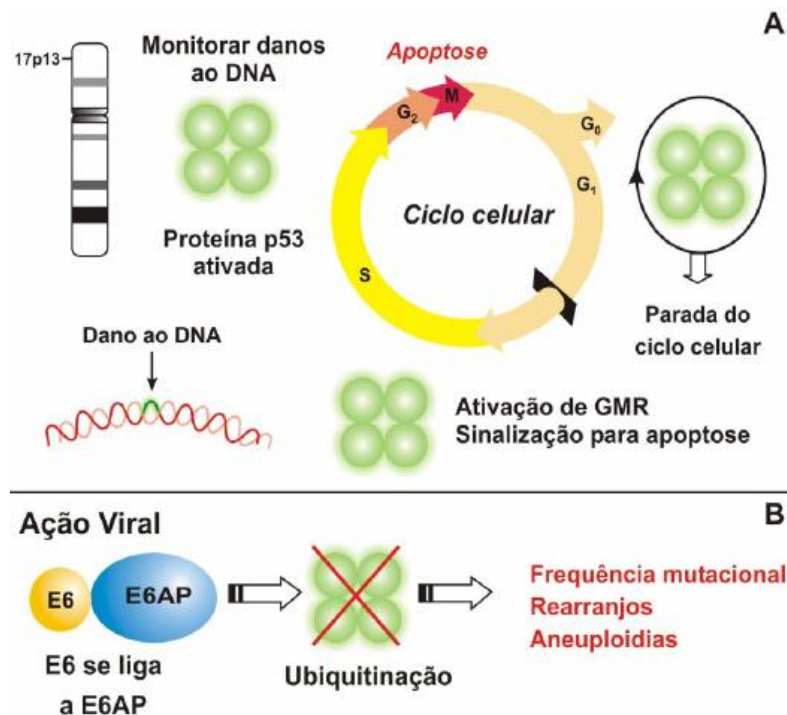


Figura 8. Esquema da interferência de E6 no ciclo celular. (A) atuação de p53 na célula, após ocorrência de dano no DNA. Há parada no ciclo celular e ativação de genes de mecanismo de reparo (GMR) ou sinalização para apoptose. (B) Complexo E6AP-E6 que resulta na ubiquitinação ou degradação de p53 e conseqüente acúmulo de mutações (Silva *et al.*, 2003).

A proteína E7 do HPV também mostra um importante papel na carcinogênese, principalmente devido a sua capacidade de ligar-se à proteína pRb, produto do gene supressor de tumor Retinoblastoma (Rb) (Villa, 1997; Zur Hausen, 2000; McMurray *et al.*, 2001; Scully, 2002; Doorbar, 2005). A oncoproteína E7 constitui uma fosfoproteína ligante de zinco composta por 98 aminoácidos contendo dois domínios Cys-X-X-Cys. Um domínio ligante de zinco e dois segmentos Cys-X-X-Cys revelam similaridade com a proteína E6, sugerindo uma relação entre essas duas proteínas (Zur Hausen, 1996, 2000; McMurray *et al.*, 2001)

Proteínas E7 dos HPVs de alto e baixo riscos são bastantes semelhantes na composição de aminoácidos e organização estrutural, porém diferem no seu potencial de transformação e com e em outras propriedades bioquímicas. As proteínas E7 dos HPVs de alto risco formam complexos de alta afinidade com a pRb, enquanto as mesmas proteínas dos HPVs de baixo risco demonstram afinidade de ligação (Zur Hausen, 1996; Sugerman Shillitoe, 1997; Scully, 2002). Acredita-se que isso resulta de uma

modificação na sequência de aminoácidos, especificamente aqueles localizados na posição 21 (Zur Hausen, 1996; McMurray et al., 2001).

A interação da proteína E7 com a pRb está bem estabelecida. A pRb exerce um importante papel no ciclo celular, agindo como um regulador negativo deste. Ela liga-se aos membros da família dos fatores de transcrição E2F, reprimindo a ação deste, desse modo, prevenindo a progressão da fase G1 para a fase S do ciclo celular. A E7 liga-se preferencialmente a pRb hipofosforilada e o complexo E7-pRb ativa os fatores de transcrição E2F, que são liberados da pRb, permitindo assim, a expressão de proteínas necessárias para replicação do DNA (Sugerman Shillitoe, 1997; Villa, 1997; Zur Hausen, 1999; McMurray et al.,2001; Doorbar, 2005) (Figura 9).

A E7 pode ligar-se a outras proteínas envolvidas na proliferação do ciclo celular, como a deacetilase histona-1 (HDAC-1) e competentes da família dos fatores de transcrição AP-1, como c-Jun, JunB, JunD e c-fos (Zur Hausen, 1999; McMurray et al., 2001; doorbar, 2005). Destaca-se ainda, outra importante função da E7, que é a inativação dos inibidores das quinases ciclina-dependente p21 e p27. As interações de E7 com esses inibidores desregulam a atividade das ciclinas e quinases ciclina-dependentes (CDK), sendo um grande fator na estimulação do crescimento das células infectadas pelo HPV (Zur Hausen, 2000).

Portanto, esse somatório de associações provavelmente contribui para a habilidade de E7 em induzir a proliferação, imortalização e transformação celular (McMurray et al., 2001). Além das proteínas E6 e E7, outras oncoproteínas podem estar envolvidas na carcinogênese, dentre elas, aponta-se a proteína E5 (Sugerman & Shillitoe, 1997; Villa, 1997; Zur Hausena, 2000).

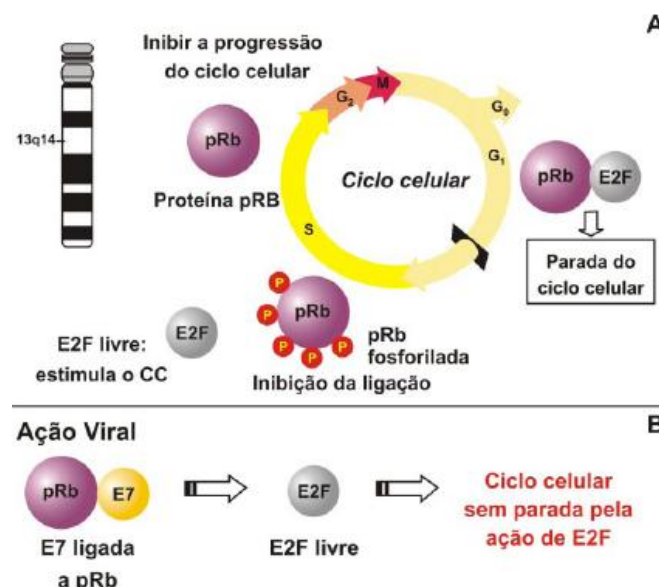


Figura 9. Esquema da interferência de E7 no ciclo celular. (A) Associação de pRb com o fator E2F e conseqüente regulação por inibição do ciclo celular. (B) Complexo E7-pRb que resulta na liberação do fator E2F e proliferação exagerada das células (Silva *et al.*, 2003).

A E5 do HPV é uma pequena proteína de membrana, constituída de 84 aminoácidos, cuja principal função biológica parece estar relacionada aos fatores de crescimento, os quais apresentam suas atividades exacerbadas nas infecções pelo HPV (McMurray *et al.*, 2001). As proteínas E5 formam complexos com uma variedade de outras proteínas transmembrana, tais como receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFr), receptor do fator de crescimento derivado de plaqueta-e receptor do fator estimulante de colônia-1. Essa proteína também se liga as proteínas do complexo junção gap, como a proteína ligante de membrana adenosina trifosfatase (ATPase) (Zur Hausen, 2002).

De acordo com os relatos de Villa e colaboradores em 2002, a proteína E5 é tradicionalmente conhecida por interagir com domínio transmembrana do receptor para EGF. Em células expressando E5, o *turnover* e a fosforilação dos referidos receptores serão aumentados, possivelmente reforçando a resposta positiva para sinalização do crescimento celular.

Considerando que o EGF é um fator necessário para crescimento dos queratinócitos humanos, presume-se que a atividade da proteína E5 está relacionada com a estimulação das células através das fases G1 e S do ciclo celular, sugerindo que essa proteína exerce um papel complementar no processo de immortalização das células (McMurray *et al.*, 2001) Porém tem sido observado em células de carcinoma cervical, que o ORF E5 frequentemente sofre deleção, indicando que a E5 participa nos estágios iniciais da infecção do HPV, mas que esta não é essencial para manutenção do fenótipo maligno das células infectadas (Zur Hausen, 2002)

2.5 HPV x Câncer cervical

O câncer cervical é uma das maiores causas de morbidade e mortalidade nas mulheres em todo o mundo. Devido a esta constatação ele é o primeiro câncer 100% associado a infecções, segundo a OMS (Organização Mundial da Saúde) [Bosch *et al.*, 2002]. O câncer vaginal, peniano e vulvar são muito raros, com taxas de incidência de

1% por ano. Este dado sugere que o risco de progressão da infecção é sítio dependente, ou seja, uma possível explicação para a alta incidência de câncer cervical seria a presença de uma zona de transformação no cérvix, considerada mais suscetível à transformação por HPV (Steenbergen *et al*, 2005).

Estudos morfológicos têm demonstrado que a neoplasia intraepitelial cervical (NIC) é uma doença dinâmica na qual, na minoria dos casos, progride para câncer invasivo cervical (CIC) enquanto que uma vasta maioria regride espontaneamente (figura 10) (Syrjanen *et al.*, 1992; Ostor, 1993; Mitchel *et al.*, 1994). Segundo Bethesda (1988), as lesões cervicais precursoras apresentam-se em graus evolutivos, do ponto de vista cito-histopatológico, sendo classificadas como neoplasia intraepitelial cervical de graus I (lesão de baixo grau), II e III (lesões de alto grau).

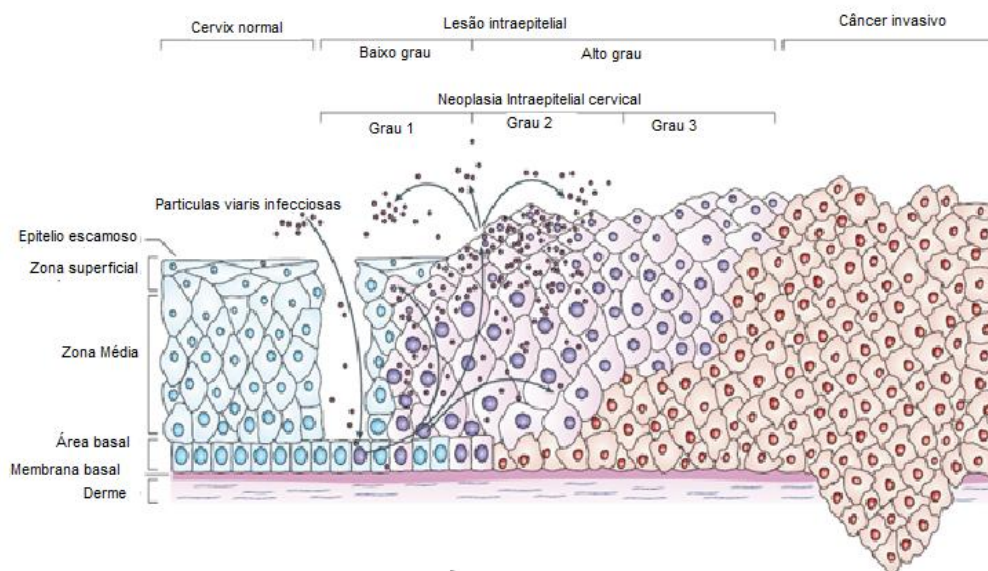


Figura10: Expansão da infecção no tecido epitelial cervical (Woodman *et al*, 2007)

A infecção por HPV pode regredir por ação do sistema imune do hospedeiro. Na ausência de regressão, as lesões persistem e podem progredir para o câncer. Isto ocorre nos locais onde o ciclo de vida produtivo não pode ser completado. O evento chave para a progressão seria a desregulação das proteínas transformantes (E6 e E7), com a perda dos genes reguladores que exercem efeito negativo no crescimento celular (E2 e E4), o que levaria ao aumento da proliferação celular nas camadas epiteliais inferiores e perda da habilidade de reparo de mutações no DNA do hospedeiro (Doorbar, 2005).

Os principais fatores envolvidos na carcinogênese cervical incluem o epitélio de transição cervical, a presença de um ou mais tipos oncogênicos, a persistência da

infecção viral, carga viral e a progressão clonal do epitélio com infecção persistente para pré-câncer e invasão. A importância dessa zona de transição cervical foi estendida para outras áreas similares localizadas no canal anal e nas tonsilas, locais onde também ocorre câncer. A NIC-1 (neoplasia intraepitelial cervical do tipo 1 ou de baixo grau) é a manifestação mais comum da infecção aguda por papilomavírus humano. A maioria das infecções por HPV, com a neoplasia mais branda (NIC-1), tende a desaparecer naturalmente no organismo. Uma pequena proporção de infecções resulta em displasia de médio e alto grau (NIC-2 e 3, respectivamente). Estas lesões raramente regredem, e se não forem tratadas, frequentemente progridem para câncer cervical (Moscicki *et al.*, 2006; Bryan, 2007) ou seja, a persistência das infecções é incomum, ocorrendo em menos de 5% das mulheres jovens saudáveis, e uma proporção preferivelmente alta em pessoas imunocomprometidas HIV – positivas (Leggatt & Frazer, 2007). Estima-se que o tempo de infecção até o surgimento da NIC 3 oscile entre um e 10 anos.

Van der Graaf e colaboradores em 2002 observaram que mulheres com infecção por HPV, apresentavam o risco de desenvolver câncer de colo uterino 19 vezes maior. Mulheres com os tipos oncogênicos 18, 31 ou 33 têm um risco maior do que 50 vezes comparado ao daquelas não-infectadas e, se considerado o HPV 16, este risco tem aumento de mais de 100 vezes.

Infecções com HPV de baixo e de alto risco, ocorrem principalmente nas mulheres entre 16 e 24 anos. Muitas das infecções por HPV são transitórias, cerca de 80% regredem espontaneamente com 1 ou 3 anos, o restante resulta em NIC. Estudos demonstraram que, entre as mulheres com alta carga de HPV 16, o risco de evoluir para NIC 3 é mais elevado quando comparadas com mulheres nas quais o HPV 16 não foi detectado (Ylitalo *et al.*, 2000).

A infecção com HPV-16 é responsável por aproximadamente 60% dos casos de câncer cervical no mundo. Juntos o HPV-16 e o HPV-18 são responsáveis por cerca de 70% de todos os cânceres cervicais invasivos (Muñoz *et al.*, 2003). O HPV 6 e 11 (tipos de baixo risco) são responsáveis por 10% das *LSIL* (lesão intraepitelial escamosa de baixo grau) e aproximadamente 90% das verrugas genitais (Bosch & Harper, 2006).

A prevalência da infecção cervical com o HPV tem grande variação em todo o mundo, sendo notório que as populações sob maior risco de desenvolver o câncer cervical estejam localizadas nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, especialmente na América Latina, onde o Brasil é considerado uma das áreas que apresenta elevadas taxas de infecção pelo vírus e de carcinoma cervical (Berrington-de-

Gonzalez *et al.*, 2004; Ferlay *et al.*, 2004; Clifford *et al.*, 2005; Hammouda *et al.*, 2005). No nordeste brasileiro, a incidência do câncer do colo do útero é a mais alta do mundo (Franco *et al.*, 1995).

Durante muito tempo, as únicas formas de controlar essa doença eram o diagnóstico precoce e o controle por meio da observação de alterações morfológicas de esfregaços cervicais estabelecido por George Papanicolau na década de 40, além da educação para a saúde do público por meio de campanhas de esclarecimento e adesão aos programas de acompanhamento e prevenção (Linhares & Villa, 2006). Países desenvolvidos, onde a maior parte da população tem acesso à saúde e onde há programas bem estabelecidos de prevenção, conseguiram diminuir a incidência do câncer cervical em 75% nos últimos 50 anos (Franco & Harper, 2005). Nos países em desenvolvimento, a instauração e manutenção de programas de prevenção, assim como o acesso a tratamentos eficientes, muitas vezes, não existem e conseqüentemente mais de 80% dos cânceres cervicais ocorrem nessas regiões (Frazer, 2004).

2.6. Vacina preventiva contra o Papillomavirus VLPs.

Em todo mundo, tenta-se desenvolver vacinas contra tipos de HPVs específicos. Estas podem ser basicamente de dois tipos, objetivando a prevenção de infecções virais por meio do desenvolvimento de anticorpos neutralizantes (vacinas profiláticas) e as que têm intenção de controlar o crescimento de células transformadas e induzir a regressão de lesões pré-existentes ou tumores (vacinas terapêuticas) (Garcia-Carrancá, 2003).

Apesar da complexidade dos eventos envolvidos para disparar uma resposta imune eficaz, os estudos realizados em animais forneceram resultados muito positivos quanto ao emprego dessas vacinas. A partir daí, surgiu uma série de propostas para o desenvolvimento e utilização de vacinas contra HPV (Stanley, 2002).

Uma das propostas é a *virus-like particles* (VLPs) ou partículas semelhantes ao vírus. Estas são estruturas protéicas com morfologia similar aos vírions intactos, elas são obtidas a partir da expressão da proteína L1, sozinha ou associada a L2. L1 é uma proteína de 55 KDa que compõe o capsídio viral em uma conformação de 72 pentâmeros, também denominados capsômeros (figura 11) (Zhou *et al.*, 1991; Kimbauer *et al.*, 1992, 1993).

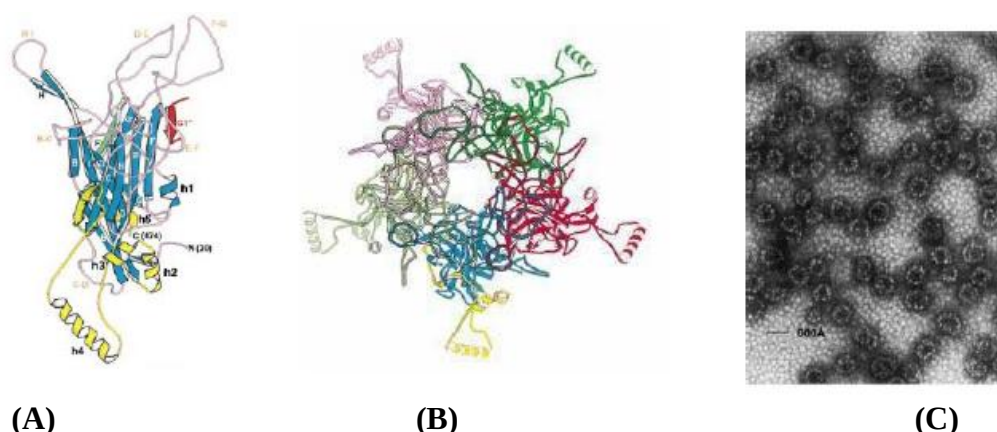


Figura 11. VLPs. (A) O monômero L1 . (B) Pentâmero de L1. (C) “Virus-Like Particle” (Chen *et al.*, 2000)

As VLPs são indistinguíveis dos vírions nativos, preservam os epítomos conformacionais necessários à indução de anticorpos neutralizantes e são capazes de promover resposta celular (Dupuy *et al.*, 1999; Palker *et al.*, 2001). As VLPs de L1 constituem excelentes candidatos a vacinas profiláticas, na medida em que previnem infecções e a neoplasia epitelial a elas associadas. As VLPs são capazes de induzir a formação de anticorpos neutralizantes sistêmicos e de mucosa, além de induzir imunidade celular em animais imunizados (Liu *et al.*, 1998). Porém, a produção de anticorpos neutralizantes só é estimulada se a proteína L1 estiver na forma terciária ou nativa, montada como um multímero (Dillner, 1999; Stanley, 2006).

Vírus não envelopados que expressam uma ou duas proteínas principais em seus capsídeos representam os modelos cujas VLPs apresentam-se mais similares ao vírus intacto, devido à simplicidade de sua estrutura. Vacinas contra hepatite B foram um dos primeiros produtos contendo VLPs sintetizadas, produzidas a partir de proteínas recombinantes em sistemas de expressão controlados (McAleer *et al.*, 1984). Outras doenças que são alvo para imunização com VLPs são gastroenterites (Tacket *et al.*, 2003), hepatite C (Lechmann, *et al.*, 2001) e malária (Oliveira-Ferreira *et al.*, 2000).

Ensaios clínicos de vacinas profiláticas contra HPV-16 estão em andamento desde 1997. Na maioria desses ensaios, injetam-se VLP de HPV-16 purificadas a partir de culturas de leveduras ou células de inseto contendo vetores de expressão recombinantes com os genes L1 e/ou L2 (Linhares e Villa, 2006).

Os resultados de ensaios clínicos de fase I para vacinas profiláticas contra HPV tipo 11 e tipo 16 indicam que a administração da vacina por via subcutânea ou intramuscular é segura, não tendo causado nenhuma reação adversa. Nos ensaios reportados, indivíduos vacinados exibiram uma boa resposta imune. Além disso,

anticorpos neutralizantes foram detectados em níveis que excedem àqueles observados nos indivíduos naturalmente infectados por HPV, indicando que, nesses ensaios, a vacina é imunogênica (Schiller and Lowy, 2006).

Os estudos clínicos de fase II e III, coordenados pela Merck Sharp & Dohme (MSD), foram realizados em aproximadamente 12.000 mulheres jovens, onde a vacina mostrou-se segura e bem tolerada pelas voluntárias. Ainda mais importante, a resposta imune desenvolvida foi bastante elevada, tendo-se observado títulos de anticorpos cerca de 100 vezes maiores do que aqueles observados em mulheres, da mesma faixa etária, naturalmente expostas aos HPVs em estudo (US FDA, 2006)

Em 8 de junho de 2006, a *US Food and Drug Administration* (FDA) aprovou a Gardasil[®], vacina quadrivalente desenvolvida pela Merck, contendo VLPs de L1 dos tipos 6, 11, 16 e 18, para uso em mulheres de 9-26 anos de idade. Posteriormente, a GlaxoSmithKline fez um requerimento à *European Medicine Agency* (EMA) para a licença da Cervarix, vacina bivalente baseada em VLPs de L1 HPV 16 e 18. Porém, essas vacinas comerciais deixam de fora pelo menos 13 outros papilomavírus oncogênicos responsáveis por quase 30% de todos os casos de câncer cervical, além de serem necessárias três doses para proteção, o que encarece o processo de vacinação e dificulta sua adoção em programas públicos de vacinação principalmente nos países em desenvolvimento (Gasparic *et al.*, 2007).

2.7 Sistema Heterólogo de expressão

Existem diferentes sistemas heterólogos de expressão gênica. Vários tipos celulares têm sido usados para transformação e expressão de genes de interesse, tanto em sistemas procariotos (principalmente *Escherichia coli*) como em sistemas eucariotos, tais como leveduras, células de insetos ou de mamíferos (Morton and Potter, 2000; Schatzmayr, 2001).

Os sistemas de expressão que utilizam células bacterianas (procariotos) têm como principal organismo a *Escherichia coli*. O fascínio de bactérias como sistemas experimentais é que elas são células relativamente simples e podem ser multiplicadas e manipuladas com facilidade, além disso, possuem um tempo de geração curto (Watson *et al.*, 2006). Apesar de muito utilizados, estes sistemas apresentam algumas dificuldades, tais como a ausência de modificações pós-traducionais (Brown, 2003; Pelczar *et al.*, 1996). *E. coli* pode não processar a proteína recombinante corretamente

ou pode não enovelá-la da maneira certa formando corpos de inclusão, ocorrendo até a degradação da proteína (Brown, 2003). O processo de purificação da proteína intracelular heteróloga requer cuidado, pois a lise das células também libera endotoxinas ou pirógenos (presentes na membrana externa) que podem provocar reações indesejáveis (Montor & Sogayar, 2003).

Quando baseados em células de mamíferos, as proteínas são processadas corretamente, porém estas culturas apresentam crescimento lento, meios de cultura caros, e processo de purificação complexo. O sistema que utiliza células de insetos tem como vantagem a produção de proteínas recombinantes com um alto rendimento. Este sistema de expressão é baseado no baculovírus, um grupo de vírus que são comuns em insetos, o qual também é utilizado com sucesso na produção de várias proteínas de mamíferos, porém essas não são glicosiladas (Brown, 2003).

Sistemas de expressão em leveduras oferecem vantagens consideráveis em relação a sistemas procarióticos ou a outros sistemas eucarióticos. Leveduras são capazes de secretar proteínas e realizar processos de modificação relacionados à secreção. Como um sistema bacteriano, o eucariótico combina a facilidade de manipulação genética e o crescimento relativamente rápido a altas densidades celulares em meios relativamente simples (Gellisen, 2000).

A produção industrial demanda tanto alta produtividade das proteínas como dispositivos de segurança e autenticidade dos compostos. A agência FDA (Food and Drug Administration), por exemplo, recomenda o uso de linhagens reconhecidas como seguras para a produção. Esses organismos recebem o status de GRAS (Generally Recognized as safe) (Gellisen *et al.*, 2005).

Devido a todos esses fatores, os fungos vêm se tornando os sistemas favoritos para a produção das proteínas em larga escala. Os sistemas de expressão em leveduras combinam a fácil manipulação e crescimento de organismos unicelulares com o processamento de modificação pós-traducionais dos eucariotos. As leveduras não são pirogênicas; tem menos risco de contaminação por patógenos humanos e vírus possuem genoma de pequeno tamanho – cerca de 200 vezes menor que o de mamíferos, o que simplifica análises moleculares e genéticas e crescem em meio de cultura não-complexo. Além disso, os custos de triagem e produção são muitos menores do que em outros sistemas eucariotos (Gellisen *et al.*, 2005).

O primeiro sistema desenvolvido para produção de genes heterólogos em fungos foi baseado na levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Essa plataforma possui o status de

GRAS e foi utilizada com sucesso na produção de vários fármacos aprovados pela FDA incluindo a insulina (Melmer, 2005) e a primeira vacina recombinante, o antígeno viral da hepatite B (Harford *et al.*, 1987). A quantidade massiva de informações sobre esse microorganismo nas áreas da genética, biologia molecular, fermentação, bioquímica, microbiologia e fisiologia, tornou-a como a espécie mais bem caracterizada do sistema eucariótico. Esse conhecimento possibilitou a utilização da engenharia genética para modificar o microorganismo como um todo a alterar o fluxo metabólico visando à produção de proteínas específicas. Por esses motivos *S. cerevisiae* se tornou um dos principais sistemas de expressão (Gellissen *et al.*, 1997). Contudo, novos sistemas de expressão estão sendo desenvolvidos baseados em leveduras não convencionais. Um número limitado de espécies pertencentes ao gênero *Hansenula*, *Cândida*, *Torulopsis* e *Pichia* é capaz de utilizar o metanol como fonte única de carbono. Entre essas leveduras metilotróficas facultativas, as espécies *H. polymorpha* e *Pichia pastoris* fazem parte dos sistemas industriais em ascensão (Hollenberg *et al.*, 1997).

Até o começo dos anos 90 poucas proteínas heterólogas haviam sido expressas em *P. pastoris* (Russel *et al.*, 1991), hoje há mais de 400 proteínas expressas registradas (Cereghino *et al.*, 2000, 2002).

Para a produção de VLPs, é necessário o estabelecimento de um método de expressão que permita produção em larga escala e seja capaz de utilizar técnicas de purificação de grandes quantidades. *Pichia pastoris* possui diversas linhagens e ferramentas moleculares disponíveis comercialmente (Invitrogen, San Diego) e seu uso é muito difundido na comunidade científica. Além disso, *P. pastoris* é metilotrófica, capaz de utilizar metanol como fonte única de carbono e indutor (Cereghino *et al.*, 2000).

2.8 Levedura *Pichia pastoris*

Pichia pastoris é uma levedura metilotrófica, ou seja, é capaz de crescer em meio de cultura contendo metanol como única fonte de carbono. As primeiras reações do metabolismo metanólico para obtenção de energia ocorrem nos peroxissomos e depois prosseguem no citoplasma. A enzima álcool oxidase – AOX (codificada pelos genes *AOX1* e *AOX2*, sendo o primeiro responsável pela maior atividade da enzima na célula), é a primeira a atuar, oxidando o metanol a formaldeído e a peróxido de hidrogênio, que por sua vez é degradado a oxigênio e água. Uma parte do formaldeído

deixa o peroxissomo e vai para o citoplasma, onde é oxidado a formato e carbono por duas desidrogenases. *P. pastoris* tem habilidade em alcançar altos níveis de expressão, podendo produzir em grandes quantidades proteínas de importância na área biotecnológica. Tipicamente, esta levedura produz proteínas heterólogas em quantidades superiores a 30% do total das proteínas solúveis expressas pela célula. Além disso, por se tratar de um microrganismo eucarioto, seu modelo de expressão possibilita que proteínas que necessitem de transformações pós-traducionais possam ser expressas conservando sua estrutura o mais próximo possível da proteína nativa, possibilitando a utilização destas como antígenos vacinais (Ellis *et al*, 1985; Cereghino & Cregg, 2000; Torres & Moraes 2002; Macauley *et al.*, 2005).

Os vetores de expressão gênica para uso em levedura *P. pastoris* estão bem estabelecidos e têm sido utilizados com sucesso para produção de diferentes tipos de proteínas heterólogas (Higgins, 1995). A maioria dos vetores possuem um cassete de expressão composto pela sequência promotora do gene *AOX1* (*AOX1* 5'), um ou mais sítios de clonagem para inserção do gene heterólogo, uma sequência de término da transcrição do gene *AOX1*, sequências para integração no genoma, para seleção e secreção (Daly and Hearn, 2004).

Os sistemas de expressão baseado na levedura *P. pastoris* permitem a produção de proteínas tanto na forma intracelular quanto extracelular, sendo que o sistema de produção extracelular apresenta a vantagem da liberação da proteína de interesse no sobrenadante do meio de cultivo, o que facilita o processo de purificação (Cereghino & Cregg, 2000).

Existem muitos vetores comerciais disponíveis para expressão em *P. pastoris*. Estes vetores têm sido desenhados para poderem ser usados tanto em *E. coli* como em *P. pastoris*. Estes vetores contem uma origem de replicação bacteriana e uma de levedura, para manutenção do plasmídio, e marcas de seleção para um ou ambos os organismos. (Cereghino & Cregg, 2000). Tem sido utilizado com sucesso o sinal α -*maturing factor* de *S. cerevisiae* (Invitrogen, 2007), que codifica o peptídeo pré-pro fator α , cuja função é ordenar a secreção da proteína sintetizada. Dados demonstraram que o poder de secreção da *P. pastoris* pode ser superior ao da *S. cerevisiae* (Muller et al. 2005).

No sistema com *Pichia*, a expressão extracelular é bastante utilizada por que a levedura secreta baixos níveis de proteínas nativas e por isto a purificação da proteína heteróloga se faz de maneira simples. A produção intracelular geralmente não resulta

em glicosilação, sendo assim, mais atrativo para certos tipos de proteínas, como fármacos. Outra vantagem de utilizar a expressão intracelular é que o meio citoplasmático facilita a formação das VLPs resultando em VLPs formadas enquanto que, na expressão extracelular a proteína L1 tem que ser concentrada a partir do sobrenadante e colocada em tampão específico para induzir à formação das VLPs. Todavia, a purificação das proteínas expressas dentro da célula é mais difícil quando comparada a expressão extracelular (Rees *et al*, 1999).

2.9 Vetor de Expressão pPCZA e pPCIZ α

Existem muitos vetores comerciais disponíveis para expressão em *P. Pastoris*. Estes vetores têm sido desenhados para serem usados tanto em *E. coli* como em *P. pastoris*. Eles contêm uma origem de replicação bacteriana e uma de levedura, para manutenção do plasmídio, e marcas de seleção para um ou ambos organismos. A maioria dos vetores de expressão tem um cassete de expressão composto por um fragmento de 0,9 kb referente à sequência do promotor do gene *AOX1* e a sequência de terminação da transcrição do *AOX1* (Cereghino & Cregg, 2000). Entre o promotor e a sequência terminadora da transcrição existe um sítio ou múltiplos sítios de clonagem para inserção da sequência codificante do gene heterólogo, são exemplos deste tipo de vetor os da linha pPICZ (figuras 12 e 13).

Alguns dos vetores dessa linha possuem sinais, que permitem a secreção da proteína heteróloga. Tem sido utilizado com sucesso o sinal α -mating factor de *S. cerevisiae* (Invitrogen, 2007), que codifica o peptídeo pré-pro fator α , cuja função é ordenar a secreção da proteína sintetizada. Além de uma variedade de opções de enzimas de restrição, o vetor pPICZA α (figura 12) conta ainda com duas sequências que possibilitam duas estratégias interessantes de detecção e recuperação da proteína heteróloga produzida. Trata-se do epítipo c-myc (Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu), cuja fusão à proteína recombinante permite a sua imunodetecção pelo anticorpo anti-myc. A outra estratégia é demonstrada pela cauda c-terminal de poli-histidina (6XHis), cujo epítipo c-terminal pode ser detectado através do anticorpo anti-His, além de permitir a purificação da proteína recombinante fusionada por meio de cromatografia de afinidade (Invitrogen, 2007).

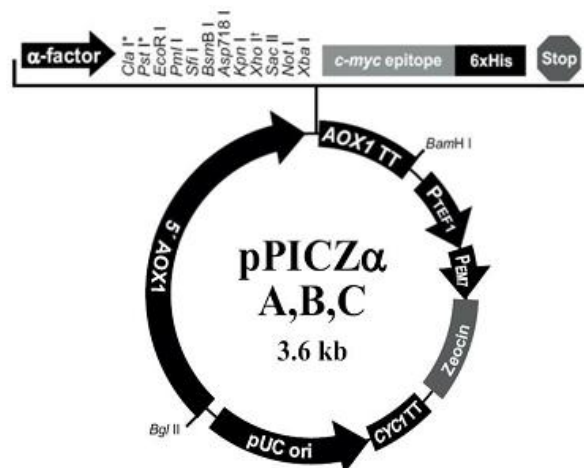


Figura 12. Mapa gênico do vetor de expressão pPICZ α (Invitrogen, 2005)

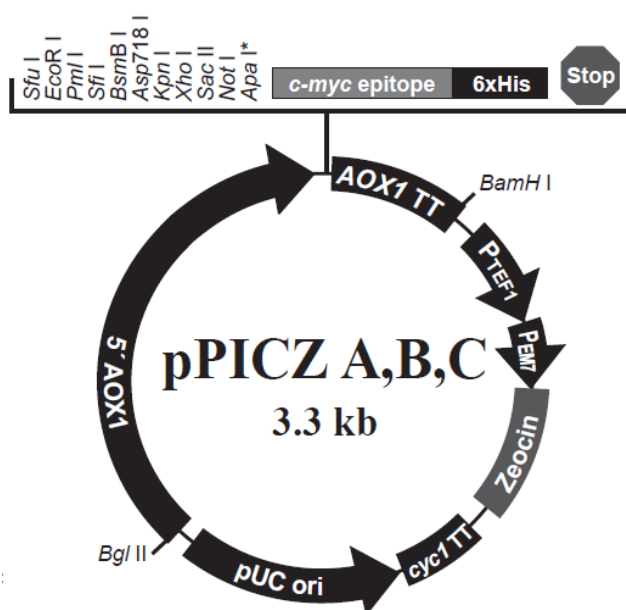
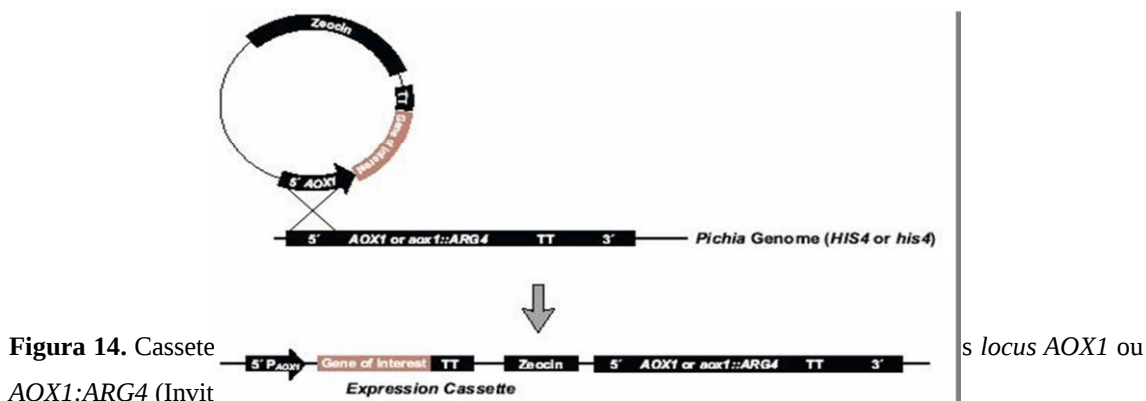


Figura 13. Mapa gênico do vetor de expressão pPICZA (Invitrogen, 2005)

Os vetores de expressão pPICZA e pPICZ α , um plasmídeo integrativo para células da levedura *Pichia pastoris*, é direcionado para uma sequência homóloga do loci genômico da levedura, justamente, de transcrição controlada pelo promotor AOX. Portanto, o vetor deve ser linearizado, antes da transformação, pois as extremidades do DNA são substratos favoráveis para enzimas de recombinação. Assim, vetores de expressão linearizados podem gerar transformantes estáveis via recombinação homóloga entre as sequências compartilhadas pelo vetor e pelo genoma do hospedeiro (Orr-Weaver et al. 1981). A transformação em *P. pastoris* ocorre pela integração do cassette de expressão em locus específico e origina transformantes geneticamente estáveis. Para que isso ocorra o cassette de expressão/vetor deve ser digerido em único

sítio, que pode ser uma marca gênica (ex., *HIS4*) ou o promotor *AOX1*. A integração no genoma ocorre via recombinação homóloga quando o cassete de expressão/vetor contém regiões homólogas ao genoma da *P. pastoris* (figura 14) e a integração pode ser via inserção ou substituição gênica (Daly & Hearn, 2005).



A integração por inserção ocorre em altas frequências (50-80%) por eventos de *crossover* (permuta) único nos loci *ARG4* ou *AOX1* (Cereghino & Cregg, 2000), e também pode resultar em integrações múltiplas em *tandem* devido a eventos de recombinação repetidos numa taxa de 1-10% dos transformantes (Daly & Hearn, 2005). Eventos de integração por substituição gênica ocorrem por duplo *crossover* (permuta) no locus gênico alvo, dando origem à transformantes de cópia única que são geralmente mais estáveis. A substituição gênica em *P. pastoris* é obtida pela digestão do vetor de expressão nas regiões 5' e 3' terminais que correspondem às regiões 5' e 3' do locus *AOX1*. A transformação resulta na deleção sítio-específica do gene *AOX1*, numa frequência de 5-25% dos transformantes (Daly & Hearn, 2005).

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Avaliar a expressão do gene L1 selvagem de HPV16 pelas vias intra e extracelular em *Pichia pastoris* por meio do uso de vetor integrativo e consequente produção da proteína L1.

3.2. Específicos

1. Transformar as construções pPICZAL1H16 e pPCIZA α L1H16 em *Pichia pastoris*;
2. Transcrever o gene L1 em *Pichia*;
3. Produzir a proteína L1 pelas vias intra e extracelular.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Disponibilidade do genoma de HPV 16 no vetor pBR322 (pBR322HPV16) para amplificação e clonagem de L1 nos vetores de expressão pPICZA α e pPICZA. Foram utilizados enzimas e kits da Promega Corporation (Madison, USA) – enzima *Kpn* I; enzima *Sal* I; T4 DNA ligase; vetor pGEM-T ; kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System*; kit *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purifications System* – e também da Invitrogen Corporation (Califórnia, EUA): vetor de expressão em células de *Pichia pastoris* pPICZA α e pPICZA; Xgal; IPTG; RNase; dNTPs; *Taq* DNA Polimerase de alta fidelidade, marcador Lambda *Hind* III e Marcador *plus* de 1 Kb; kit *Purification and Quantification PureLink*.

Os seguintes equipamentos foram utilizados: microcentrífuga, banho-maria, estufa, termociclador, fonte para eletroforese, transiluminador e câmara de fluxo laminar, e os seguintes compostos: brometo de etídeo; Tris-Base; ácido acético glacial; EDTA; glicerol; azul de bromofenol; ágar bacteriológico; CaCl₂; ampicilina; Zeocina™; extrato de levedura; peptona; Tris-HCl; glicose; NaOH; SDS; acetato de potássio.

4.2 Métodos

4.2.1 Construções pPICZA α L1H16 e pPICZAL1H16

A construção pPICZAL1H16 foi obtida como resultado da dissertação da Mestre em Genética Eliane Coimbra (Coimbra *et al.*, 2007) e a construção pPICZA α L1H16 foi obtida em meu trabalho de conclusão do curso de graduação (Carvalho, 2008).

4.2.2. Transformação da levedura *Pichia pastoris* com pPICZAL1H16 e pPICZA α L1HPV16

Os clones com as construções pPICZAL1H16 e pPICZA α L1HPV16 foram submetidos à extração com o kit *QIAprep Spin Miniprep* (Qiagen), para obtenção de

5µg/µl (no mínimo) de DNA e posterior linearização com a enzima *SacI* para transformação da levedura *Pichia pastoris* pelo sistema de cloreto de lítio (Invitrogen

A transformação por eletroporação também foi utilizada. Para preparação de células eletrocompetentes foram realizados os seguintes procedimentos: uma colônia da levedura *P. pastoris* X-33 (tipo selvagem) foi pré-inoculada em 10 mL de YPD (250rpm, a 30°C) *overnight* ou até uma DO600 igual a 3; de 3-5 mL do pré- inóculo foi adicionado a 250 mL de meio YPD para crescimento por 6 horas ou até uma DO600 igual 1.3; a cultura de leveduras foi centrifugada (3000 rpm por 5 min., a 4°C) para sedimentação das células; a lavagem do *pellet* foi gentilmente realizada por pipetagem, através de uma ressuspensão inicial das células em 100 mL de água deionizada (autoclavada) gelada, seguida de centrifugação e descarte do sobrenadante; a segunda ressuspensão do *pellet* foi realizada com 50mL de água deionizada (autoclavada), seguindo-se de nova centrifugação e descarte do sobrenadante; a última lavagem do *pellet* foi realizada com 20mL de sorbitol gelado 1M, seguindo-se da última centrifugação e descarte do sobrenadante as células foram finalmente ressuspensas em 0.5mL de sorbitol 1M e mantidas no gelo.

Para a eletroporação, 5-10µg de DNA previamente linearizados (em um volume de 10µL) foram homogeneizados a 80µL de células eletrocompetentes mediante pipetagem. Essa mistura foi transferida para uma cubeta de 0.2cm pré-resfriada e incubada no gelo por 5 min. A cubeta foi inserida no eletroporador (Multiporator Eppendorf) para transformação, seguindo os parâmetros determinados pelo fabricante: 1500v por 5 min. Imediatamente após o pulso elétrico, 1mL de sorbitol 1M gelado foi adicionado a cubeta. Em seguida, esse material foi transferido para um tubo estéril de 15mL e incubado por 2 horas a 30°C, sem agitação.

Para aumentar o rendimento da transformação foi adicionado 1mL de YPD ao tubo, o qual foi incubado por mais 2-3 horas a 30°C, sob agitação. A partir desse material, alíquotas de 10, 25 e 100µL foram semeadas em placas de meio YPDS contendo 100 µg/mL de ZeocinaTM para incubação a 30°C por 2-3 dias. Os recombinantes foram então selecionados através da presença de colônias na placa de transformação devido à resistência ao antibiótico ZeocinaTM que foi conferida graças à integração das construções pPICZAαL1H16 e pPICZAL1H16 no genoma da levedura.

4.2.3. PCR de colônia

A PCR para detecção foi feita diretamente dos clones crescidos em placa. Uma colônia foi misturada a 10µl de água e 5µl de enzima lyticase (5U/ µl) para incubação a 30°C, por 10 min. Depois de incubada, a amostra foi colocada a -80°C por 10 min. Uma alíquota de 5µl das células foi utilizada para a reação de PCR como mostra a tabela 2.

Reagente	Volume
Células lisadas	5µL
5' AOX1 primer (10 pmol/uL)	1µL
3' AOX1 primer (10 pmol/uL)	1µL
Tampão 10x	5µL
MgCl ₂ (25mM)	5µL
dNTP (25mM)	1µL
Água	27µL
Total	45µL

Tabela 2. Reação de PCR direta de colônia

A reação foi incubada a 95°C por 5 min e depois adicionada 5µL de 0,16 U/µL de *Taq* polymerase (0,8 units). O programa utilizado apresentou 30 ciclos: 95°C de desnaturação (1 min), 54°C de anelamento (1min) e 72°C de extensão (1min), incluindo extensão final de 7 min. Além dos primers AOX, listados na tabela 5, a reação também foi feita utilizando-se os primers para L1.

Primer Sequência 5' - 3'
3' AOX1 <i>Pichia</i> 5' GCAAATGGCATTCTGACATCC 3'
5' AOX1 <i>Pichia</i> 5' GACTGGTTCCAATTGACAAGC 3'

Tabela 3. Primers para amplificação de região AOX.

4.3 Análise da expressão da proteína L1

4.3.1. Indução dos clones para expressão do gene L1

Clones de *Pichia pastoris* foram selecionados com a construção pPICZAL1H16 e com a construção pPICZAαL1HPV16, além da linhagem GS115 sem o inserto (como controle negativo), para os ensaios de fermentação, que seguiram o protocolo apresentado no manual *EasySelect Pichia Expression Kit* (Invitrogen). As colônias foram inoculadas em meio MGH – *Minimal Glicerol Médium Histidine* (1,34% YNB,

1% glicerol, 0,00004% biotina, 0.004% histidina) ou BMGH - *Buffered Minimal Glicerol Médium Histidine* (mesma composição do MGH, mas acrescentado de tampão fosfato de potássio 100mM, ph. 6,0) para crescimento por 16-24 horas, a 28-30°C. O volume de meio utilizado foi equivalente a 10% do volume do *erlenmeyer*. Para a indução, a cultura deveria estar numa DO600 de 1-6. Nesta fase, o meio com glicerol foi retirado, por centrifugação (3000xg, 5 min, temperatura ambiente) e as células ressuspensas em meio com metanol MMH - *Minimal Methanol Histidine* (1.34% YNB, 0,00004% biotina, 0.5% metanol) ou BMMH - *Buffered Minimal Methanol*. A indução foi feita até 96h e a cada 24 horas de crescimento com metanol 100% foi adicionado para uma concentração final de 1%. Um volume de 1ml foi centrifugado, também a cada 24 horas, para formação do *pellet* celular (clones de expressão intracelular) e para recuperação do sobrenadante (no caso dos clones de expressão extracelular), ambos estocados a -80°C até a análise da proteína L1, em géis de SDS-PAGE 12,5%.

Para os clones transformados com a construção pPICZA α L1HPV16 foi também realizada uma metodologia comumente empregada para avaliação da expressão extracelular, a indução em placa *deep-well* ou em mini-escala, para seleção de clones com melhores potenciais de expressão. Os clones foram submetidos a crescimento em com 1ml de meio BMGY na placa *deep-well*, por um período de 24h à uma temperatura de 30°C. Após esse período centrifugou-se a placa (10000rpm por 10') e retirou-se o sobrenadante. O *pellet* formado foi lavado com água milliQ gelada e estéril. Adicionou-se 1ml de meio BMMY em cada poço da placa para indução por até 96h, à 28°C. Os sobrenadantes foram estocados a -80°C para posterior análise.

4.3.2 Processamento das amostras protéicas (recuperação da proteína L1)

Para a recuperação do conteúdo protéico presente no meio extracelular foi feita a adição de acetona gelada da seguinte forma: 1 mL do meio de cultura foi misturado a 8 mL de acetona 100% gelada e a suspensão foi acondicionada a -20°C por cerca de 16 horas. Procedeu-se a centrifugação por 20 minutos a 5000rpm e secagem do precipitado a 37°C por 15 minutos. A amostra pôde ser então ressuspensa em tampão fosfato para uma concentração final de 10X ou ressuspensa diretamente no tampão de amostra com β -mercaptoetanol para corrida SDS-PAGE 12,5%.

Em relação aos clones de expressão intracelular, os *pellets* foram submetidos a um protocolo de lise mecânica. Para tal, adicionou-se 100 µl de tampão de lise (50 mM de fosfato de sódio, 1 mM de PMSF, 1 mM EDTA e 5% de glicerol) e pérolas de vidro (0,5 mm), em seguida foram realizados 8 ciclos de 30 segundos no vórtex e 30 segundos no gelo. Após centrifugação, o sobrenadante foi recuperado para análise da proteína L1.

4.3.3. Extração de RNA total dos recombinantes de *P.pastoris*

A extração de RNA dos clones foi feita a partir do método que utiliza fenol ácido, quente. Um volume de 5-10ml de cultura induzida, foi centrifugado a 5000 rpm, por 4 min. O pellet foi ressuscitado em 600 µl de solução AE (acetato de sódio, 50 mM, pH 5,3 e EDTA, 10mM), e depois passado a um tubo de 1,5ml. À amostra, foram adicionados 40 µl de SDS 25%, levando-se ao vórtex. Rapidamente, foi feita a adição de fenol previamente aquecido a 65°C e equilibrado em tampão AE. Após agitação no vórtex, a amostra foi incubada a 65°C, por 10 min e, posteriormente, congelada a 4°C, por 5min. Foi realizada uma centrifugação de 10000 rpm, por 5 min para recuperação da fase aquosa em novo tubo, à qual foi misturado, por inversão (2-3min), um volume igual de fenol/clorofórmio/isoamílico (25:24:1) a temperatura ambiente. Para nova recuperação da fase aquosa, fez-se uma centrifugação a 14000 rpm por 2 min. Um volume de 1ml de clorofórmio foi agregado para separar as fases, através de centrifugação a 12000 rpm, 2 min.

Ao sobrenadante (em novo tubo) foi adicionado 1/10 de acetato de sódio 3M (pH 5.3) e misturado em vórtex. Posteriormente, foram misturados 2,5 volumes de isopropanol para a precipitação do RNA a -20°C e 5 min. A amostra foi centrifugada a 12000 rpm por 10 min, para obtenção do pellet que em seguida, foi lavado 2x com 1 ml de etanol 80% sob centrifugação de 14000 rpm por 5 min. A ressuspensão do pellet foi feita em 5-20 µl de água, após secagem (não completa) em temperatura ambiente. Alternativamente foi utilizado o método com uso do reagente Trizol (Invitrogen), de acordo com o protocolo do fornecedor.

4.3.4 Síntese de cDNA e RT-PCR para análise da transcrição do gene L1

A construção do cDNA foi realizada a partir do *kit SuperScript II* (Invitrogen). À uma alíquota de 4µl do RNA previamente extraído e tratado com DNase foi adicionado

1µl de *Random Primers* (500µg/ml – Promega). Essa reação foi incubada à 70°C por 5min e resfriada no gelo por mais 5'. Também foi preparada uma amostra com os *random primers* adicionados de 4µl de água livre de nuclease (Promega) como controle negativo. Adicionou-se a essa solução (RNA + *Random Primers* [5µl]) - os seguintes reagentes (Promega) para síntese do cDNA: 4µl de *Improm II 5x Reaction buffer*, 2µl de MgCl₂ (25mM), 0,75µl de dNTP (10mM), 1µl de Transcriptase Reversa (*Improm II reverse transcriptase*) e 7,25µl de água livre de nuclease (Promega). Duas outras reações foram preparadas substituindo-se a solução de RNA + *Random Primers* por: 5µl de água livre de nuclease (Promega) + *Random Primers* (controle negativo) e uma apenas com os reagentes Promega acima citados (controle da manipulação) para se certificar que não houve contaminação com DNA em nenhuma etapa na síntese do cDNA. Essas soluções foram submetidas a um ciclo de 25°C por 5', 42°C por 60' e 70°C por 15'.

Primers específicos que amplificam uma região interna do fragmento de L1 (500bp) foram desenhados para a confirmação da presença do inserto nas construções. Para a reação de RT-PCR utilizou-se: 5µl de cDNA, 12,5µl de *Master Mix* (Promega), 1,5µl do Primer Interno *Foward*, 1,5µl do Primer Interno *Reverse* e 4,5µl de água livre de nuclease (Promega). Também foi feito um controle negativo sem adição de cDNA. O ciclo utilizado na reação foi: 95°C por 2'; 30 ciclos de 94°C por 1', 55°C por 1' e 72°C por 2'; e uma extensão final de 72°C por 5'.

4.3.5 Avaliação da expressão de L1 através de Dot Blot

As amostras de extrato intracelular e de sobrenadante (proteínas extracelulares) dos clones foram dosadas pelo método de Bradford (1976) e submetidas (aproximadamente 40µg por poço) a uma eletroforese em gel SDS-PAGE (12,5%), posteriormente corado com *Coomassie blue*. O protocolo do dot blot foi realizado através da ligação das proteínas intracelulares totais da levedura (0,3-0,9µg) e das proteína extracelulares (0,3-0,9µg) na membrana de nitrocelulose por 1h; lavagem com PBS1x por 5 min; bloqueio com leite desnatado 2,5% por 40 min; lavagem com PBS1x por 5 min; adição de anticorpo contra a cauda de poli-histidina, fusionada à proteína L1 (Anti-6xHis conjugado à fosfatase alcalina 1 µg/mL diluído 1:20.000 em leite 5%; Sigma; para 1h de incubação a 37°C; três lavagens com PBS1x-Tween (10 min cada) e

revelação com NBT/BCIP (Nitro blue tetrazolium chloride/5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, toluidine salt) para reação com anticorpo Anti-His.

5. RESULTADOS

5.1 Análise dos transformantes das células de *P. pastoris* recombinantes X33/pPICZA α L1H16

Após a extração, os plasmídeos oriundos de células de *E. coli* recombinantes, foram linearizados (figura 15) por digestão enzimática (*SacI*) e inseridos por transformação em células de *P. pastoris* (conforme descrito na metodologia). Clones foram obtidos após seleção em placa com antibiótico zeocina e alguns destes, foram estriados para estoque e novas análises (figura 16).

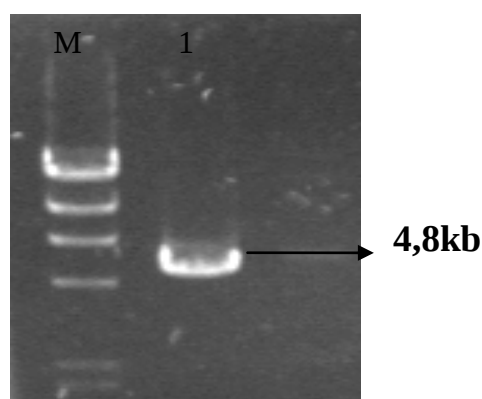


Figura 15: Digestão da construção com a enzima *SacI*. Poço M: marcador de 1 Kb; poço 1: plasmídeo oriundo de célula de *E. coli* recombinante, linearizado

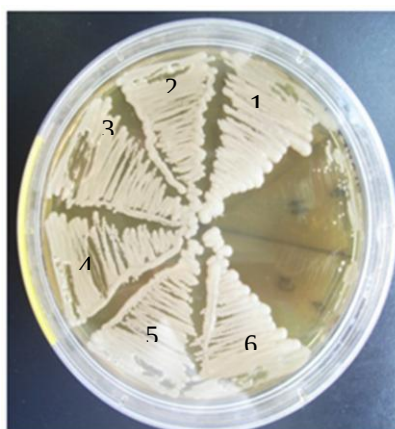


Figura 16 . Repiques das colônias de leveduras eletroporadas com as construções pPICZA α L1H16 (1,2,3) e pPICZAL1H16 (4,5,6) em placa YPDS com 100 μ g/mL de Zeocina.

5.1.1 Análise de integração das construções pPICZA α L1H16 e pPICZAL1H16 ao genoma da levedura por PCR de Colônia

A partir da placa de repique foram selecionados 3 clones para cada construção para a confirmação da integração por PCR de Colônias (Figura 17). Às mesmas foram adicionadas tanto primers externos, quanto internos para o gene L1H16.

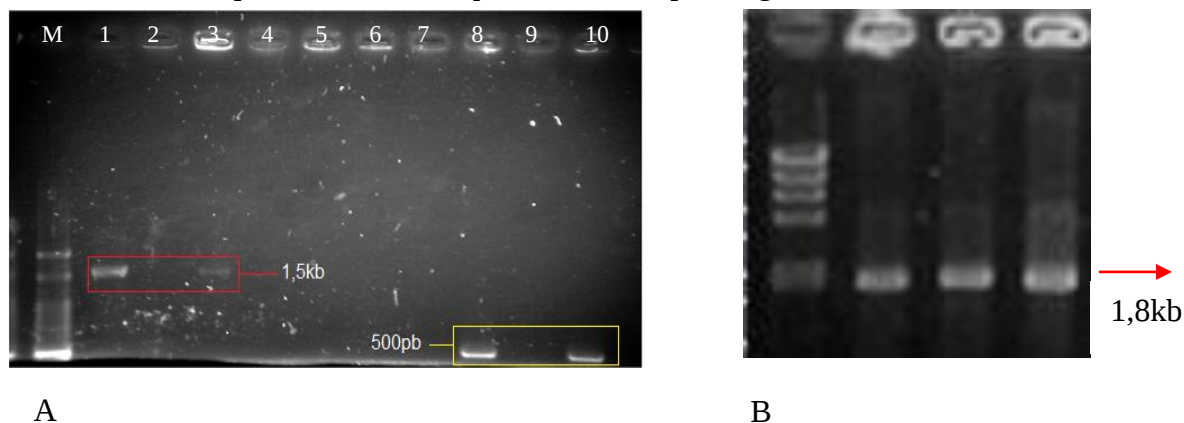


Figura 17: Gel de agarose da PCR de Colônias de *P. pastoris*. (A) Clones com a construção pPICZA α L1H16. (M): Marcador 100bp (Invitrogen); (1, 2, 3 e 4): Tratamento com primers externos para L1H16; (7, 8, 9 e 10): PCR com primers internos para L1H16; (5 e 6) controles negativos. (B) Clones com a construção pPICZAL1H16 pcr com primers AOX: 1500pb do gene + 325pb da região AOX,

5.1.2 Análise da transcrição do gene L1 por RT-PCR

Como primeiro passo pra avaliar a expressão do gene L1 nos recombinantes de *Pichia pastoris*, a RT-PCR foi realizada com primers internos para a sequencia do gene amplificando o produto de 500pb esperado (Figura 18).

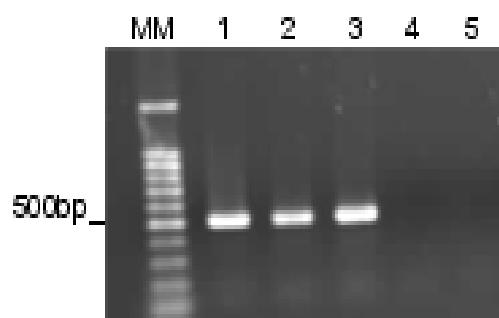


Figura 18. Gel representativo da análise da atividade transcricional do gene L1 por RT-PCR a partir de material proveniente dos recombinantes de *P. pastoris* X-33/pPICZA α L1H16 (1) (2); pPICZAL1H16 (3) controle positivo da reação (DNA do clone) (4). controle negativo (amostra de RNA pPICZA α L1H16 sem transcriptase) (5) – controle negativo (amostra de RNA pPICZAL1H16 sem transcriptase)

5.1.3 Detecção da produção da proteína L1 por SDS-PAGE

O lisado total dos clones induzidos para expressão intracelular do gene L1 dos HPVs 16 em *P. pastoris* e o sobrenadante do clone para expressão extracelular de L1 do HPV-16 foram submetidos a uma eletroforese em gel SDS-PAGE (figura 19A), para verificação da integridade das proteínas. No perfil protéico de ambos extratos não é possível identificar a proteína L1 de interesse. A eficiência de indução do sistema de expressão com células de *Pichia pastoris* foi confirmada pelo uso de linhagens controles (figura 19B) que expressam a Beta-Galactosidase (intracelular) e a albumina sérica humana-HSA (extracelular).

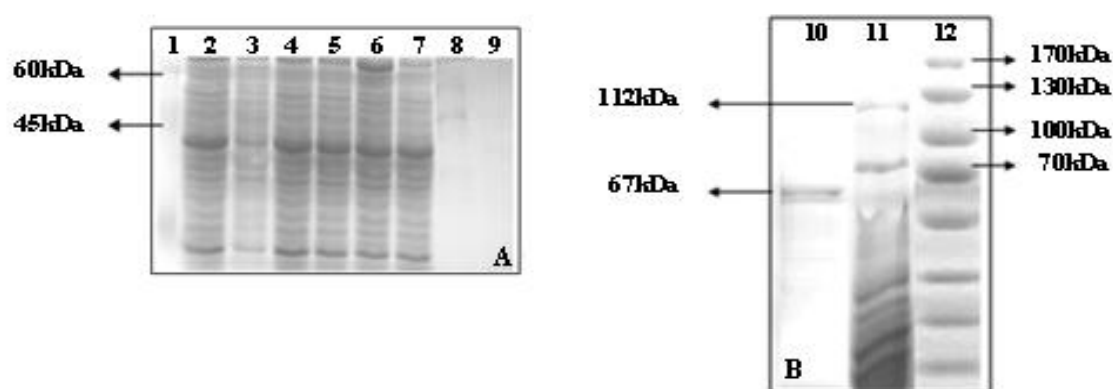


Figura 19. SDS-PAGE das proteínas dos clones de *P.pastoris*. Em A, linha 1: ColorBurst Electrophoresis Marker (Sigma); linhas 2 e 3: Lisados de clones pPICZAL1H16; na linha 7: lisado do controle negativo pPICZ; nas linhas 8 e 9: sobrenadante de pPICZ α L1H16 e controle negativo com vetor sem inserto pPICZ α , respectivamente. Em B, são mostrados os controles da expressão extracelular e intracelular, linha 10: albumina sérica humana (HSA) expressa pelo controle positivo da expressão extracelular GS115/Albumin; linha 11: beta-galactosidase expressa pelo controle positivo da expressão intracelular GS115/ β -galactosidase; linha 12: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas).

5.1.4 Detecção da produção da proteína L1 por Dot Blot

A produção da proteína L1 nas células de *Pichia pastoris* foi detectada através de ensaio de dot blot utilizando anticorpo contra a cauda de polihistidina fusionada à mesma. Os lisados dos clones de expressão intracelular mostraram as reações específicas devido à presença de L1, como mostra a figura 20.



Figura 20. Dot blot para detecção da produção intracelular de L1. As amostras foram padronizadas para uma quantidade de 0,9µg (todas as amostras foram aplicadas em duplicata), os quais foram aplicados sobre a membrana de nitrocelulose. As reações específicas com o extrato protéico intracelular dos clones, demonstrados na figura por a e b confirmam a presença da proteína L1. Em contraste, no controle negativo (c), não foi observada reação.

A produção extracelular da proteína L1 de HPV16 foi visualizada pelos clones induzidos em placa deep-well, segundo o ensaio de imunodetecção, utilizando o mesmo anticorpo contra cauda de poli-histidina (figura 21).

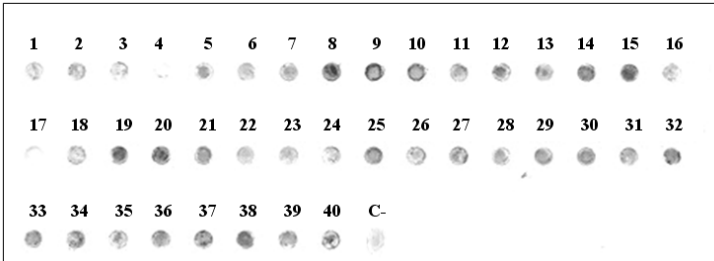


Figura 21. *Screening* da expressão de clones pPICZαL1H16. Dot blot com destaque para sinais mais intensos, indicando clones com maior poder de expressão.

Após a pré-seleção de clones em *deep well* foi realizada nova indução em frasco, de dois clones (15 e 20) para realização de novo dot blot com o sobrenadante, desta vez, quantificados pelo método de Bradford (figura 22).

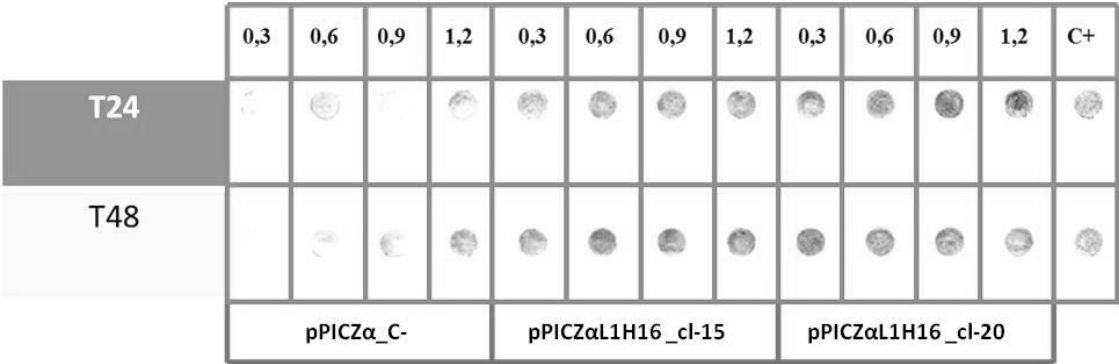


Figura 22. Dot blot para detecção da produção extracelular de L1. Os sobrenadantes foram dosados e padronizados para uma quantidade de 0,3µg, os quais foram aplicados sobre a membrana de nitrocelulose. As reações específicas dos dois clones avaliados demonstram a presença da proteína L1 no meio extracelular

6.0 DISCUSSÃO

A proposta desse trabalho foi avaliar a eficiência de expressão da proteína L1 de HPV-16 em *Pichia pastoris*, a partir do gene selvagem em vetor integrativo - um sistema mais rápido, simples e barato de produção dessa proteína, utilizando os vetores pPICZA e pPICZA α de expressão intracelular e extracelular, respectivamente. A presença do RNAm de L1 nos clones recombinantes, detectada através da RT-PCR, demonstrou a transcrição ativa do gene heterólogo, integrado no genoma de *P.pastoris*. A produção da proteína heteróloga nos clones foi confirmada através do ensaio de dot blot utilizando anticorpo específico para a cauda de poli-histidina, fusionada à mesma.

Em *Pichia*, os extratos protéicos intracelulares possuem um grande número de proteínas nativas da levedura, o perfil protéico extracelular mostra que esta levedura secreta níveis muito baixos de proteínas nativas, sendo esta característica considerada vantajosa para a purificação de proteínas heterólogas (Barr et al., 1992). Neste estudo, o resultado do SDS-PAGE indica pouca degradação protéica e a indução eficiente do promotor AOX1, confirmada pela visualização das bandas das proteínas HSA e β -Galactosidase, produzidas pelos controles da expressão extracelular e intracelular, respectivamente. A não visualização da banda de L1 em ambas situações pode estar associada ao nível de expressão desta proteína pelo sistema. Sabe-se que os níveis de expressão em frascos podem ser tipicamente mais baixos com relação àqueles obtidos quando biorreatores são utilizados, nos quais se pode controlar precisamente parâmetros como a demanda de oxigênio, concentração de metanol e pH (Chen et al, 2004). Todavia, a funcionalidade dos controles positivos (intracelular e extracelular) utilizados sob as condições de crescimento em frascos, reforça a hipótese de que o motivo da não-detecção das proteínas L1 esteja relacionado a um ou mais eventos incluídos no processo de expressão do gene heterólogo.

Apesar da levedura *Pichia pastoris* ser um dos sistemas de produção heteróloga mais aplicados para a produção comercial de várias proteínas no mundo inteiro (Cregg et al, 2000), muitas proteínas são produzidas com graus de sucesso variáveis. Porém, alguns experimentos falham em expressar o gene de interesse pelo fato do gene alvo não ter sido expresso ou pela expressão ter ocorrido em níveis baixos, insuficientes para serem evidenciados por SDS-PAGE (Porro et al, 2005). As razões pelas quais algumas proteínas têm níveis de expressão baixos ou intermediários permanecem em estudo. Para tentar contornar o problema de baixa expressão, vários trabalhos citam a

otimização de codons do gene heterólogo através do aumento no conteúdo GC e da substituição de códons raros pelos mais frequentemente utilizados em *P.pastoris*. No primeiro caso, a transcrição pode terminar abruptamente se o DNA tem uma alta proporção de bases AT (Romanos, 1995; Sreekrishna *et al*, 1997). Em um estudo relatado por Scorer *et al* (1993) com relação à produção da proteína do envelope de HIV-1, o RNAm era truncado quando expresso em *P. pastoris*, e o sítio de término era semelhante à sequência consenso de levedura 5'TTTTATA. Neste trabalho, a transcrição do gene L1 pelos clones recombinantes foi confirmada por RT-PCR, a qual detectou que muitos dos os clones testados foram positivos quanto à transcrição de RNAm de L1.

Vários trabalhos (Byrne *et al*, 2000; Valencik & McDonald, 2001; Massaer *et al*, 2001) têm mostrado que a otimização de códons pode melhorar os níveis de expressão através da substituição de códons raros para tradução eficiente em *P. pastoris*. A otimização de genes resulta em altos níveis de expressão, de acordo com vários autores, como Teng *et al* (2007), que aumentaram em 10 vezes a expressão do gene β -1, 3-1, 4 – glucanase de *Bacillus licheniformis* e Outchkourov *et al.*, (2002), que aumentaram em 20 vezes a expressão de equistatina, um inibidor de proteinase da anêmona-do-mar *Actinia equine*, ambos comparando-se à expressão do gene selvagem utilizando células de *Pichia pastoris*. Desta forma, os baixos níveis de expressão podem ser uma consequência da diferença no uso preferencial de códons em diferentes organismos. Confirmando esta hipótese Bazan *et al.*, (2009) demonstraram que a expressão da proteína L1 do HPV 16 em *P.pastoris* só foi possível após a otimização dos códons. Trabalhos anteriores também mostram a presença de fatores inibitórios, identificados entre os primeiros 514 nucleotídeos do gene L1 de HPV 16, que impedem a produção da proteína L1 em células de mamíferos (Schwartz, 2000; Collier *et al.*, 2002).

Outro ponto importante a salientar é o uso recente de diferentes promotores que podem ser mais eficazes na expressão de determinadas proteínas. Promotores constitutivos como o GAP e o PGK1 necessitam de glicose como fonte de carbono e podem atingir níveis de maior expressão do que aqueles observados com o promotor AOX1 induzível (Vassileva *et al.*, 2001; de Almeida *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2010).

A confirmação da produção intracelular e extracelular de L1 pelo sistema *Pichia pastoris* só foi possível através de um imunoensaio utilizando um anticorpo anti-his para detecção da cauda de poli-histidina (6-his) ligada à proteína. Os resultados positivos em todas as amostras analisadas sugerem que a levedura foi capaz de

expressar o gene heterólogo sob indução do promotor AOX1. O maior nível de expressão intracelular e extracelular em linhagens recombinantes de *P. pastoris* foi obtido por Hasslacher *et al.*, (1997) e Werten *et al.*, (1999) correspondendo à 22g/L e 14g/L da proteína heteróloga, respectivamente. Em relação à comparação entre as vias de expressão, muito ainda precisa ser estudado, mas ambas situações se mostram como alternativas viáveis para a produção de proteínas recombinantes.

7.0 CONCLUSÃO

Os dados apresentados neste trabalho confirmam a possibilidade de uso do sistema de expressão com células da levedura *P. pastoris* para a produção da proteína L1 do HPV tipo 16. Nossos resultados também corroboram com dados da literatura indicando que para alcançar maiores níveis de expressão são necessárias algumas otimizações, tal como a utilização do *codon usage* de *Pichia pastoris* para otimização do gene heterólogo.

8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2004). **Biologia Molecular da Célula**. Trad. Ana Beatriz Gorini da Veiga et al. -4ª.ed.- Porto Alegre: Artmed.

Alvarenga GC, Sá EMM, Passos MRL, Pinheiro VMS.(2000) Papilomavírus humano e carcinogênese no colo do útero. **J bras doenças sex transm**; 12(1):28-38.

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

Berkson, R.G.; Hollick, J.J.; Westwood, N.J.; Woods, J.A.; Lane D.P.; Lain, S. (2005) Pilot screening programme for small molecule activators of p53. **International Journal of Cancer**, New York, v. 115, n. 5, p. 701-710, Jul.

Bernard et al., H.U. Bernard, R.D. Burk, Z. Chen, K. van Doorslaer, H. zur Hausen and E.M. de Villiers.(2010). Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments, **Virology** **401** , pp. 70–79

Berumen, J.; Miranda, E. I.; Zafra, G.; Casas, L.; Segura, E.; Ordoñez, R. M.; Aguirre, J.; Martines, M.; Rosas, A.; Ibarra, V.; Pedraza, L.; Saad, A.; Marroquím, A.; Gutiérrez, M.; Martinez, A.; Gariglio, P. (1997) Epidemiologia molecular de cánceres de alta incidencia en México. **Gaceta Médica de México**.133(1):35-41.

Boettner M, Steffens C, von Mering C, Bork P, et al. (2007). Sequence-based factors influencing the expression of heterologous genes in the yeast *Pichia pastoris* - A comparative view on 79 human genes. **Journal of Biotechnology**. 130:1–10.

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

Bosch FX and Harper D (2006) Prevention strategies of cervical cancer in the HPV vaccine era. **Gynecol Oncol** 103 (1):21-24.

Breitburd, F., Coursaget, P. 1999. Human papillomavirus vaccines. **Semin Cancer Biol.** 9(6):431-44

Bryan, J. T. (2007), “Developing an HPV vaccine to prevent cervical cancer and genital warts”. ScienceDirect, **Vaccine** 25, 3001 – 3006.

Burd, E. M. (2003). “Human papillomavirus and cervical cancer”. **Clin Microbiol Rev** 16 (1), 1 – 17.

Carvalho, M. O. O.; Carestiatto, F. N.; Perdigão, P. H. et al (2005) Human Papillomavirus Infection in Rio de Janeiro, Brazil: a Retrospective Study. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, Bahia, v. 9, n. 5, p. 398-404.

Cereghino, J.L., Cregg, J.M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Review**. Vol.24, p.45-66.

Cereghino, G.P.L., Cereghino, J.L., Cregg, J.M. (2002). Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. **Current Opinion in Biotechnology**. Vol. 13, p.329-332.

Chen XS, Garcea RL, Goldberg I, et al.(2000) Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. **Mol Cell** ;5:557–67.

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

Collier B, Oberg D, Zhao X and Schwartz S. (2002). Specific inactivation of inhibitory sequences in the 5'end of the human papillomavirus type 16 open reading frame results in production of high levels of L1 protein in human epithelial cells. **J Virol**. 76: 2739-2752.

Cotran, R.S.; Kumar, V.; Collins, T. (2000). **Patologia estrutural e funcional**, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 6ª edição, 1251 p.

Da Silva, D.M.; Eiben, G.L.; Fausch, S.C.; Wakabayashi, M.T.; Rudolf, M.P.; Velders, M.P.; Kast, W.M. (2001) Cervical cancer vaccines: emerging concepts and developments. **J Cell Physiol**, 186, 169-182.

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

De villiers E.M., Fauquet C., Broker T.R., Bernard H.U, Zur Hausen H., (2004). Minireview: Heterogeneity of the human papilomavirus group. **Virology**, 324:p. 17-27.

Dillner J (1999) The serological response to papillomaviruses. **Semin Cancer Biol** 9:423–430.

Doorbar J, Foo C, Coleman N, Medcalf L, Hartley O, Prospero T, Napthine S, Sterling J, Winter G and Griffin H.(1997) Characterization of events during the late

stages of HPV-16 infection in vivo using high-affinity synthetic Fabs to E4. **Virology**, 238, 40-52.

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

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

Dupuy, C.; Buzoni-Gatel, D.; Touze, A.; Bout, D.; Coursaget, P.(1999) Nasal Immunization of Mice with Human Papillomavirus Type 16 (HPV- 16 Virus-Like particles or with the HPV- 16 L1 Gene Elicits Specific Cytotoxic T Lymphocytes in Vaginal Draining Lymph Nodes. **Journal of virology** v. 73, n. 11, p 9063 – 9071.

Fedrizzi, E. N.; Carvalho, N. S.; Villa, L. L. et al.(2004) Pesquisa da Prevalência Papilomavirus Humano em Amostras de Tecido Endometrial Normal e com Carcinoma pela Técnica de PCR. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, RJ, v. 26, n. 4, p. 277-287.

Ferlay J, Bray F, Pisani P. Globocan 2002: Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide, version 2.0: IARC **Cancer Base** no. 5. Lyon: IARC Press; 2004.

Ferlay, A.; Charret, C.; Galitzky, J.; Berlan, M.; Chilliard, Y. (2001) **J Anim Sci.** 79(2):453-62.

Ferreira, W., Souza, J. (2002) **Microbiologia**. volume 3. LIDEL, Lisboa.

Fisher S.G., (1994). Epidemiology: A tool for the study of human papillomavirus relatecarcinogenesis. **Intervirology**, 37:p. 215-225.

Franco, E.L.(1995) Epidemiologia do câncer mamário ginecológico. In.Abrão, F.S. - **Tratado de Oncologia Genital e Mamária**, 1a ed. São Paulo, Ed. Roca, pp. 3-16.

Franco EL, Harper DM.(2005) Vaccination against human papillomavirus infection: a new paradigm in cervical control. **Vaccine**;23:2388-94.

Hanning,G.; Makrides, S.C. Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. **Trends Biotechnol.**, 16:54-60,1998.

Hasslacher M, Schall M, Hayn M, Bona R, Rumbold K, Luckl J, Griengl H, Kohlwein SD, Schwab H (1997) High level intracellular expression of hydroxynitrile lyase from the tropical rubber tree *Hevea brasiliensis* in microbial hosts. **Protein Expr. Purif.** 11, 61-71

Garcia-Carracá, A. (2003). “Vaccines against human papilomavirus and perspectives for the prevetion and control of cervical cancer”. **Salud Pública de México**, vol. 45, S437 – S442 p.

Gasparic, M. *et al.*, (2007). Prophylactic DNA immunization against multiple paillomavirus types. **Vaccine** 25. P. 4540-4553,.

Gellissen, G. (2000) Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. **Applied Microbiology ans Biotechonology**. Vol. 54 (6), p; 741-750.

Gellissen, G. (2005). Production of recombinant protein – Novel Microbial and Eukaryotic Expressin Systems. Wiley-VCH.

Gompel, C.; Koss, L. (1990) **Citologia ginecológica e suas bases anatomoclínicas**. 1ª ed. São Paulo, Manole, p.79-105, 1997. 34(2):286-287.

Gross, G.E. & Barrasso, R. (1999) Infecção por Papilomavírus Humano Atlas Clínico de HPV; trad. Maria Alice Guimarães. Porto Alegre. **Editora Artes Médicas Sul Ltda.**, 431p.

Gurkan C, Ellar DJ (2005) Recombinant production of bacterial toxins and their derivatives in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Microbial Cell Factories**. 4:33.

Hollenberg, C.P., Gellisen, G. (1997). Production of recombinant proteins by methylotrophic yeasts. **Current opinion in biotechnology**. Vol. 8(5): 554-560.

Jeon S, Allen-Hoffmann BL, Lambert PF: Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. **J Virol** 1995;69:2989-2997.

Jordão, A. V.; Ruggeri, L. S.; Chiucheta, G. I. R. et al (2003) Importância da aplicação de critérios morfológicos nãoclássicos para o diagnóstico citológico de papilomavírus humano. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, RJ, v. 39, n. 1, p. 81-89.

Kirnbauer R, Booy F, Cheng N, Lowy DR and Schiller JT (1992) Papillomavirus L1major capsid protein selfassembles into virus-like particles that are highly immunogenic. **Proc Natl Acad Sci USA** 89:12180–12184.

Kirnbauer R, Taub J, Greenstone H, Roden R, Durst M, Gissmann L, Lowy DR and Schiller JT (1993) Efficient self-assembly of human papillomavírus type 16 L1 and L1L2 into vírus-like particles. **J Virol** 67: 6929 -6936.

Kisseljov, F. L. (2000). “Virus-associated human tumors: cervical carcinomas and papillomaviruses”. **Biochemistry** 65(1), 68 – 77.

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

Lai, W.B.; Middelberg, A.P.J.; (2002). The production of human papillomavirus type 16 L1 vaccine product from *Escherichia coli* inclusion bodies. **Bioprocess biosyst.** 25: 121-128

Lechmann, M.; Murata, K; Satoi, J.; Vergalla, J. (2001) Hepatitis C virus-like particles induce virus-specific humoral and cellular immune responses in mice. **Hepathology Volume 34, Issue 2 , Pages 417 – 423.**

Li M, Cripe TP, Estes PA, et al.(1997) Expression of the human papillomavirus type 11 L1 capsid protein in *Escherichia coli*: characterization of protein domains involved in DNA binding and capsid assembly. **J Virol** ;71:2988–95.

Li, M.; Beard, P.; Estes, P.A.; Lyon, M.K.; And Garcea, R.L.; (1998). Intercapsomeric disulfide bonds in papillomavirus assembly and disassembly. **J. Virol.** 72: 2160-2167

Li N. Li, S. Franceschi, R. Howell-Jones, P.J.F. Snijders and G.M. Clifford, (2011). Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: variation by geographical region, histological type and year of publication. **Int. J. Cancer** **128** , pp. 927–935.

Linhares AC.; Villa LL (2006) Vacinas contra rotavírus e papilomavírus humano (HPV) **J. Pediatr.** (Rio J.) vol.82 no.3 suppl. Porto Alegre

Lorenzato F.; Ho L.; Terry G.; Singer A.; Santos L.; De Lucena Batista R.; Lubambo T. (2000). **Int J Gynecol Cancer** **10**(2):143-150.

Martinelli, A.H.S (2007) Expressão da urease única de soja em *Escherichia coli*. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS

Mahdavi, A.; Monk, B. J. (2005). Vaccines Against Human Papillomavirus and Cervical Cancer: Promises and Challenges. **The Oncologist**, USA, v. 10, p. 528-538.

McLachlin, C.M. & Crum, C.P. (2001). Papillomaviruses and Cervical Neoplasia In: Bast, R.C.; Kufe, D.W.; Pollock, R.E.; Weichselbaum, R.R; Holland, J.F.; Frei, E. **Câncer Medicine**. 5th edição. Canada BC Decker inc.

McMurray, H.R. et al. (2001). Biology of human papillomaviruses. **Int J Exp Path**, v.82, p.15-33.

Middleton K., Peh W., Soutren S.A., Griffin H.M., Sotlar K., Nakahara T, et al.(2003). Organization of the human papillomavirus productive cycle during neoplastic

progression provides a basic for the selection of diagnostic markers. **Journal Virology**. 77:p. 10186-10200.

Mitchel, M.F., Hittelman, W.N., Hong, W.K., (1994). The natural history of cervical intraepithelial neoplasia: an argument for intermediate endpoint biomarkers. **Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.** 3, 619–626.

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

Morton, C. L. & Potter, P. M.(2000) “Comparison of *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Spodoptera frugiperda*, and COS7 cells for recombinant gene expression”. Application to a rabbit liver carboxylesterase, **Mol biotechnol** 16, 193 – 202.

Moscicki, A. B. et al. (2006). Chapter 5: “Updating the natural history of HPV and anogenital cancer”. Aug 21, 24 Suppl 3, S42 – 51.

Muñoz N., Bosch F.X., Sanjosé S., Herrero R, Castellsagué, X., Keerti V.S., Snijders P.J.F., Meijer C.J.L.M. (2003). For the International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus type associated with cervical cancer. **N Engl J Med**, 348: p. 518-27.

Muñoz N, Castellsagué X, González AB and Gissmann L (2006) Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine** 24 (S3):S1-S10.

Myers G., Bernard H.U., Delius H., Icenogel, J., Van Rast M., Wheeler C., editors. (1994). Human papillomaviruses a compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences. 1 st ed. Los Alamos, USA: Theoretical Biology and biophysics group T-10, **Los Alamos National Laboratory**.

Nadal, S. R. & Manzione, C. R. (2006). “Vacinas contra o papilomavírus humano”. **Revista brasileira de coloproctologia**, vol. 26, nº3, 337 – 341.

Noad, R., Roy, P., 1999. Virus-like particle as immunogens. **TRENDS in microbiology**. 11(9): 438-444.

Nonnenmacher B, Breitenbach V, Villa LL, Prolla JC, Bozzetti MC.(2002) Identificação do papilomavírus humano por biologia molecular em mulheres assintomáticas. **Rev Saude Publica**; 36:95-100.

Noronha V.; Mello W.; Villa L.; et al. (1999). **Rev Soc Bras Med Trop**. 32(3):235-40.

Oliveira-Ferreira, J.; Myahiray.; Layton, G.; Savage, N.; Esteban, M.; Rodriguez, D.; Rociiguez, J. (2000). Immunogenicity of Ty-VLP bearing a CD8⁺ T cell epitope of the CS protein of *P. yoelii*: enhanced memory response by boosting with recombinant vaccinia virus. **Vaccine**, Volume 18, Issue 25, 15 June, Page 2923

Ostor, A.G., (1993). Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. **Int. J. Gynecol. Pathol.** 12, 186–192.

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

Ozbun M (2002) Infectious human papillomavirus type 31b: purification and infection of an immortalized human keratinocyte cell line. **J Gen Virol** 83:2753-2763.

Palker, T.J., Monteiro, J.M, Martin, M.M., Kakareka, C., Smith, J.F., Cook, J.C., Joyce, J.G., and Jasen, K.U., (2001) Antibody, cytokine and cytotoxic T lymphocyte responses in chimpanzees immunized with human papillomavirus virus-like particles. **Vaccine** 19 (27): 3733-43

Pereiyra EAG; Parellada CI. (2003) Entendendo melhor a infecção pelo Papilomavírus Humano. Manual Schering.

Pérez-López FR (2003) virus del papiloma, condilomas verrugosos, CIN, SIL y cancer genital. Gine Web Ginecologia www.unizar.es/gine/gin301.htm.

Pinto, P. A. (2002) Etiopatogenia do Câncer Vulvar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, RJ, v. 38, n. 1, p. 55-58.

Pinto, A. P.; Tulio, S.; Cruz, O. R. (2002) HPV co-factors in cervical carcinogenesis. **Rev. Assoc. Med. Bras.** v. 48, n. 1, p. 73-78.

P. Pisani, D.M. Parkin, F. Bray, J. Ferlay. (1999) Erratum: estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990, *Int. J. Cancer* 83 (1999) 18–29. **Int. J. Cancer** 83 870–873..8.0

Pisani, D.M. Parkin and J. Ferlay (1993) Estimates of the worldwide mortality from eighteen major cancers in 1985. Implications for prevention and projections of future burden, **Int. J. Cancer** 55, pp. 891–903 Prives, C., Manfredi, J.J. (1993) The p53 tumor supressor protein: meeting review. **Genes & Development**, 7:529-534.

Prinz, *et al.* **J. Biol. Chem.** 272, p. 15661–15667, 1997.

Pfister H. (1989). General introduction to papillmaviruses. *In: Pfister H. ed. Papillmaviruses and human cancer. Boca Raton, Florida CRC Press.*

Phe W.L., Middleton K, Christensen N., Nicholls P., Egawa K, Sotlar K, et al., (2002). Life Cycle heterogeneity in animal models of human papillomavirus-associated disease. **J Virol**, 76:p10401-10416.

Porro D, Sauer M, Branduardi P and Mattanovich D. (2005). Recombinant protein production in yeasts. **Mol Biotechnol**. 31: 245-259.

Rabelo-Santos SH, Zeferino L, Villa LL, Sobrinho JP, Amaral RG, Magalhães AV. (2003) Human papillomavirus prevalence among women with cervical intraepithelial III and invasive cervical cancer from Goiânia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98(2): 181-184.

Rapp, L.; chen J. (1998). The papillomavirus E6 proteins. **Bioch Biophys Acta**, v.1378, p. F1-19.

Rivoire, W. A., Capp, E., Corleta, H. E. e Silva, I. S. B.(2001) Bases Biomoleculares da Oncogenese Cervical. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 47(2): 179-84

Rivoire, W. A. et al. (2006). “Biologia molecular do câncer cervical”. **Revista Brasileira de Saúde Materno-Infantil**, Recife 6(4): 447-451.

Romanos, M. (1995). Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level expression. **Current opinion Biotechnology**, 6:527-533.

Rose RC, Reichman RC, Bonnez W. (1994) Humanpapillomavirus (HPV) type 11 recombinant virus-like particles induce the formation of neutralizing antibodies and detect HPV-specific antibodies in human sera. **J Gen Virol**; 75(PT 8):2075–9.

Rose RC, White WI, Li M, et al.(1998) Human papillomavirus type 11 recombinant L1 capsomeres induce virus-neutralizing antibodies. **J Virol** 1998;72:6151–4.

Russel, C., Mawson, J., Yu, P.L. (1991). Production of recombinant products in yeasts: a review. **Aust J biotechnol**. Vol.5:p. 48-55.

Saluta, M. & Bell, P.A Troubleshooting GST fusion protein expression in *E.coli*. **Amersham Biosciences**. 1998

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

Schwartz S. (2000). Regulation of human papillomavirus late gene expression. **Upsala J Med Sci**. 105: 171-192.

Schwartz S. (2000). Regulation of human papillomavirus late gene expression. **Upsala J Med Sci.** 105: 171-192.

Scorer, CA., Clare, JJ., McCombie, WR, Romanos, MA., Sreekrishna, K. (1993). Rapid Selection Using G418 of High Copy Number Transformants of *Pichia pastoris* for High-level Foreign Gene Expression. **Bio/Technology** 12:181-184

Scully, C. (2002). Oral squamous cell carcinoma; from an hypothesis about a virus, to concern about possible sexual transmission. **Oral Oncology**, v.38, p.227-234.

Sreekrishna, K., Brankamp, R.G., Kropp, K.E., Blankenship, D.T., Tsay J., Smith, P.L., Wierschke, J.D., Subramaniam, A., Birkenberger, L.A. (1997). Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Gene**, 190:55-62.

Silva, A. M. T., Amaral, M. V. T., Cruz, A. D. (2003). “HPV e Câncer: O papel do papilomavírus humano na carcinogênese”. **Biotechnol Ciênc Desenvol** 29, 48 – 54.

Slebos RJ, Kesis TD, Chen AW, Han SM, Hedrick L, Cho KR. (1995) Functional consequences of directed mutations in human papillomavirus E6 proteins: abrogation of p53-mediated cell cycle arrest correlates with p53 binding and degradation *in vitro*. **Virology**;208: 11-20

Smith, D.B. & Johnson, K.S. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione-S-transferase. **Gene** 67:31-40. 1998

Schmidt, F.R. (2004). Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. **Appl Microbiol Biotechnol** 65: 363-372.

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

Stanley M.A. (2002). Human papillomavirus vaccines. **Curr Opin Mol Ther.** 4:15-22.

Stanley M, Lowy DR, Frazer I. (2006) Chapter 12: prophylactic HPV vaccines: underlying mechanisms. **Vaccine**; 24(Suppl 3):S106–13.

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

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

Stewart A.M., Eriksson A.M, Manos M.M., Muñoz N., Bosch F.X., Peto Wheler C.M. (1996). Intratype variation in 12 human papillomavirus types: A worldwide perspective. **J Virol**, 70(5):p. 3127-3136.

Sugerman, P.B; Shillito, E.J. (1997). The risk human papillomaviruses and oral cancer: evidence for and against a causal relationship. **Oral Dis**, v.3, p.130-147.

Summersgill, K.F. *et al.* (2000). P53 Polymorphism, human papillomavirus infection in the oral cavity, and oral cancer. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Endodontic**, v.90, n.3, p.334-339.

Syrjanen, K., Kataja, V., Yliskoski, M., (1992). Natural history of cervical human papillomavirus lesions does not substantiate the biologic relevance of the Bethesda System. *Obstet. Gynecol.* 79, 676–682.

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

Tacket, C; Sztein, MB; Losonsky, GA; Wasserman, SS; Estes, MK. (2003). Humoral, mucosal and cellular immune responses to oral Norwalk virus-like particles (VLP) in volunteers. **Clinical Immunology**, 108, p.241-247, 2003.

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

Terai, M.. Takagi, M. (2001). Human papillomavirus in the oral cavity. **J Oral Pathol Med**, v. 6, p.1-12.

Van der Graaf Y, Molijn A, Doornewaard H, Quint W, van Doorn LJ, van den Tweel J. (2002) Human papillomavirus and the long-term risk of cervical neoplasia. *Am J Epidemiol*; 156:158-64.

Vassileva A, Chugh DA, Swaminathan S, Khanna N (2001). Expression of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* using the GAP promoter **J Biotechnol**. 88(1):21-35.

Villa, L.L (1997). Human papillomaviruses and cervical cancer. **Advanced Cancer Resource**. V.71, p.321-341.

Villa LL. (1998). Aspectos moleculares da oncogênese por papilomavírus. In: Bibbo M, Silva Filho MAS, editores.. Lesões relacionadas à infecção por HPV no trato anogenital. Rio de Janeiro: Revinter. p. 51-7.

Villa, L. L. (2003). “Vaccines against papillomavirus infections and disease”. **Salud Pública México**, vol. 45, S443 – S448.

Villa LL. (2006). Prophylactic HPV vaccines: reducing the burden of HPV-related diseases. **Vaccine**. 24 Suppl 1:S23-8.

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

Zheng, Z. M.;Baker, C. C. (2006) Papillomavirus genome structure, expression, and posttranscriptional regulation. **Front Biosci**, v.11, p.2286-2302.

Zur Hausen H. (1976) Condyloma acuminata and human genital cancer. **Cancer Research** 36:p. 530.

Zur Hausen, H. (2000). “Papillomaviruses causing cancer: Evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis”. **J. Natl, Cancer Inst.**, 92, 690 – 698.

Zur Hausen, H. (1996). Papillomaviruses infection – a major cause of human cancers. **Bioch Biophys Acta**, v. 1288, p.F55-F78.

Zur Hausen, H. (1999). Papillomaviruses in Human Cancers. **Proc Assoc Am Phys**, v.III, n.6, p.581-587, 1999.

Zur Hausen, H. (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nature**, v.2, p. 342-350. Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM *et al.* (1999) Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **J Pathol**; 189: 12–19.

Watson ,JD., Baker TA., Tania A., Bell SP., Gann A., Levine M., Losick R. (2006). **Biologia Molecular do Gene**. Trad. Luciane Passaglia e Rivo Fischer. -5° ed- Porto Alegre: Artmed.

Werten MW, van den Bosch TJ, Wind RD, Mooibroek H, de Wolf FA (1999) High-yield secretion of recombinant gelatins by *Pichia pastoris*. **Yeast** 15:1087–1096.

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

World Health Organization, Department of Vaccines and Other Biologicals and International Agency for Research on Cancer. The current status of development of prophylactic vaccines against human papillomavirus infection: report of a technical meeting, 16-18 February, 1999, Geneva, Switzerland. 1999. Geneva, Switzerland, World Health Organization.

Yamada T, Manos MM, Peto J, Greer CE, Munoz N, Bosch FX, Wheeler CM.(1997) Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. **J Virol** 71(3): 2463-2472.

Ylitalo N, Sorensen P, Josefsson AM, Magnusson PK, Andersen PK, Ponten J, et al. (2000) Consistent high viral load of human papillomavirus 16 and risk of cervical carcinoma in situ: a nested case control study. **Lancet**. 355(9222):2194-8.

Yuan H, Estes PA, Chen Y, Newsome J, Olcese VA, Garcea RL, et al. (2001) Immunization with a pentameric L1 fusion protein protects against papillomavirus infection. **J Virol**;75(17):7848–53.

9. ANEXO

BJMBR 1411-URGENTE

DE: [Brazilian Journal of Medical and Biological Research](#)

PARA: acf_ufpe@yahoo.com.br

Terça-feira, 30 de Agosto de 2011 11:17

BJMBR 1411 - Production of L1 protein from different types of HPV in *Pichia pastoris* using an integrative vector .

E.C. Coimbra, F.B. Gomes, J.F. Campos, M. D'arc, **J.C. Carvalho**, Mariz F.C., A.L.S. Jesus, R.C. Stocco, W. Beçak, A.C. Freitas

Prezado Dr. Antonio Carlos Freitas ,

Temos a satisfação de informar que seu trabalho foi aceito para publicação no Brazilian Journal of Medical and Biological Research.

Atenciosamente,

Dr. Lewis Joel Greene

Dr. José Antunes Rodrigues

Dr. João Batista Calixto

Editores

Brazilian Journal of Medical and Biological Research

bjournal@terra.com.br

<http://www.bjournal.com.br>

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

E.C. Coimbra¹, F.B. Gomes¹, J.F. Campos¹, M. D'arc¹, J.C. Carvalho¹, Mariz F.C.¹,
A.L.S. Jesus¹, R.C. Stocco², W. Beçak², A.C. Freitas¹

¹Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental, LEMTE, Departamento de Genética, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

²Laboratório de Genética, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brasil

Corresponding author:

Antonio Carlos de Freitas

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

Telephone number: (081) 21268569

Email: acf_ufpe@yahoo.com.br

Acknowledgment: Research supported by FACEPE/PPSUS-2008 (number APQ-1373-4.00/08); CAPES.

Key words: Human papillomavirus, cervical cancer, *Pichia pastoris*, L1.

Running Title: Production of human papillomavirus L1 protein in *Pichia pastoris*

Abstract

HPV infection is the most common sexually transmitted disease in the world and is related to the etiology of cervical cancer. The most common high-risk HPV types are 16 and 18, however, the Midwestern region of the Brazil presents as the second most

prevalent type, HPV-33. New vaccine strategies against HPV have shown that virus-like particles (VLPs) of the major capsid protein (L1) induces efficient production of antibodies which confer protection against the same viral type. The methylotrophic yeast *Pichia pastoris* is an efficient and inexpensive expression system to produce high levels of heterologous proteins stably using wild type gene in combination with integrative vector. It was recently demonstrated that *P. pastoris* can produce HPV-16 L1 protein by use of an episomal vector associated with the optimized L1 gene, however the use of episomal vector is not appropriate for protein production in an industrial platform. In the present study, the produced vectors were integrated into *Pichia* genome and the results were positive for L1 gene transcription and protein production, both intracellularly as in the extracellular environment. Despite the great potential of expression related to *P. pastoris* system, our results suggest a low yield of L1 recombinant protein, which does not make this system unworkable, since the achievement of stable clones containing the expression cassettes integrated in the genome, allows optimizations that will enable the establishment of a platform for the production of VLP-based vaccines.

Introduction

HPV infection is the most common sexually transmitted disease in the world and is related to the etiology of cervical cancer. Approximately 500.000 new cases of cancer are diagnosed each year with a mortality rate of 50% (1). Latin America, Sub-Saharan

Africa and Asia (South and Southeast) comprise the regions with the highest incidence (2). Featured in more than 120 types, 16 and 18 are the most prevalent HPV types responsible for 70% of cervical cancer cases (3). However, the prevalence of HPV types found in cervical cancer shows geographical variations worldwide (4). In Brazil, HPV type 16 is also the most frequent, but there are variations according to region in relation to the second most frequent type. In the Northeast and Midwest, HPV type 31 and 33 have the higher incidence (5), while in other regions such as Southeast, HPV-18 is the second most frequent type among cervical cancer cases (6).

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

The methylotrophic yeast *Pichia pastoris* is an efficient and inexpensive expression system to produce high levels of heterologous proteins. More than 550 proteins have been produced, in this yeast (13), including those used as subunit vaccines against viruses, such as surface antigen of hepatitis B and glycoprotein D of bovine herpesvirus (14). *Pichia pastoris* is the second more used system for heterologous expression, after the bacteria *Escherichia coli* (15). Several factors contribute to this fact: the system uses the inducible *AOX1* promoter, which encodes the alcohol oxidase 1 gene. The promoter is repressed by glucose and strongly induced by methanol. The possibility to improve post-translational modifications typically associated with higher eukaryotes and required for the biological activity of proteins (16) and the easy

adaptation for large scale fermentation, until expression levels are remarkable advantages of this system (17).

It was recently demonstrated the viability of *P. pastoris* for HPV-16 L1 protein production by the use of an episomal vector associated with the optimized L1 gene (18). However, the use of episomal vector is not appropriate for protein production in large scale in an industrial platform. Since the expression system based on episomal vector is not ideal for industrial-scale production (19,20) and the expression system based on *Pichia pastoris* yeast cells have been used successfully to express different heterologous genes through integrative vector, and without codon optimization (16), the aim of this study was evaluate the viability of the expression the wild type L1 gene, from different human papillomavirus (types 16, 18 and 33) in *Pichia pastoris* cells using an integrative vector.

Material and methods

Cloning of the L1 gene of HPV 16, 18 and 33 in expression vectors

The pBR322H16 and pBR322H18 plasmids containing the complete genome of HPV-16 and 18, respectively, were used for PCR of L1 gene. The HPV-33 L1 gene was amplified through clinical sample. The primers were constructed based on gene sequences for L1 of HPV-16, 18 and 33, deposited in databases (*GenBank accession numbers*; *gi*: 27752860, *gi*: 194272988 and *gi*: 333049, respectively). The consensus sequence for translation in yeast (*Kozak sequence*) was added to the forward primer sequences as well as

the restriction sites in the 5' end for insertion into pPICZA vector (*KpnI* for the primer sequence of HPV-16 and *BstBI* for the primer sequences of HPV-18 and 33) and pPICZαA vector (*KpnI* for the primer sequence of HPV-16). In the forward primer for insertion of the

HPV-16 L1 gene in pPICZ α A vector was not necessary to add *Kozak sequence* by the presence of the secretion factor in this vector. The expression vectors were obtained by the EasySelect™ *Pichia pastoris* expression kit, Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). The reverse primers included a restriction site for *SalI* (HPV-16 primer sequence) and *XhoI* (HPV 18 and 33 primers sequences). The stop codon of the L1 gene was removed in order to promote the link of the poly-histidine (6x-His) tag, present in the vectors (table 1).

The clones in *E. coli* TOP 10 were obtained by transformation with CaCl₂ (21) and selected on Low Salt LB medium (1% Tryptone, 0.5% Yeast Extract, 0.5% NaCl, 2% agar) with zeocin™ (due to the presence of the *Sh ble* gene in the vectors that confers resistance to this antibiotic). Confirmation of recombinants was performed by PCR, restriction enzyme digestion and sequencing.

Transformation of *Pichia pastoris*

The pPICZL1H16, pPICZL1H18, pPICZL1H33 and pPICZ α L1H16 constructs were linearized with *SacI* enzyme to transform the *P. pastoris* X-33 strain by electroporation (according to the protocol of multiporator Eppendorf). The pPICZA and pPICZ α A vectors without the L1 gene were also integrated into the X-33 strain in order to obtain negative controls for the expression of intracellular and extracellular, respectively. Aliquots of 50, 100 and 200 μ L were spread on YPDS plates (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose, 1M sorbitol, 2% agar) containing 100 μ g/mL zeocin for incubation at 30°C for 2-3 days. The detection of clones was performed by colony PCR with the conditions and primers provided in EasySelect™ *Pichia pastoris* expression kit. The primers used for detection anneal in the flanking regions of the insert (AOX1 and α -factor) and can be seen in table 2.

Induction of L1 gene expression in *Pichia pastoris* cells

The selected clones were induced together with the positive control strains of the intracellular (GS115/ β -galactosidase) and extracellular expression (GS115/Albumin), provided in EasySelect™ *Pichia pastoris* expression kit. The colonies were inoculated in BMGY (1% yeast extract, 2% peptone, 100 mM potassium phosphate, pH 6.0, 1.34% YNB, 4×10^{-5} % biotin and 1% glycerol) to obtain biomass per 16 - 24 h at 28-30°C. After growth has reached an OD₆₀₀ of 10-20, medium with glycerol was removed by centrifugation for adding BMMY (1% yeast extract, 2% peptone, 100 mM potassium phosphate, pH 6.0, 1.34% YNB, 4×10^{-5} % biotin and 0.5% methanol). In the subsequent 24 hours (until 96 h) methanol (inducer of the *AOX1* promoter) was added to achieve a final concentration of 1% -2%. A number of 40 clones with the pPICZ α L1H16 construction and the pPICZ α A only (used as a negative control) were induced in deep-well plate with 1 mL of BMMY medium for 72h for analysis of extracellular expression. The clones of intracellular expression (approximately 90), as well as the negative control (with the pPICZA only), were induced (with conditions already described) in 500 mL flasks containing 50mL of medium. For subsequent analysis of L1 gene expression, samples were taken from cultures every 24 hours, including aliquots of supernatants and pellets stored at -80°C.

Transcription analysis of the L1 gene

The total RNA extraction from recombinant clones (X33/pPICZL1H16, X33/pPICZL1H18, X33/pPICZL1H33 and X33/pPICZ α L1H16) was performed by acid-phenol method (22). The cDNA of the three types of HPVs was synthesized using the IMPROM-II™ Reverse Transcription System from Promega (Madison, WI, USA). The presence of heterologous gene mRNA in *Pichia* was detected by RT-PCR with primers that anneal in the internal sequence of the L1 genes (Table 3), amplifying a region of 500 bp.

Detection of L1 protein

The analysis of L1 protein production was performed by comassie stained SDS-PAGE (12.5%) and by dot blot immunoassay. The intracellular proteins were obtained by lysis with glass beads and the supernatants, for analysis of extracellular expression, was obtained by centrifugation of induced culture. The samples were quantified by the Bradford method (23) and subjected to a dot blot protocol that consisted of: ligation of protein (0.9 µg) in nitrocellulose membrane for 1h; wash with 1xPBS (50mM potassium phosphate, 150mM NaCl; pH 7.2) for 5 min; blocking with 2.5% milk for 40 min; addition of anti-6xHis antibody alkaline phosphatase-conjugated (Sigma) diluted 1:10.000 in 5% milk for incubation at 37°C for 1 h; three washes with 1xPBS-0,05%Tween (10 min each) and revelation with NTB/BCIP (Sigma).

Results

Cloning of L1 gene for expression in *P. pastoris*

The constructs named by pPICZL1H16, pPICZL1H18, pPICZL1H33 and pPICZαL1H16 were confirmed by PCR (figure 1). The integration of these expression cassettes into the *Pichia* genome was verified with primers which anneal to flanking regions of the cloning site in the vector. The results show (figure 2), that constructs were successfully inserted in the expression system and that the expression cassettes were integrated into the *Pichia* genome. The pattern of amplification shows that were obtained

clones with the Mut^s and Mut⁺ phenotypes, due to a double crossover events (replacements) and single crossover events (insertions) that can occur in gene insertions at the *AOX1* locus, respectively.

L1 gene expression in *Pichia pastoris* cells

Transcription analysis by RT-PCR

After induction of L1 gene expression in all tested clones, total RNA was extracted for cDNA synthesis and subsequent amplification by RT-PCR. The result was the expected fragment of 500 bp (figure 3) confirming the transcription of the L1 gene of the three HPV types in *Pichia pastoris* cells.

Analysis of L1 protein production

The total lysate of the induced clones (after 96 h) for intracellular expression and the supernatants of the clones for extracellular expression were subjected to SDS-PAGE (Figure 4A) to verify the integrity of proteins. In the protein profile of both extracts is not possible to identify the L1 heterologous protein. The efficiency of induction of the expression system was confirmed by the use of *Pichia* control strains (Figure 4B) that express heterologous proteins such as the beta-galactosidase (intracellular) and the human serum albumin-HSA (extracellular).

The L1 protein production in *Pichia pastoris* was detected by dot blot assay using antibody against the poly-His tag. The lysates of the intracellular expression clones showed specific reactions due to the presence of L1, as shown in Figure 5.

The dot blot to evaluate the extracellular expression of HPV-16 L1 protein was based on the screening of many induced clones in deep-well plate for detection of the more efficient (Figure 6A). After pre-selection, two clones (15 and 20) that showed intense reactions, as well as the strain used as negative control were induced in shake flasks. The culture supernatants quantified by Bradford method for standardization of the samples were submitted to a new dot blot (Figure 6B).

Discussion

The aim of this study was to evaluate the possibility of expressing the L1 gene of different HPV types (16, 18 and 33) in *Pichia pastoris* yeast cells for the production of the L1 major capsid protein using integrative vectors. The expression of L1 gene was

confirmed for all three HPV types. The presence of L1 mRNA in recombinant clones, detected by RT-PCR demonstrated active transcription of the gene integrated into the *P. pastoris* genome. The production of heterologous protein in the clones was confirmed by dot blot assay using specific antibody against poly-Histidine tag.

The integration of pPICZL1H16, pPICZL1H18, pPICZL1H33 and pPICZαL1H16 expression cassettes in the AOX1 region of *P. pastoris* genome was detected. The *Pichia* recombinants can present phenotypes denominated Mut⁺ or Mut^s according to the type of vector integration in *Pichia* (16). In this work all analyzed clones, except the X33/pPICZL1H33 recombinant, showed the Mut^s phenotype. In contrast, the clone with the HPV-33 L1 gene presented the Mut⁺ phenotype. The choice of phenotype varies by the type of protein expressed, so there are studies that have been successful with Mut⁺ (24) or with Mut^s (25), and also those which found no significant differences. In our work under the conditions of growth and induction performed, there were no significant differences; however were not realized detailed analysis about this theme. More elaborated studies are being developed.

The methylotrophic yeast *Pichia pastoris* has developed into a highly successful system for the production of a variety of heterologous proteins. However, many proteins have been produced with varying degrees of success. There are still some failed trials caused by several factors (26,27), including the target gene not being expressed at all in the selected expression system and the expression level being too low to be evidenced by SDS-PAGE or function-based assay because the available characterization method is inconvenient in practice. The reasons related to different levels of protein expression remain unknown. According to a study reported by Scorer et al. (28) with respect to production of the HIV-1 envelope protein, the mRNA was truncated when expressed in *P. pastoris*, and the site of termination was similar to the yeast consensus sequence

(5'TTTTATA). In studies in which AT-rich regions of heterologous genes were removed, there was an increase in the levels of expression in *Pichia* (29), confirming that the high proportion of AT bases in DNA disrupts the gene transcription and consequently affects protein production. In this study, the L1 gene transcription by the recombinant clones was confirmed by RT-PCR, which showed that all tested clones were positive for the transcription of L1 mRNA.

Pichia pastoris has a large number of intracellular native proteins, unlike the low levels of extracellular proteins which are considered an advantageous characteristic for the purification of heterologous proteins (30). In this study, the SDS-PAGE indicates that there was not much protein degradation and that the *AOX1* promoter was efficient induced since the HSA and beta-galactosidase proteins (expressed by *Pichia* control strains) were visualized. Failure to visualize the L1 protein in both situations (intra and extracellular pathways) may be associated with a low expression level. It is known that levels of expression in shake flasks can be typically lower compared with those obtained when bioreactors are used, in which parameters such as oxygen demand, methanol concentration and pH are precisely controlled (31). However, the functionality of the positive controls (intracellular and extracellular) in this study used under the conditions of growth in shake flasks, suggests that the reason for the non-detection of L1 protein may be related to one or more genetic events included in the heterologous expression.

Some reports have shown that gene codon optimization can improve the expression levels in *P. pastoris*, comparing with wild type gene expression. According to Teng et al. (32), for instance, the optimization of *Bacillus licheniformis* β -1,3-1, 4-glucanase gene increased 10-fold the expression in *P. pastoris*. However, according to Higgins & Cregg (33), there is a 50-75% probability of *Pichia pastoris* system to

produce foreign proteins at a reasonable level without the need of optimizations, such as the synthesis of the gene using the yeast codon usage. Since 1984 different proteins have been well expressed in *P. pastoris* and several studies demonstrate the strong and intrinsic *Pichia* ability for expressing heterologous genes without optimizations (14,26,34).

Bazan et al. (18) demonstrated that, using the episomal vector, the production of HPV-16 L1 protein in *P. pastoris* was only possible after codon optimization of the L1 gene. It is known that for a large-scale production, episomal vectors would not be advantageous, because the transformed yeast can lose these vectors after successive mitotic divisions because as they are not integrated into the genome and thus can be lost in the absence of selection pressure. The need of antibiotics for the maintenance of these clones raises the costs of production and may disagree with the rules imposed by regulatory agencies (35). So, to be able to produce L1 protein on an industrial scale (vaccine production) it's important obtain stably clones expressing L1 gene and a manner to do this is to use integrative vectors. In addition, the use of an integrative vector may favor the integration of more than one copy of heterologous gene, which in many cases increases the protein production (36). This event can occur naturally and is another advantage of using integrative vectors allowing to obtain clones that overexpress the desired protein. Confirmation of intracellular and extracellular expression of L1 protein for the three types of HPVs by *Pichia pastoris* system was possible by an immunoassay using a specific antibody to detect the poly-histidine tag attached to the protein. The positive results in all samples suggest that the recombinant yeasts were able to express heterologous gene intracellular and extracellularly after the *AOX1* promoter induction. The highest level of intracellular and extracellular expression by *P. pastoris* recombinant strains was obtained by Hasslacher et al. (37) and Werten et

al. (38) respectively and corresponding to 22g/L and 14g/L of heterologous protein. Regarding the comparison between the pathways of expression, much remains to be studied, but both situations are presented as viable alternatives for the production of recombinant proteins.

The data presented allows us to conclude that, although preliminary, the *Pichia pastoris* expression system is suitable for L1 protein production from different HPV types. The use of integrative vectors and the consequent stability of clones make this heterologous expression system a potential tool that can be subjected to optimization parameters (use of bioreactor and/or codon-optimization of L1 gene) for achieving higher levels of the L1 protein and therefore establishing a platform for the production of VLP-based vaccine.

Acknowledgments

We thank the aid offered by the Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA) to carry out part of the experiments; the Aggeu Magalhães Research Center (FIOCRUZ-PE) for the sequencing of samples in this work; and Dr. Oswaldo Pompílio de Melo Neto (FIOCRUZ-PE), as well as his staff, for their help in discussions of the experiments.

References

1. [Kwak K](#), [Yemelyanova A](#), [Roden RB](#). Prevention of cancer by prophylactic human papillomavirus vaccines. *Curr Opin Immuno* 2011; 23: 244-51.
2. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics. *Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108.

3. WHO (World Health Organization). Viral Cancers. http://www.who.int/vaccine_research/diseases/viral_cancers/en/index3.html. Accessed May 21, 2011.
4. Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, [Jansen AM](#), [Peto J](#), et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 796-802.
5. [Baldez da Silva MF](#), [Chagas BS](#), [Guimarães V](#), [Katz LM](#), [Felix PM](#), [Miranda PM](#), et al. HPV31 and HPV33 incidence in cervical samples from women in Recife. *Brazil Genet Mol* 2009; 8: 1437-43.
6. Gonçalves MA, Massad E, Burattini MN, Villa LL. Relationship between human papillomavirus (HPV) genotyping and genital neoplasia in HIV-positive patients of Santos City, São Paulo, Brazil. *Int J STD AIDS* 1999; 10: 803-807.
- Da Silva DM, Eiben GL, Fausch SC, Wakabayashi MT, Rudolf MP, Velders MP and Kast WM. Cervical cancer vaccines: emerging concepts and developments. *J Cell Physiol* 2001; 186:169-182.
8. Nakauchi M, Kariwa H, Kon Y, Yoshii K, Maeda A, Takashima I. Analysis of severe acute respiratory syndrome coronavirus structural proteins in virus-like particle assembly. *Microbiol Immunol* 2008; 52: 625-630.
9. Varsani A, Williamson AL, Rose RC, Jaffer M, Rybicki EP. Expression of Human papillomavirus type 16 major capsid protein in transgenic *Nicotiana tabacum* cv Xanthi. *Arch Virol* 2003; 148: 1771-1786.
10. Hou L, Wu H, Xu L, Yang F. Expression and self-assembly of virus-like particles of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in *Escherichia coli*. *Arch Virol* 2009; 154: 547-553.

11. Zhou J, Sun XY, Stenzel DJ, Frazer IH. Expression of vaccinia recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles. *Virology* 1991; 185: 251–257.
12. [Vassileva A](#), [Chugh DA](#), [Swaminathan S](#), [Khanna N](#). Expression of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* using the GAP promoter. *J Biotechnol* 2001; 88: 21-35.
13. Lin-Cereghino GP, Godfrey L, De La Cruz BJ, Johnson S, Khuongsathiene S, Tolstorukov I, et al. Mxr1p, a key regulator of the methanol utilization pathway and peroxisomal genes in *Pichia pastoris*. *Mol Cell Biol* 2006; 26: 883-897.
14. Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev* 2000; 24: 45-66.
15. [Sørensen HP](#). Towards universal systems for recombinant gene expression. *Microb Cell Fact* 2010; 9: 27.
16. Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, Harvey LM (). Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast* 2005; 22: 249–270.
17. Cregg JM, Vedvick TS, Raschke WC. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnology (NY)* 1993; 11: 905-910.
18. [Bazan SB](#), [de Alencar Muniz Chaves A](#), [Aires KA](#), [Cianciarullo AM](#), [Garcea RL](#), [Ho PL](#). Expression and characterization of HPV-16 L1 capsid protein in *Pichia pastoris*. *Arch Virol* 2009; 154: 1609-17.
19. Cregg JM, Barringer KJ, Hessler AY, Madden KR. *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Mol Cell Biol* 1985; 5: 3376-3385.
20. Hong I-P, Anderson S, Choi S-G. Evaluation of a new episomal vector based on the GAP promoter for structural genomics in *Pichia pastoris*. *J Microbiol Biotechnol* 2006; 16: 1362-1368.

21. Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. Preparation and Transformation of Competent *E. coli* Cells. In: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: CSHL Press; 1989. p 1.74-1.84.
22. Schmitt ME, Brown TA, Trumpower BL. A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 3091-3092.
23. Bradford MM. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.
24. Shi J, Zhang ST, Zhang XJ, Xu H, Guo AG. Expression, purification, and activity identification of Alfimeprase in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* 2007; 54: 240-246.
25. [McKinney J](#), [Knappskog PM](#), [Pereira J](#), [Ekern T](#), [Toska K](#), [Kuitert BB](#), et al. Expression and purification of human tryptophan hydroxylase from *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. [Protein Expr Purif](#) 2004; 33: 185-94.
26. Cregg JM, Cereghino JL, Shi J, Higgins DR. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol Biotechnol* 2000; 16: 23-52.
27. Cregg JM, Cereghino JL, Shi J, Higgins DR. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol Biotechnol* 2000; 16: 23-52.
28. [Scorer CA](#), [Buckholz RG](#), [Clare JJ](#), [Romanos MA](#). The intracellular production and secretion of HIV-1 envelope protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene* 1993; 136: 111–119.
29. Gurkan C, Ellar DJ. Recombinant production of bacterial toxins and their derivatives in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact* 2005; 4: 33.
30. Barr KA, Hopkins SA, Sreekrishna K. Protocol for efficient secretion of HSA developed from *Pichia pastoris*. *Pharm* 1992; 12: 48-51.

31. Chen C, Wu P, Huang C, Cheng K. A *Pichia pastoris* fermentation strategy for enhancing the heterologous expression of an *Escherichia coli* phytase. *Enzyme Microb Techno* 2004; 35: 315–320.
32. Teng D, Fan Y, Yang Y, Tian Z, [Luo J](#), [Wang JH](#). Codon optimization of *Bacillus licheniformis* β -1, 3-1, 4-glucanase gene and its expression in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechno* 2007; 74: 1074-1083.
33. Higgins RH, Cregg JM. Introduction to *Pichia pastoris*. In: Higgins DR e Cregg JM (eds.). *Pichia* protocols, n°103. Series: *Methods in molecular biology* 1998; New Jersey: Humana Press Inc.
34. Craveiro RB, Ramalho JD, Chagas JR, Wang PHM, Casarini D, Pesquero JL et al. High expression of human carboxypeptidase M in *Pichia pastoris*: Purification and partial characterization. [Braz J Med Biol](#) 2006; 39: 211-217.
35. Sreekrishna K, Brankamp RG, Kropp DE, Blankenship DT, Tsay JT, Smith PL et al. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the metylophilic yeast *Pichia pastoris*. *Gene* 1997; 190: 55-62.
36. Clare JJ, Rayment FB, Ballantine SP, Sreekrishna K, Romanos MA. High-level Expression of Tetanus Toxin Fragment c in *Pichia pastoris* Strains Containing Multiple Tandem Integrations of the Gene. *Bio/Technology* 1991; 9: 455-460.
37. Hasslacher M, Schall M, Hayn M, Bona R, Rumbold K, Luckl J, et al. High level intracellular expression of hydroxynitrile lyase from the tropical rubber tree *Hevea brasiliensis* in microbial hosts. *Protein Expr Purif* 1997; 11: 61-71.
38. Werten MW, van den Bosch TJ, Wind RD, Mooibroek H, de Wolf FA. High-yield secretion of recombinant gelatins by *Pichia pastoris*. *Yeast* 1999; 15: 1087–1096.

Table 1: Primers for amplification of L1 gene of HPV 16, 18 and 33

Forward Primers	Sequences
H16Fw	5'- <u>GGTACCTCACAATAATGTCTCTTTGGCTGC</u> -3 '
H16Rev	5'- <u>GTCGACGAGCTTACGTTTTTTTGC</u> -3
H18Fw	5'-GATTCGAA AAAAATGTGCCACGGGTCC -3 '
H18Rev	5'-GTCCCTCGAGTTCCTGGCACGTACACG-3 '
H33Fw	5 ' <u>-GATTCGAAAAAAATGTCCGTGTGGCGGCCTAG</u> -3'
H33Rev	5'-TCCCTCGAGTTTTTAAACCTTTTTTGCG-3 '
H16αFw	5'- <u>GGTACCCTTTGGCTGCCT</u> -3 '
H16αRev	5'- <u>GTCGACCAGCTTACGTTTTTTTGCG</u> -3'

Underline: sites for restriction enzymes; Bold: Kozak Sequence (for details, see text).

Table 2: Primers for detection of recombinant *Pichia* clones

Primers	Sequences
AOX1Fw	5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC- 3'
AOX1Rev	5'-CAAATGGCATTCTGACATCC- 3'
α-FactorFw	5'-TACTATTGCCAGCATTGCTGC-3'

Table 3. Primers for RT-PCR

Primers	Sequences	Nucleotide position
H16Fw_int	5'-GGTCCATTAGGTGTGGG-3 '	634-659
H16Rev_int	5'-AGCTGTCGCCATATGGTTCTG-3 '	1111-1133
H18Fw_int	5'-ATGGTAGATACTGGATATGGTGC-3 '	781-804
H18Rev_int	5'-CTGCTATACTGCTTAAATTTGGTAG-3 '	1255-1280
H33Fw_int	5'-GGAACATTGGGGTAAAGGTGTTGC-3 '	500-524
H33Rev_int	5'-CCACAGTAACAAATACCTGATTGCC-3 '	975-1000

Figure legends

Figure 1. Confirmation of the intra and extracellular constructs for L1 expression by PCR. In A, amplification of HPV16 L1 gene (1,5Kb) cloned in pPICZ α vector. In B, C and D, HPV16 (1,5Kb), HPV18 (1,7Kb) and HPV33 (1,5Kb) L1 genes, respectively cloned in pPICZ vector. In all gels, we used the molecular weight marker 1Kb plus (Invitrogen).

Figure 2. Colony PCR of *Pichia* recombinant clones. The primers used in this detection anneal in the AOX1 region, amplifying a fragment of 325pb (in addition to gene) and in the alpha secretion factor region, amplifying a fragment of 299pb (in addition to gene) in pPICZA and pPICZ α vectors, respectively. Line 1, 1kb plus molecular weight marker (Invitrogen); line 2, amplicon obtained through the X33/pPICZL1H18 recombinant (1700bp + 325bp = 2025bp); line 3, an amplicon obtained through the X33/pPICZL1H33 recombinant (1500pb + 325 bp =1825pb) and an amplicon that

refers to the *AOX1* gene (2200pb) of *P. pastoris* from its Mut⁺ phenotype; line 4, amplicon obtained through the X33/pPICZL1H16 recombinant (1500pb + 325bp = 1825pb); line 5, amplicon obtained through the X33/pPICZ α L1H16 recombinant (1500pb + 299bp = 1799pb); line 6, negative control (without DNA).

Figure 3. Representative RT-PCR of recombinant clones. Line 1, lambda *Hind*III molecular weight marker (Invitrogen); lines 2 and 3, X33/pPICZL1H33 and X33/pPICZL1H18 clones, respectively; line 4, X33/pPICZL1H16 clone; line 5, X33/pPICZ α L1H16 clone; line 6, X33/pPICZ clone (empty vector, negative control); line 7, negative control (without DNA); lines 8, 9, 10 and 11, controls without reverse transcriptase of all clones.

Figure 4. SDS-PAGE of proteins from *P. pastoris* clones. Samples of 20 μ L were loaded in each well. In A; line 1, ColorBurst Electrophoresis Marker (Sigma); lines 2 and 3, lysates of X33/pPICZL1H18 clones; lines 4 and 5, lysates of X33/pPICZL1H33 clone; line 6, lysate of X33/pPICZL1H16 clone; line 7, lysate of the X33/pPICZ clone (negative control); lines 8 and 9, culture supernatants of X33/pPICZ α L1H16 clone and X33/pPICZ α clone (negative control), respectively. In B are shown the positive controls of extracellular and intracellular expression, respectively; line 10, human serum albumin (HSA) expressed by the GS115/Albumin control strain; line 11, beta-galactosidase expressed by the GS115/ β -galactosidase control strain; line 12, PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas).

Figure 5. Dot blot for detection of intracellular production of L1 protein. The samples were standardized to an amount of 0.9 μ g, which were applied to nitrocellulose

membrane. The specific reactions with the lysates of clones, shown in the figure by H16, H18 and H33 confirm the presence of L1 protein of the three viral types. In contrast, in the lysate of negative control (X33/pPICZ) there was no reaction.

Figure 6. Dot blot for detection of extracellular production of L1 protein. In A, screening of expression of X33/pPICZαL1H16 clones. In B, the culture supernatants of clones nominated 15 and 20, as well as the negative control, measured and standardized to an amount of 0.9 µg.

Figure 1.

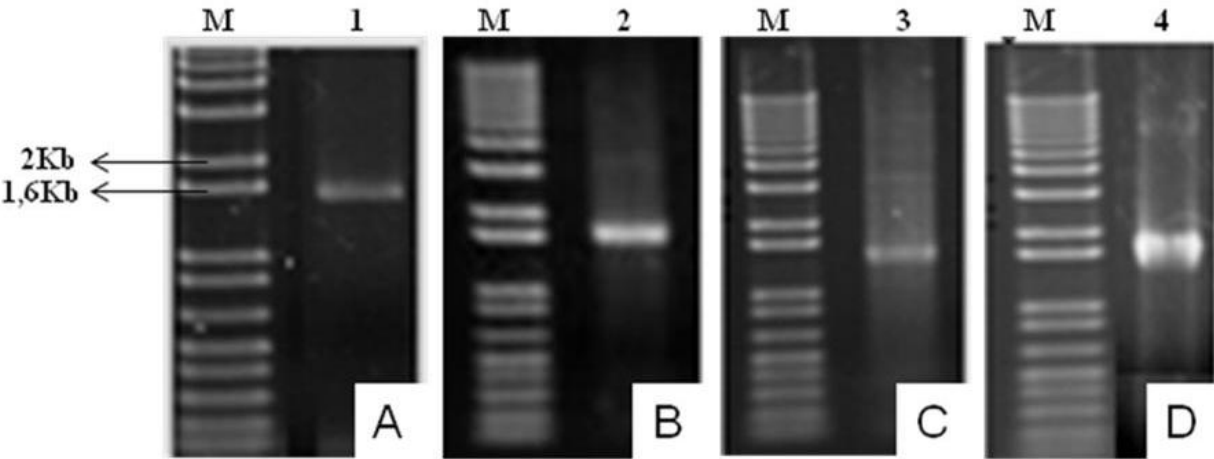


Figure 2.

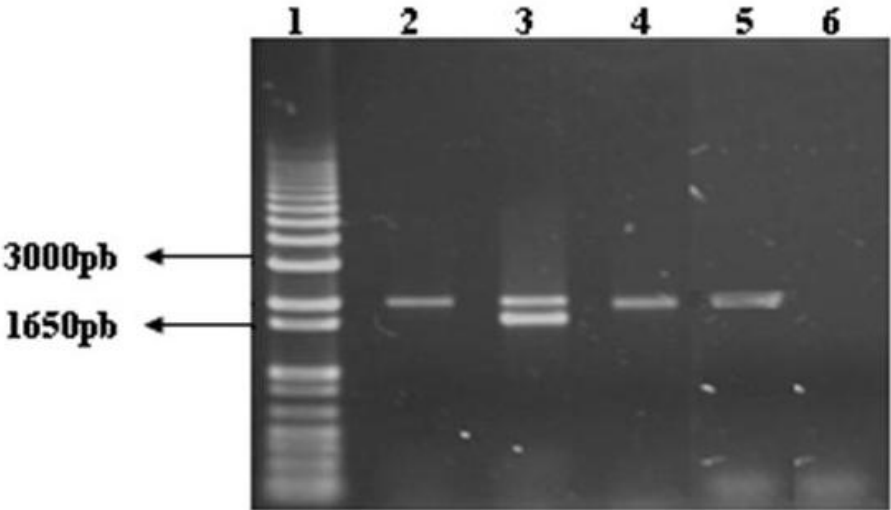


Figure 3.

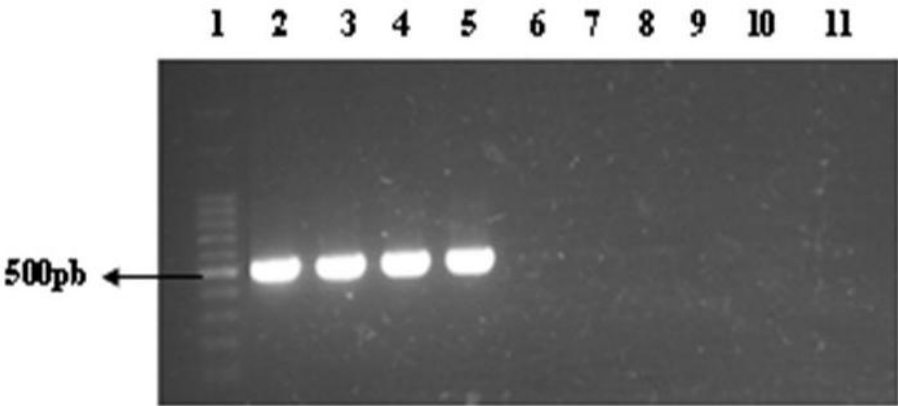


Figure 4.

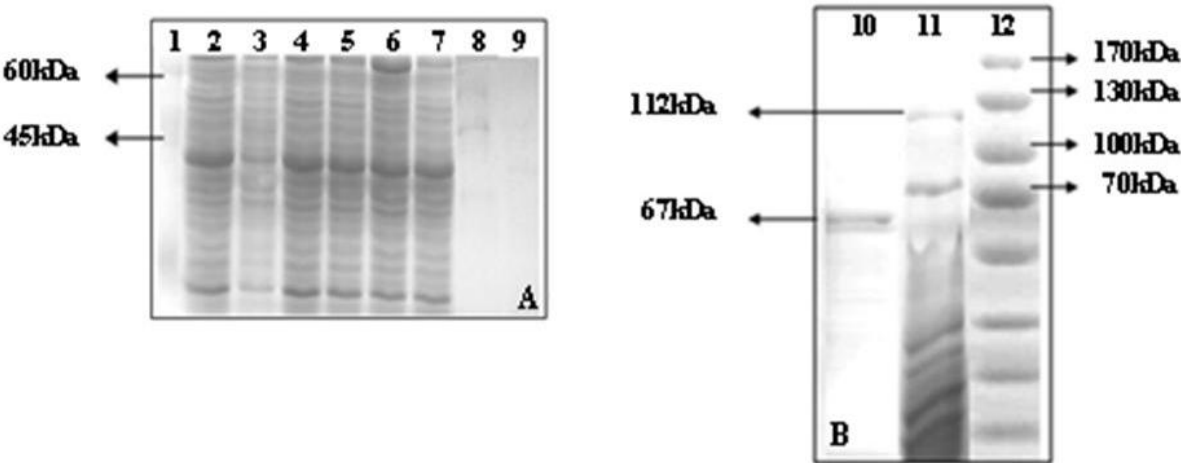


Figure 5.

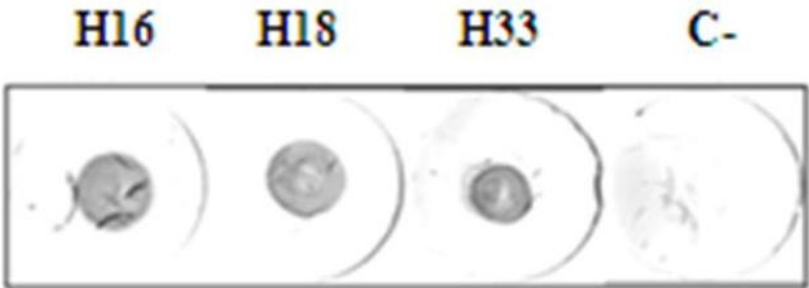


Figure 6.

