

**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética**

Anna Jéssica Duarte Silva

**Produção de antígenos imunizantes em sistema de
expressão procarioto para o desenvolvimento de
estratégias profilático-terapêuticas contra o Papilomavírus
Humano**

**Recife
2016**

Anna Jéssica Duarte Silva

**Produção de antígenos imunizantes em sistema de
expressão procarioto para o desenvolvimento de
estratégias profilático-terapêuticas contra o Papilomavírus
Humano**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Dr. Antonio Carlos de Freitas

Coorientador: Christian Robson de Souza Reis

Recife

2016

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Silva, Anna Jéssica Duarte

Produção de antígenos imunizantes em sistema de expressão procarioto para o desenvolvimento de estratégias profilático-terapêutica contra o Papilomavírus Humano/ Anna Jéssica Duarte Silva– Recife: O Autor, 2016.

83 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Antonio Carlos de Freitas

Coorientador: Christian Robson de Souza Reis

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Ciências Biológicas. Genética, 2016.

Inclui bibliografia

1. Útero- câncer 2. Imunização 3. Papilomavírus I. Freitas, Antonio Carlos de (orientador) II. Reis, Christian Robson de Souza (coorientador) III. Título

Anna Jéssica Duarte Silva

**Produção de antígenos imunizantes em sistema de
expressão procarioto para o desenvolvimento de
estratégias profilático-terapêuticas contra o Papilomavírus
Humano**

Aprovado em 04/03/2016

Banca Examinadora:

**Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas
Universidade Federal de Pernambuco**

**Prof. Dr. Tercílio Calsa Júnior
Universidade Federal de Pernambuco**

**Dr. Lindomar José Pena
Fundação Oswaldo Cruz (Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães)**

**Profa. Dra. Fernanda Cristina Bezerra Leite
Universidade Federal Rural de Pernambuco**

**Recife
2016**

Dedico esse trabalho aos meus pais e a meu irmão
que são meu norte e meu ponto de equilíbrio.

Agradecimentos

Se, enfim, estou conseguindo finalizar mais uma etapa da minha vida acadêmica, grande parte do crédito deve ser dada ao apoio que recebi todo o tempo e por todos os lados. Na verdade não só apoio, como também amor, incentivo e ensinamentos.

Agradeço a meus pais, Graça e Luiz, que são meus exemplos de vida, me instigam a buscar meus sonhos e que com toda dedicação, força e simplicidade deram o seu melhor para me educar e me preparar para a vida. A meu irmão, Alexandre, por ser meu melhor amigo e anjo da guarda. A minha tia, Socorro, e as “tias do coração” Socorro, Emília e Penha por tudo o que fizeram e até hoje fazem por mim.

Ao meu orientador, Dr. Antônio Carlos de Freitas pela oportunidade dada desde a iniciação científica, pela confiança depositada, disponibilidade e por todo conhecimento compartilhado ao longo desse tempo.

Ao co-orientador, Dr. Christian Reis, pela gentileza, prestatividade e pelas valiosas sugestões dadas para melhoria desse trabalho; em seu nome, agradeço também ao Departamento de Microbiologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães onde parte dos experimentos foi desenvolvida.

Aos que compõem o LEMTE e contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho, cada um a sua maneira. Em especial aos que convivo mais de perto: Ana Paula (Djuca), André, Karin, Laryssa, Ligia, Marcelo, Rita e Talita, com quem também aprendo bastante e que são muito mais que colegas de laboratório: obrigada por todos os incentivos, pelo companheirismo e pelas boas risadas. Apesar das dificuldades, fazer o que se gosta com amigos por perto torna tudo mais fácil e prazeroso. Agradeço também a Filipe Colaço com quem aprendi muito e que colaborou comigo desde o início.

A Gustavo e Adalúcia pelo apoio e torcida desde a graduação.

Por fim, e não menos importante, agradeço as amigas de toda a vida, Micaelly e Jéssica, pela torcida, incentivo e carinho de sempre.

“A alegria não chega apenas no encontro do achado, mas faz parte do processo da busca. E ensinar e aprender não pode dar-se fora da procura, fora da boniteza e da alegria.”

Paulo Freire

Resumo

A infecção pelo Papilomavírus Humano, além de representar uma doença sexualmente transmissível altamente disseminada, é responsável por 5% dos cânceres em humanos, destacando o câncer cervical com altos índices de incidência e mortalidade. Embora comprovadamente eficazes, as vacinas vigentes não combatem infecções já estabelecidas e apresentam um elevado custo de produção. Esse cenário revela a necessidade de estratégias vacinais alternativas. O presente trabalho propõe a expressão de diferentes genes recombinantes em *Escherichia coli*, uma plataforma biotecnológica econômica, de fácil manipulação e de alto rendimento. Os genes recombinantes utilizados foram: L1 de HPV16 e construções quiméricas baseadas na substituição de epítomos da oncoproteína E5 na alça h4 e na região C-terminal de L1, com potencial para geração de antígenos profilático-terapêuticos e na substituição de epítomos da proteína L2 na região da alça h4 para avaliação de possível neutralização cruzada. Após subclonagem em pGEM-T, esses genes foram clonados em vetor de expressão pAE e linhagens de *Escherichia coli* BL21 e Rosetta foram transformadas com os vetores de expressão gerados. A confirmação da produção das proteínas se deu por *Western blot*, a partir de extratos de culturas induzidas com IPTG. Otimizações nos protocolos de indução, lise e preparo das amostras foram realizadas ao longo dos experimentos. Os resultados obtidos demonstraram a produção dos antígenos recombinantes, e deverão ser validados em futuros ensaios imunológicos quanto à capacidade de induzir respostas imunes em animais desafiados.

Palavras-chave: HPV; Câncer Cervical; Vacina; Imunização; Expressão heteróloga

Abstract

Human papillomavirus infection, besides to represent a widespread sexually transmitted disease, is responsible for 5% of cancers in humans, highlighting cervical cancer with high rates of incidence and mortality. Although proven effective, the existing vaccines do not eliminate infections already established and have a high cost of production. This scenario shows the need for alternative vaccine strategies. This study proposes the expression of different recombinant genes in *Escherichia coli*, an economic, easy handling and high performance biotechnology platform. Recombinant genes used were: L1 of HPV16 and chimeric basedas constructions in replacement E5 oncoprotein epitopes on h4 loop and L1 C-terminal region, with the potential to generate prophylactic-therapeutic antigens and replacing L2 protein epitopes in loop region h4 for evaluation of possible cross-neutralization. After subcloning in pGEM-T, these genes were cloned into vector pAE expression and *Escherichia coli* BL21 and Rosetta were transformed with the expression vectors generated. Confirmation of protein production was performed by *Western blot* from extracts of cultures induced with IPTG. Optimizations in the induction protocols, lysis and preparation of the samples were carried out throughout the experiments. The results demonstrated the production of recombinant antigens and should be validated in future immunological assays for the ability to induce immune responses in challenged animals.

Key-words: HPV; Cervical Cancer; Vaccine; Immunization; Heterologous expression.

Lista de Ilustrações

REVISÃO DA LITERATURA		Página
Figura 1	Estimativa da mortalidade global em decorrência de câncer cervical	14
Figura 2	Árvore filogenética dos Papilomavírus	19
Figura 3	Esquema da organização genômica do HPV16	21
Figura 4	Expressão dos oncogenes E6 e E7 e a integração do genoma viral	23
Figura 5	Progressão da infecção por HPV e expressão dos genes virais	24
Figura 6	Expressão dos genes virais ao longo do ciclo de infecção por HPVs de alto-risco no epitélio cervical	26
Figura 7	Arranjo das proteínas estruturais L1 e L2 dentro do capsídeo viral	27
Figura 8	Eventos iniciais da infecção pelo HPV no epitélio cervical	28
Figura 9	Atividades de E5 alterando fatores do hospedeiro e controlando a replicação e persistência do vírus ao longo do epitélio cervical	30
Figura 10	Resumo da resposta imune gerada mediante vacinação anti-HPV	36
Figura 11	Monômero de L1 e capsômeros	38
MATERIAIS E MÉTODOS		

Figura 12	Desenho esquemático dos genes de estudo	42
Figura 13	Mapa do vetor pAE	43
Figura 14	Mapa do vetor pGEX4T-3	44
RESULTADOS		
Figura 15	Clonagem pAE	55
Figura 16	Extrato protéico de células de <i>E. coli</i> BL21 induzidas com IPTG 0.3mM: SDS-PAGE 12,5%, corado com <i>Coomassie</i>	56
Figura 17	<i>Western blot</i> com o extrato protéico de culturas BL21 induzidas (IPTG 0.3mM) durante 4h e 20 horas	58
Figura 18	SDS-PAGE e <i>Western blot</i> com amostras referentes às etapas do processo de purificação por resina de níquel	59
Figura 19	<i>Western blot</i> com o extrato proteico de culturas Rosetta DE3	60
Figura 20	Clonagem pGEX4T-3	61
Figura 21	<i>Western blot</i> com o extrato protéico de culturas BL21 (Clones pGEX4T-3)	62
Figura 22	Extrato protéico total e extrato solúvel de culturas de 15mL em células de <i>E.coli</i> BL21 (Clones pAE)	63

Lista de Quadros e Tabelas

REVISÃO DA LITERATURA		Página
Quadro 1	Taxas de Incidência, estimadas para 2016 (por 100 mil habitantes), para os tipos de câncer mais frequentes (exceto pele não melanoma), em mulheres, no Brasil e suas regiões geográficas	15
MATERIAIS E MÉTODOS		
Quadro 2	Genótipos e aplicações das cepas de <i>E. coli</i> utilizadas no estudo	45
Quadro 3	Enzimas e reações	47
Quadro 4	Otimizações realizadas ao longo dos experimentos	52
RESULTADOS		
Tabela 1	Resultado da análise das sequências dos genes do estudo a respeito da presença de códons raros	60

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

Item	Definição
AA	Aminoácido
AE	Sítio de Poliadenilação da Região de Expressão Precoce
AL	Sítio de Poliadenilação da Região de Expressão Tardia
Arg	Arginina
BL21	Linhagem de <i>Escherichia coli</i>
DATASUS	Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde
DH5 α	Linhagem de <i>Escherichia coli</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DO ₆₀₀	Densidade óptica a 600 nm
DST	Doença Sexualmente Transmissível
DTT	Ditiotreitol
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (Ácido Tetracético Etilenodiamina)
endA1	Mutação do gene <i>endA</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i> (Receptor de Fator de Crescimento Epidermal)
GST	Glutathione S-Transferase
His- <i>tag</i>	Cauda (<i>tag</i>) de Histidina
HSPG	<i>Heparan Sulfate Proteoglycans</i> (Proteoglicanos de Heparan Sulfato)
HPV	(<i>Human Papillomavirus</i>) Papilomavírus Humano
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i> (Agência Internacional para Pesquisa em Câncer)
IgG	Imunoglobulina G
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IPTG	Isopropil- β -D-galactosídeo

Kb	Kilobase
KDa	Kilodalton
L2X	<i>Laemmli 2x</i>
LB	Luria-Bertani
LCR	<i>Long Region Control</i> (Longa região de controle)
MHC - I	<i>Major Histocompatibility Complex class I</i> (Complexo de histocompatibilidade principal classe I)
mRNA	Ácido Ribonucléico mensageiro
miRNA	Micro Ácido Ribonucléico
NIC (ou CIN)	Neoplasia Intraepitelial Cervical
Ni-NTA	Níquel- Ácido Nitrilotriacético
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (Quadro aberto de leitura)
pA	Sítio de Poliadenilação
pb	Pares de base
PCR	<i>Polymerase Reaction Chain</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i> (Fenilmetilsulfonilflúor)
PV	Papilomavírus
pRB	Proteína do retinoblastoma – supressora de tumor
PVDF	<i>Polyvinylidene fluoride</i> (Fluoreto de Polivinilidene)
p53	Proteína 53 – Fator de transcrição regulador do ciclo celular
p97	Promotor da Região de Expressão Precoce (HPV16)
p99	Promotor da Região de Expressão Precoce (HPV-31)
p105	Promotor da Região de Expressão Precoce (HPV-18)

p670	Promotor da Região de Expressão Tardia (HPV16)
p742	Promotor da Região de Expressão Tardia (HPV-31)
recA1	Mutação do gene <i>recA</i>
RNA	Ácido Ribonucléico
Rpm	Rotações por minuto
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (Dodecil sulfato de sódio)
SUS	Sistema Único de Saúde
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i> (Tampão Tris Salino)
tRNA	Ácido ribonucléico transportador
VLP	<i>Virus-like particles</i> (Partículas Semelhantes a Virus)
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial da Saúde)

Sumário

1. Introdução	12
2. Revisão da Literatura	14
2.1 Câncer Cervical	14
2.2 O Papilomavírus Humano (HPV)	17
2.2.1 Infecção pelo HPV e Câncer	17
2.2.2 Aspectos gerais da taxonomia do HPV	18
2.2.3 Estrutura e organização do genoma do HPV	20
2.2.4 Infecção pelo HPV e o ciclo viral	24
2.2.5 A Oncoproteína E5	28
2.3 Tratamentos atuais e estratégias de controle	31
2.4 Vacinação e aspectos imunológicos	32
2.4.1. Vacinas terapêuticas	35
2.4.2. VLPs e capsômeros como plataformas vacinais	36
2.5 Sistemas para expressão heteróloga	38
3. Objetivos	41
3.1 Objetivo geral	41
3.2 Objetivos específicos	41
4. Material e Métodos	42
4.1 Materiais	42

4.1.1. Genes	42
4.1.2. Vetores	43
4.1.3. Linhagens de Microorganismos	44
4.1.4. Meio de cultura e condições de cultivo	45
4.1.5. Soluções e tampões	45
4.1.6. Géis para eletroforese de DNA e de proteínas	46
4.1.7. Enzimas	47
4.2 Métodos	47
4.2.1. Clonagem no vetor pAE	47
4.2.2. Indução da expressão gênica	48
4.2.3. Análise da expressão heteróloga por <i>Western blot</i>	50
4.2.4. Clonagem e expressão utilizando o vetor pGEX4T-3	51
4.2.5. Análise da ocorrência de códon raros	52
4.2.6. Solubilização dos corpos de inclusão	53
5. Resultados	55
5.1 Clonagem pAE	55
5.2 Produção e detecção das proteínas em <i>E. coli</i> BL21	55
5.3 Análise da ocorrência de códon raros	59
5.4 Produção e detecção das proteínas em <i>E. coli</i> Rosetta DE3	60
5.5 Clonagens e indução da expressão com o vetor pGEX4T-3	61

5.6 Solubilização dos corpos de inclusão	62
6. Discussão	64
7. Conclusões	72
8. Referências Bibliográficas	73
9. Currículo Lattes	81

1. Introdução

De acordo com o Ministério da Saúde, pesquisas que visam aumentar a qualidade e expectativa de vida da população são consideradas linhas prioritárias. As Doenças Sexualmente Transmissíveis (DSTs) e o câncer estão entre essas prioridades de pesquisa. A infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV), além de estar diretamente relacionada com o desenvolvimento do câncer cervical, é qualificada como uma das principais DSTs que afligem a população mundial. O câncer cervical apresenta forte impacto na saúde pública por ser responsável por elevados índices de mortalidade e morbidade. Segundo estimativas do INCA (Instituto Nacional do Câncer), para 2016 são esperados 16.340 novos casos no Brasil, colocando esse tipo de câncer como o terceiro mais frequente entre mulheres.

Atualmente, mais de 150 tipos de HPV já foram descritos; destes, cerca de 40 infectam o trato genital. De acordo com o grau de lesões que podem induzir, os genótipos de HPV podem ser classificados como de baixo ou alto risco carcinogênico. O emprego da engenharia genética permite a obtenção de estruturas conhecidas como partículas semelhantes ao vírus ou VLPs a partir da produção de proteínas do capsídeo viral, sobretudo L1, em sistemas de expressão recombinantes. Desde 2014, uma vacina profilática baseada em VLPs de L1, abrangendo os HPVs de alto risco tipo 6, 11, 16 e 18, passou a ser distribuída pelo SUS (Sistema Único de Saúde). Além de um custo de produção elevado, a ausência de propriedade terapêutica e o baixo espectro de ação sugerem um impacto limitado no combate ou controle do câncer cervical, principalmente em países em desenvolvimento onde se encontram a maioria dos casos de câncer cervical.

Por outro lado, existe a possibilidade de produzir estruturas intermediárias às VLPs denominadas capsômeros (pentâmeros de L1) que, ao contrário das VLPs (produzidas em células de inseto ou levedura), podem ser produzidos em bactérias e também induzem uma resposta imunológica neutralizante. Além disso, estudos apontam que o fusionamento de L1 a epítomos das oncoproteínas virais E6 e E7 – expressas durante os estágios de transformação das células infectadas - é capaz de gerar partículas com propriedades profilático-terapêuticas. Adicionalmente, recentemente a oncoproteína E5 vem se destacando como um alvo promissor para a imunização genética por conta da sua superexpressão nos estágios iniciais do câncer cervical.

Diante desse quadro, tendo HPV16 como foco, o presente trabalho teve como proposta a avaliação do sistema bacteriano para produção de partículas pentaméricas quiméricas com diferentes propósitos: (I) L1 de fusionada a epítomos de E5 como uma estratégia vacinal profilático-terapêutica; (II) fusão de epítomos de L2 em L1, no intuito de avaliar uma possível resposta de neutralização cruzada. Esses capsômeros possuem um custo de produção menor comparada às VLPs e um espectro maior de ação, sendo financeiramente mais interessantes para comporem estratégias vacinais em países em desenvolvimento, como o Brasil, nos quais a incidência da doença é acentuadamente maior.

2. Revisão da Literatura

2.1 Câncer Cervical

O câncer cervical é um dos cânceres mais frequentes entre mulheres e constitui um importante problema de saúde pública, particularmente em países em desenvolvimento, estando associado a elevados índices de morbidade e mortalidade (Figura 1).

No Brasil, ele se configura como o terceiro tipo de câncer mais frequente entre mulheres (Quadro 1) com estimativa de 16.340 novos casos para 2016, com 5.630 destes sendo esperados para a região Nordeste, onde ele figura como o segundo mais frequente (ESTIMATIVA INCA, 2016).

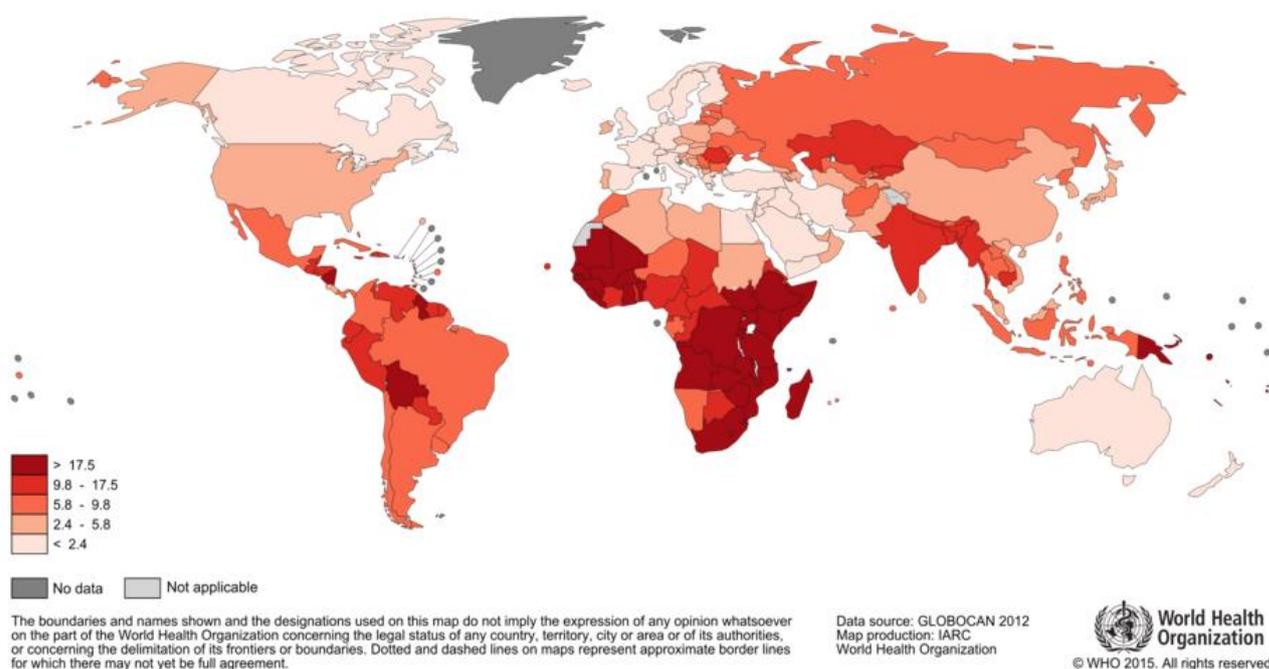


Figura 1: Estimativa da mortalidade global em decorrência de câncer cervical.

Quadro 1: Taxas de Incidência, estimadas para 2016 (por 100 mil habitantes), para os tipos de câncer mais frequentes (exceto pele não melanoma), em mulheres Brasil e regiões geográficas. Fonte: MS / INCA / Estimativa de Câncer no Brasil, 2016.

	REGIÕES					
	Brasil	Norte	Nordeste	Centro-oeste	Sudeste	Sul
1º	Mama (56,20)	Colo do útero (23,97)	Mama (38,74)	Mama (55,87)	Mama (68,08)	Mama (74,30)
2º	Cólon e Reto (17,10)	Mama (22,26)	Colo do útero (19,49)	Colo do útero (20,72)	Cólon e Reto (22,66)	Cólon e Reto (23,27)
3º	Colo do útero (15,85)	Cólon e Reto (5,89)	Cólon e Reto (8,77)	Cólon e Reto (16,93)	Colo do útero (11,30)	Traqueia, Brônquio e Pulmão (20,61)
4º	Traqueia, Brônquio e Pulmão (10,54)	Estômago (5,82)	Traqueia, Brônquio e Pulmão (7,24)	Traqueia, Brônquio e Pulmão (9,37)	Traqueia, Brônquio e Pulmão (10,56)	Colo do útero (15,17)
5º	Estômago (7,37)	Traqueia, Brônquio e Pulmão (5,07)	Estômago (6,73)	Ovário (6,96)	Corpo do útero (9,58)	Estômago (8,71)

Quanto a sua etiologia, é bem estabelecida a correlação entre infecções persistentes causadas pelo HPV e o câncer cervical (ZUR HAUSEN et al. 1996). A persistência da infecção é mais comum com tipos de HPV de alto-risco oncogênico, com destaque para o HPV16 sendo um importante determinante no desenvolvimento desse tipo de câncer (BURD, 2003). A função carcinogênica dos HPVs de alto risco é correspondente à expressão dos oncogenes E5, E6 e E7 que conferem às células crescimento descontrolado, inibição da apoptose e imortalidade, que são condições essenciais para a transformação maligna das células (BOULET et al. 2007).

Além da infecção pelo HPV, também há a influência de fatores ambientais relacionados ao estilo de vida como, por exemplo, tabagismo, uso de contraceptivos orais, início precoce da atividade sexual, multiparidade e

multiplicidade de parceiros sexuais (KJELLBERG et al. 2000; de FREITAS et al. 2012). É importante também ponderar fatores como susceptibilidade e imunidade individuais e aspectos relacionados à carga viral; ao tipo de infecção (se é única ou múltipla) e à idade, uma vez que a maioria das infecções por HPV em mulheres com menos de 30 anos regride espontaneamente, com uma persistência mais frequente acima dessa faixa etária (IARC, 2007). No Brasil, segundo dados do DATASUS, o câncer cervical é considerado raro em mulheres até 30 anos, tendo um aumento progressivo nos índices de incidência e mortalidade na faixa de 45 a 50 anos.

Dependendo da origem do epitélio comprometido, o câncer cervical pode ser categorizado em carcinoma epidermoide, tipo mais incidente e que acomete o epitélio escamoso, representando cerca de 80% dos casos, e adenocarcinoma, que acomete o epitélio glandular, correspondendo a 20% dos casos (INCA, 2015). Além da mortalidade associada, casos de carcinoma cervical avançado ou recorrente estão associados com morbidades severas como toxicidade e disfunção renal e hepática, e metástases ósseas (STERN et al. 2012).

Até o estabelecimento de neoplasias invasivas no colo uterino, existe uma longa fase pré-invasiva caracterizada citologicamente por uma gama de eventos celulares que progridem da atipia celular a graus variados de displasia ou neoplasia intraepitelial cervical (NIC) antes da progressão ao carcinoma invasivo. Em geral, essas lesões intraepiteliais são identificadas mediante exame microscópico das células cervicais em um esfregaço citológico corado pela técnica de Papanicolaou. O diagnóstico final da NIC é estabelecido mediante o exame anatomopatológico de biopsia cervical, onde o parecer é dado com base na diferenciação, maturação e estratificação das células e anomalias nucleares.

Desse modo, as lesões são classificadas histologicamente em NIC I – displasia leve; NIC II – displasia moderada e NIC III – displasia severa e câncer invasivo (carcinoma *in situ*). A NIC I também pode ser considerada como *SIL* (*Squamous Intraepithelial Lesions*) de baixo grau (*Low Grade SIL –LSIL*) e as NIC II/III como *SIL* de alto grau (*High Grade SIL- HSIL*) (SELLORS, et al 2004).

2.2. O Papilomavírus Humano (HPV)

2.2.1. Infecção pelo HPV e Câncer

A infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) é considerada a doença sexualmente transmissível (DST) mais frequente em mulheres e homens (BURCHELL et al. 2006). Estima-se que pelo menos 50% dos indivíduos sexualmente ativos irão entrar em contato com o HPV em algum momento de suas vidas e que 80% das mulheres terão esse contato até os 50 anos de idade (CASTELLSAGUÉ et al. 2002). Embora haja diferenças marcantes de acordo com as regiões estudadas, a infecção pelo HPV é considerada responsável por cerca de 10% da incidência de câncer no mundo (BOSCH et al. 2011).

Juntamente às infecções causadas por *Helicobacter pylori* e os vírus da Hepatite B e C, a infecção por HPV é reconhecida como um dos principais fatores etiológicos de cânceres causados por agentes infecciosos (DE MARTEL et al. 2012), incluindo o câncer cervical, os cânceres anogenitais (pênis, vulva, vagina e ânus) e os de orofaringe (FORMAN et al. 2012). Dentre os casos de câncer relacionados à infecção pelo HPV, a maioria deles é diagnosticado em mulheres, o que se deve a grande parte a alta incidência de câncer cervical. Dos 620.000 casos de cânceres devido à infecção pelo HPV no mundo, em 2012, 85% eram atribuídos ao câncer cervical (FERLAY et al. 2013). De acordo com dados da

organização mundial da saúde (OMS), aproximadamente 80% dos casos novos de câncer cervical são diagnosticados anualmente em países considerados subdesenvolvidos e estima-se que esse número chegue a 90% em 2020 (OMS 2010).

As taxas de mortalidade relacionadas a esse tipo de câncer correspondem, em média, metade da taxa de incidência global, com a maioria das mortes ocorrendo em países subdesenvolvidos.

O papel dessa infecção viral no câncer tem sido estabelecido devido a presença regular de DNA do HPV e pela demonstração da expressão de oncogenes virais em material tumoral, além da identificação das propriedades transformantes desses genes e de estudos epidemiológicos que apontam a infecção pelo HPV como principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer cervical (ZUR HAUSEN, 2000).

2.2.2. Aspectos Gerais da Taxonomia do HPV

Os Papilomavírus fazem parte de um grupo de vírus que podem ser encontrados em mais de 20 espécies de mamíferos diferentes, além de aves e répteis. Atualmente, já foram descritos mais de 150 tipos de Papilomavírus Humano, os quais pertencem à família *Papillomaviridae* que engloba 37 gêneros e 240 Papilomavírus (PVs) (VAN DOORSLAER et al., 2013; DOORBAR et al., 2015). Dentre os HPV já descritos, 40 tipos podem infectar o trato genital.

Os PVs humanos podem ser divididos com base em seu tropismo pelo epitélio mucoso ou cutâneo, ou em relação a sua associação com o câncer ou com lesões benignas. Os PVs que infectam preferencialmente a mucosa oral ou anogenital pertencem ao gênero *Alphapapillomavirus*, ao passo que os que

podem promover transformação maligna do epitélio infectado na cérvix ou em outros sítios (FRAZER et al., 2011). Entre os genótipos de HPV considerados de alto risco estão os tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, que são classificados dessa forma devido ao fato de serem comumente detectados em neoplasias de alto grau, com destaque para o HPV16 que é responsável por cerca de 60% dos casos de câncer cervical diagnosticados (a nível global). Além do câncer cervical, a infecção por HPV16 também é a principal causa de câncer de vagina, vulva, pênis, anus e orofaringe (LI et al., 2011).

Um novo isolado de PV é reconhecido como tal, quando o genoma completo é clonado e a sequência de DNA da ORF L1 apresenta mais de 10% de diferença, quando comparado ao tipo de PV conhecido mais próximo. Diferenças de homologia entre 2% e 10% definem um subtipo e menos do que 2% define a ocorrência de uma variante (DE VILLERS, et al., 2004).

2.2.3. Estrutura e organização do Genoma do HPV

O HPV é um vírus não-envelopado que tem o seu genoma organizado em uma molécula DNA circular dupla-fita com cerca de 8kb, que pode ser dividido em três regiões principais: de expressão precoce (*Early*), de expressão tardia (*Late*) e uma longa região de controle (LCR). Essas três regiões são separadas por dois sítios de poliadenilação (pA): pA precoce (AE) e pA tardio (AL) (ZHENG e BAKER, 2006) (Figura 3). O genoma de todos os PVs conhecidos apresenta ORFs para no mínimo cinco genes: E1, E2, E4 (genes de expressão precoce) e, L1 e L2 (expressão tardia) (VAN DOORSLAER, 2013); apenas parte dos PVs expressa os três oncogenes: E5, E6 e E7 (porém, todos expressam ao menos um deles) (KLINGELHUTZ et al, 2012).

Em geral, os transcritos de papilomavírus são policistrônicos, com múltiplos éxons e íntrons, o que representa uma característica vantajosa por permitir aos papilomavírus codificar múltiplas proteínas a partir de um genoma bastante compacto, adotando o *splicing* alternativo para expressar essas proteínas em um modo específico e temporal, através do processo de diferenciação celular. O *splicing* desses RNAs policistrônicos regulam a expressão gênica em um nível pós-transcricional desempenhando um importante papel no ciclo viral (ZHENG e BAKER, 2006).

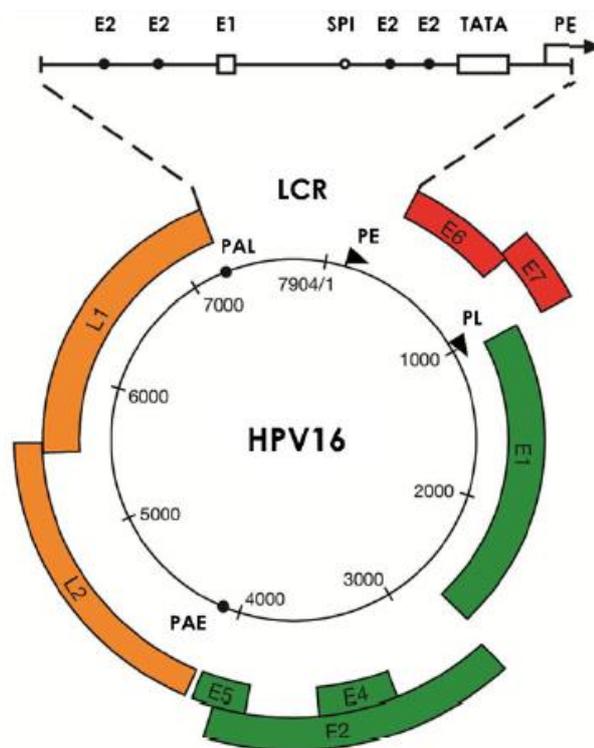


Figura 3: Esquema da organização genômica do HPV16 (típica dos genomas de HPVs de alto risco do gênero *Alphapapillomavirus*). Na região LCR estão destacados alguns sítios de reconhecimento para alguns fatores de transcrição celulares. Na figura além dos genes resultantes do *splicing* do mRNA policistrônico, estão representados os promotores PE (promotor de expressão precoce, também denominado P97) e PL (promotor dos genes de expressão tardia, também conhecido como P670). (Fonte: DOORBAR 2006)

Os genes E1, E2, E4 e os oncogenes E5, E6 e E7 codificam proteínas não-estruturais envolvidas na replicação e transcrição do DNA viral, assim como no processo de transformação celular, sendo expressos precocemente em relação

aos genes L1 e L2 (de expressão tardia) que codificam as proteínas estruturais formadoras do capsídeo viral (STANLEY, 2005). Esse capsídeo apresenta estrutura icosaédrica, sendo composto por 360 cópias da proteína estrutural L1, organizada em 72 pentâmeros (capsômeros) além de cerca de 72 cópias da proteína L2, por vírus (há divergência em relação a esse número entre diferentes estudos) (WANG e RODEN, 2013). Ambas as proteínas L1 e L2 desempenham um importante papel mediando a infectividade do vírus (DOOBAR et al., 2006). Entre as primeiras proteínas virais a serem expressas, estão os fatores de replicação E1 e E2. Essas proteínas formam um complexo que se liga a sequências na origem de replicação viral e atuam recrutando polimerases e proteínas acessórias para mediar a replicação (LONGWORTH e LAIMINS, 2004).

A região correspondente a LCR está localizada entre o fim de L1 e o início da região de expressão precoce, e contém sequências regulatórias *cis* que controlam a replicação (incluindo a origem de replicação viral a qual E1 pode se ligar) e a transcrição do genoma viral (como, por exemplo, sequências palindrômicas reconhecidas por E2) (Figura 3) (DOOBAR et al. 2015).

Eventos de quebra na ORF E2 são favorecidos pela instabilidade genômica causada pelos oncogenes virais e estão associados à integração do genoma viral - inicialmente mantido como epissomo – no genoma da célula hospedeira, com consequente superexpressão de E6 e E7 e malignização das lesões (Figura 4). Todavia, a presença de epissomos virais em lesões cervicais positivas para o HPV16 leva a hipótese de que há múltiplas vias para a indução da carcinogênese induzida pelo HPV (CHEUNG et al., 2013). Ao lado da hipótese básica dos altos níveis de expressão de E6 e E7 em consequência à revogação dos efeitos repressores de E2, devido à perda desse gene durante a integração, a atividade

aumentada de E6 e E7 em células que ainda mantém esses episômos virais possivelmente seria resultado da atuação da oncoproteína E5 em seus alvos celulares (VENUTI et al., 2011).

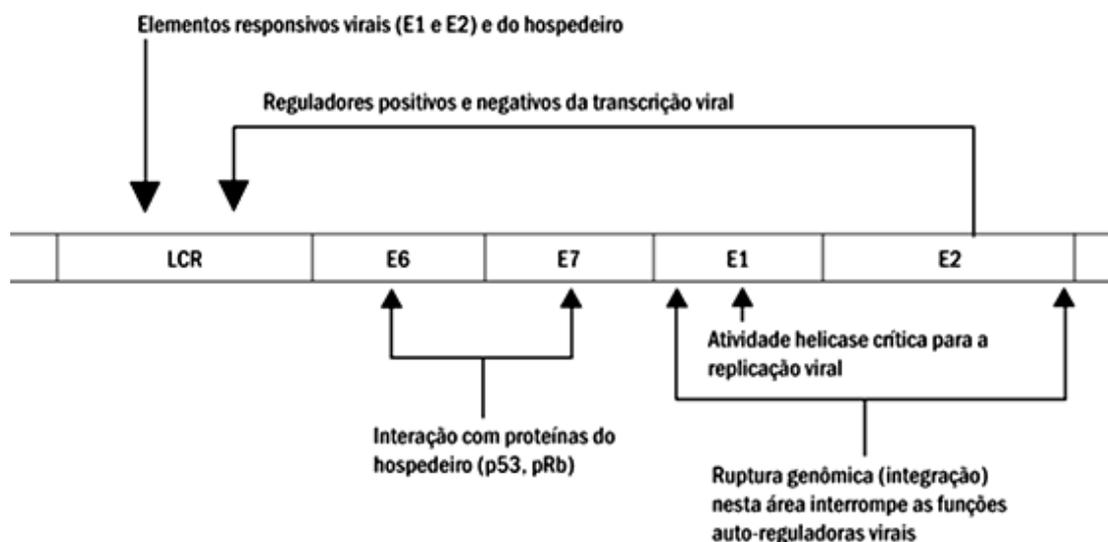


Figura 4: Expressão dos oncogenes E6 e E7 e a integração do genoma viral, o qual rompe o controle regulatório de E1 e E2 sobre a transcrição. (Adaptado de PINTO, 2001)

O genoma do HPV16 contém dois promotores principais: o P97 e o P670. O P97 (equivalente ao P99 em HPV-31 e ao P105 em HPV-18) localizado a montante da ORF de E6, é responsável pela região de expressão precoce e é considerado um promotor forte e altamente controlado. Esse controle se dá primariamente por elementos *cis* na região LCR que incluem sítios consenso de ligação em E2 que interagem com fatores de transcrição celulares e regulam a transcrição de P97 de células basais indiferenciadas. Por outro lado, o p670 (similar ao P742 do HPV-31) é responsável pela expressão dos genes tardios e está presente dentro da ORF E7, tendo sua atividade induzida apenas em queratinócitos diferenciados (ZHENG e BAKER, 2006).

2.2.4. Infecção pelo HPV e o Ciclo viral

A infecção produtiva pelo papilomavírus ocorre em muitos vertebrados, exibindo um restrito tropismo espécie – hospedeiro e requerimento da diferenciação epitelial para o seu desenvolvimento. Para que ocorra a infecção inicial, é necessário que as partículas virais tenham acesso a células da camada basal do epitélio (Figuras 5 e 6). A infecção por alguns tipos de HPV requer a ruptura do epitélio estratificado mesmo que nem sempre os micro-traumas desenvolvidos sejam prontamente aparentes (DOOBAR, 2005). Alguns estudos, como o de Egawa (2003), sugerem que para a manutenção da lesão, o vírus deve infectar uma célula-tronco epitelial.

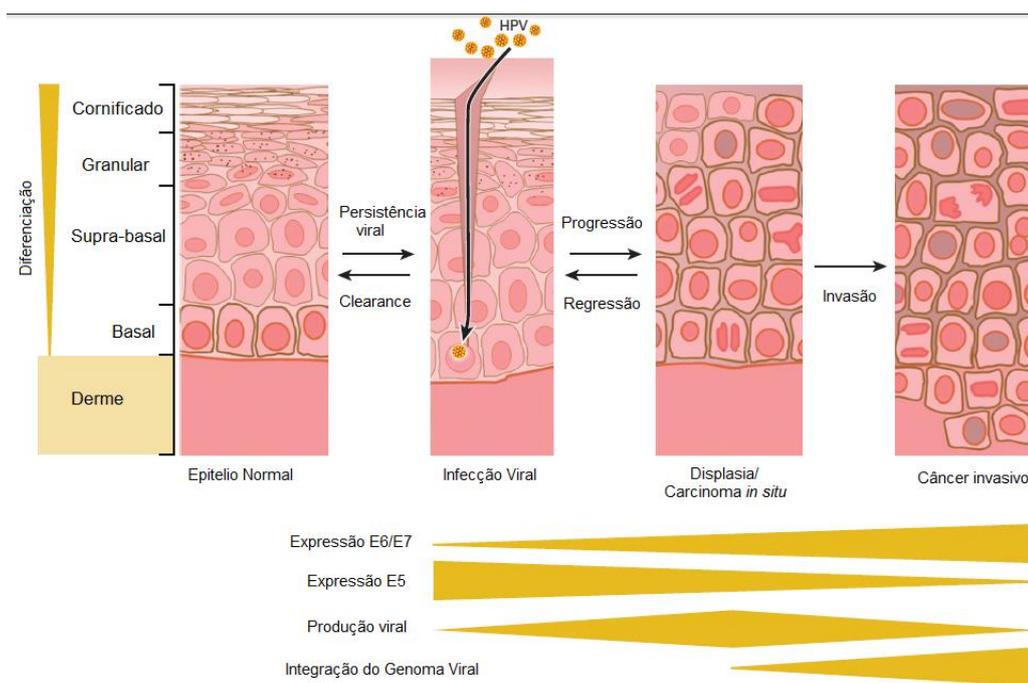


Figura 5: Progressão da infecção por HPV e expressão dos genes virais. (Adaptado de HELLNER et al., 2011)

Uma vez que tenha ocorrido a entrada do vírus na célula hospedeira, os PVs devem passar pelo citoplasma até o núcleo celular onde o genoma viral se estabelece e inicia seu programa de expressão e replicação. No caso de vírus considerados de alto risco oncogênico para mucosas, tais como o HPV16, a

formação de lesões cervicais pode ser facilitada pela infecção de células colunares, que posteriormente podem continuar a formar a camada basal do epitélio estratificado da zona de transformação.

Acredita-se que inicialmente o vírus mantenha seu genoma como um episossomo com 50-100 cópias por célula, na camada basal do epitélio (WILSON, 2002) e durante essa fase as proteínas estruturais do vírus não são produzidas. Tanto o baixo nível de expressão quanto o baixo número de cópias do genoma devem-se, pelo menos em parte, a presença de proteínas celulares, presentes nas células não-diferenciadas, que regulam negativamente a expressão de genes do genoma viral (KLINGELHUTZ et al., 2012). A infecção inicial é seguida por uma fase proliferativa, a qual resulta num aumento no número de células da camada basal albergando episossomos virais (Figura 6). A ligação de E2 a montante da região reguladora do HPV é necessária para a replicação do DNA viral, por recrutar E1 com atividade de DNA helicase para a origem de replicação viral (SAKAKIBARA et al., 2011). Alguns estudos sugerem que apesar da importância das proteínas E1 e E2 na fase inicial da amplificação do genoma viral, elas são dispensáveis para manutenção episossomal, uma vez que o número de cópias tenha se estabilizado (DOOBAR et al., 2015). Com exceção da E1 – helicase, os HPVs dependem da maquinaria de síntese da célula hospedeira para replicação do genoma viral (HELLNER e MÜNGER, 2011).

Em condições normais, assim que as células do epitélio basal passam pelo ciclo de replicação celular, começam a formar camadas celulares suprabasais onde ocorre o processo de diferenciação terminal (Figura 5). Para garantir a progressão do ciclo viral ao longo do epitélio em diferenciação, o vírus necessita criar um ambiente de replicação que permita a amplificação do genoma e a

montagem dos vírions. Apesar do que ocorre no epitélio não infectado, durante a infecção pelo HPV, as oncoproteínas E5, E6 e E7 são expressas de modo a interferir na regulação normal do ciclo celular e reter a diferenciação celular (DOOBAR 2006) (Figura 6).

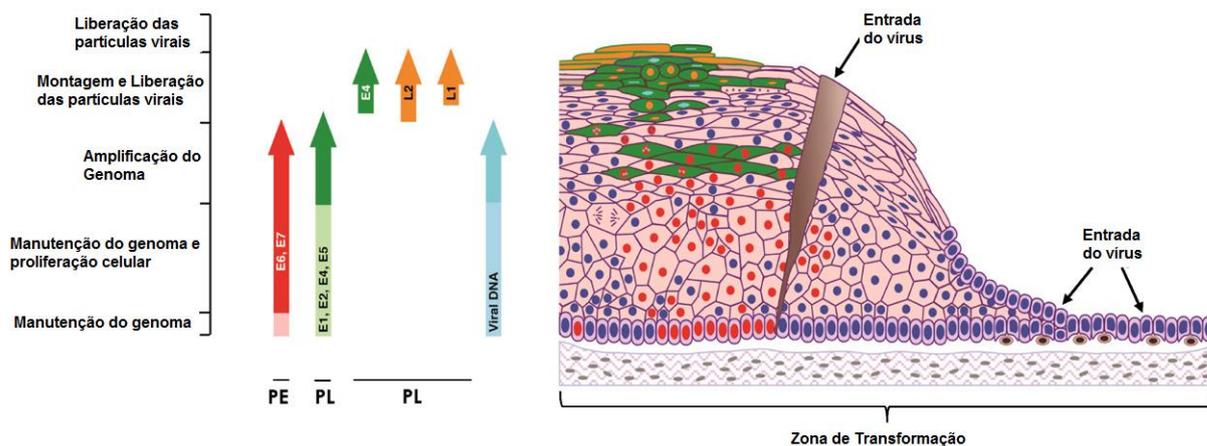


Figura 6: Expressão dos genes virais ao longo do ciclo de infecção por HPVs de alto-risco no epitélio cervical. (PE: *Early Promoter*, PL: *Late Promoter*) (Adaptado de DOOBAR et al. 2012).

Para a produção de vírions infecciosos, o genoma do Papilomavírus é amplificado e empacotado em partículas infecciosas. Uma vez que a amplificação do genoma viral tenha sido concluída, ocorre um aumento na atividade do promotor de expressão tardia (diferenciação dependente) e as proteínas estruturais, L1 e L2, são expressas em queratinócitos próximos a superfície apical do epitélio (Figura 5) (DOOBAR, 2006). O ambiente oxidativo formado nas camadas superficiais dos queratinócitos mortos (onde naturalmente haverá descamação para renovação do epitélio) leva a um acúmulo progressivo de pontes dissulfeto entre os monômeros de L1, formando partículas virais mais estáveis (CARDONE et al., 2014). A proteína L1 é predominantemente exposta na superfície na estrutura capsidial montada, diferentemente da distribuição observada para L2 (Figura 7).

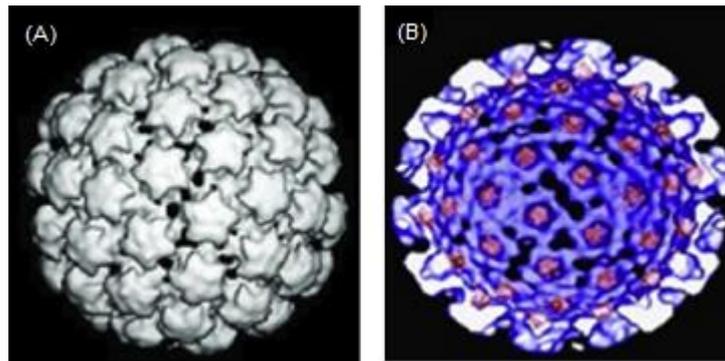


Figura 7: Arranjo das proteínas estruturais L1 e L2 dentro do capsídeo viral (HPV16). (A) Reconstrução de um pseudovírus de HPV16 (imagem de crio-EM) (BUCK et al., 2013). (B) Disposição da proteína L2 (vermelho) no capsídeo viral composto predominantemente por L1 (azul), visão do interior do capsídeo (WANG e RODEN., 2013).

Para que a continuidade do ciclo infeccioso seja garantida, os vírus devem escapar das células infectadas (através do processo de descamação da camada superficial de queratinócitos) e sobreviver no meio extracelular antes da reinfecção (MALIK, 2005). Além disso, algumas mudanças conformacionais no capsídeo são necessárias. Essas mudanças são induzidas pela ligação do capsídeo a receptores de proteoglicanos de heparan sulfato (HSPG) presentes na superfície celular além da interação com a ciclofilina B (proteína da célula do hospedeira). Com isso, a porção N-terminal de L2 torna-se mais exposta e os sítios de ligação para a enzima furina (uma pro-proteína convertase) tornam-se acessíveis (DAY e SCHILLER, 2009). Após a clivagem, a porção de L2 exposta na superfície do capsídeo pode se ligar a receptores na superfície celular, promovendo interações que facilitam a internalização dos virions nas células basais (Figura 8) (WANG e RODEN, 2013).

As características do ciclo de infecção pelo HPV têm implicações importantes no desenvolvimento da resposta imune por parte do hospedeiro. A ausência de sinais necessários para iniciação da resposta imune no epitélio escamosos e o ciclo viral não-lítico reduzem a exposição do vírus ao sistema imune do

hospedeiro, uma vez que não são liberados sinais pró – inflamatórios que atuariam ativando células dendríticas, induzindo a migração de mediadores da resposta imune para o local da infecção (KANODIA et al., 2007).

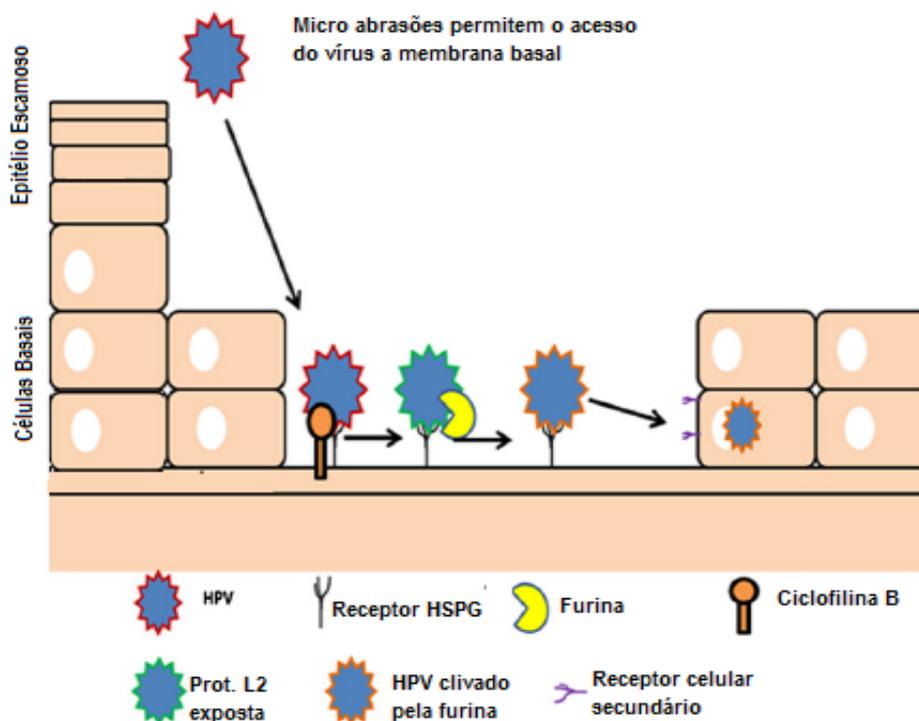


Figura 8: Eventos iniciais da infecção pelo HPV no epitélio cervical (Adaptado de WANG e RODEN, 2013).

2.2.5. A Oncoproteína E5

Embora ainda pouco explorada, comparada as oncoproteínas E6 e E7, a oncoproteína E5 vem se destacando nos últimos anos como um possível antígeno vacinal para fins terapêuticos devido a sua superexpressão em lesões pré-malignas (KIM et al. 2006).

Essa oncoproteína apresenta 83 aminoácidos, com regiões hidrofóbicas bem definidas e agrupadas em um ou mais domínios transmembrana. Tal composição hidrofóbica reforça uma conformação estável que fornece uma interface alternativa para interações protéicas (DiMAIO e PETTI, 2013). A proteína

E5 está localizada principalmente no complexo de Golgi e no retículo endoplasmático e é expressa nos estágios iniciais da infecção pelo HPV (ASHRAFI et al., 2006). Tendo o receptor do fator de crescimento epidermal como alvo potencial, E5 aumenta a eficiência de imortalidade mediada por E6 e E7, e, associada à oncoproteína E7, estimula a proliferação celular (BOULENOAR et al., 2010). Recentemente tem sido reportado que, assim como as oncoproteínas E6 e E7 expressas em HPVs de alto risco, E5 pode alterar a expressão gênica através da regulação celular de miRNAs, como o miR-203 (regulado negativamente por E5) (GRECO et al., 2011).

Estudos como o de Genter Williams et al. (2005), com camundongos transgênicos, demonstraram que E5 é capaz de alterar o crescimento e a diferenciação do epitélio estratificado e induzir o tumor epitelial, além de conferir às células a propriedade de crescimento independente de ancoragem.

Dentre as múltiplas implicações atribuídas a E5, também já foram observadas mudanças morfológicas significantes nas células, reorganização do citoesqueleto de actina, indução da formação de coilócitos em cooperação com E6 e inibição de junções de comunicação intercelular (junções *gap*) (LEWIS, 2008).

Em relação a suas implicações na resposta imune, já foi proposto que a expressão de E5 regula negativamente o MHC classe I, bloqueando seu transporte para superfície celular (ASHRAFI et al., 2006). A alcalinização do ambiente intracelular mediada por E5 ao interferir na homeostase do pH do Complexo de Golgi e inibir a acidificação do endossomo, tem conseqüências na estabilidade do complexo formado pelo MHC classe I e o peptídeo a ser apresentado (REICH et al., 1997; GROMME et al., 1999). Através de mecanismos

semelhantes, E5 também interfere na exposição de peptídeos via MHC classe II (ZHANG et al., 2003). Dessa forma, ao influenciar a capacidade do sistema imunológico de eliminar células infectadas, evidencia-se que E5 pode contribuir para a evasão imune viral, interferindo na vigilância desse sistema durante as fases iniciais da infecção pelo HPV (KANODIA et al., 2007).

Embora estas atividades não sejam necessariamente suficientes para a manutenção do estado maligno de células infectadas, os estudos realizados até o momento sugerem que E5 possa desempenhar um papel importante na fase inicial da carcinogênese (GARNETT e DUERKSEN-HUGHES, 2006). Quantidades significativas de mRNA de E5 encontradas em lesões cervicais intraepiteliais neoplásicas (CIN) reforçam essa idéia (MIURA et al., 2010). Algumas das ações de E5 estão representadas abaixo na Figura 9.

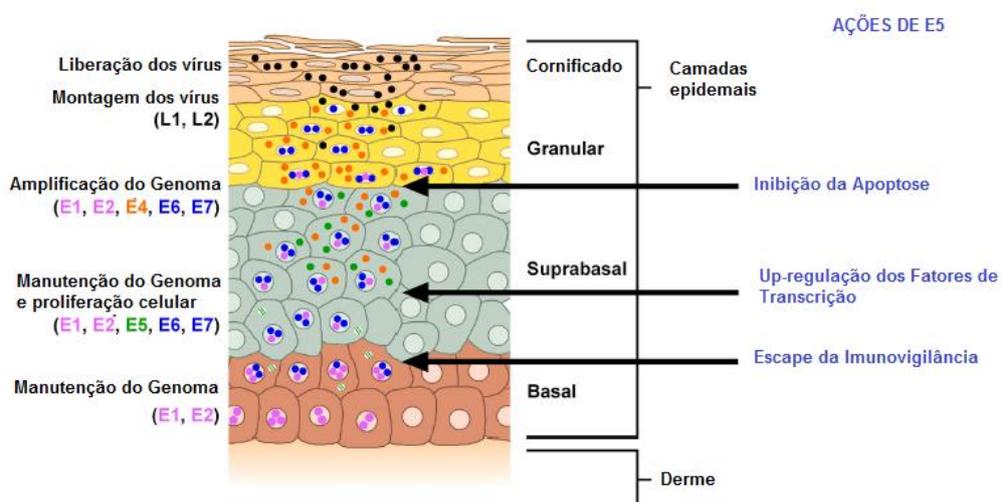


Figura 9: Atividades de E5 alterando fatores do hospedeiro e controlando a replicação e persistência do vírus ao longo do epitélio cervical (Adaptado de VENUTI et al. 2011).

Estudos recentes têm mostrado que vírus oncogênicos, incluindo o HPV, o vírus da Hepatite C e o Epstein-Barr, induzem eventos de fusão celular que contribuem nos estágios iniciais da carcinogênese (DUELLI e LAZEBNIK, 2007). A proteína E5 do HPV16 apresenta características de proteínas fusiogênicas

como localização em membranas plasmáticas, alto nível de hidrofobicidade e habilidade de formar dímeros, e se mostrou necessária e suficiente para induzir fusão célula – célula (Gao e Zheng, 2010).

Em vista das atividades que E5 desempenha no desenvolvimento da carcinogênese cervical, ela vem sendo apontada como um importante mediador para transformação oncogênica (MAUFORT et al. 2010) representando, dessa forma, um possível alvo para estratégias terapêuticas (LIAO et al. 2013).

2.3. Tratamentos Atuais e Estratégias de Controle ao Cancer Cervical

Uma vez identificadas lesões neoplásicas intraepiteliais induzidas pelo HPV, é indicada a excisão cirúrgica dessas lesões, com o intuito de eliminar as células anormais pré-cancerosas, procurando minimizar danos a integridade cervical. Os principais tratamentos propostos para o câncer cervical são cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou uma combinação dessas opções. Embora esse tipo de estratégia seja efetiva para tratar as lesões cervicais, ela não tem como alvo a causa de tais lesões que é a infecção persistente pelo HPV (STERN et al. 2012).

Quando diagnosticado precocemente, o câncer cervical apresenta grandes chances de cura (SCHILLER et al. 2012). Para tanto, são necessários programas eficientes de prevenção e triagem, com a infra-estrutura adequada, para garantir a prevenção em níveis satisfatórios. No entanto, esses programas ainda são realizados de maneira precária em países em desenvolvimento (DE FREITAS et al, 2012).

Ainda que o monitoramento da cérvix uterina por meio do exame Papanicolau e a remoção cirúrgica das lesões resultem numa significativa redução na mortalidade associada ao câncer cervical, ainda há uma baixa taxa de

sobrevivência em pacientes com câncer cervical persistente ou recorrente, e a falta de tratamentos inovadores para esses casos limita avanços significativos no prognóstico (STERN et al. 2012). A utilização de biomarcadores (modulação da expressão de alguns miRNAs por oncoproteínas virais, por exemplo) como mais uma ferramenta diagnóstica ou até mesmo com aplicação para prognóstico são alternativas interessantes para auxiliar na conduta médica para o tratamento (GRECO et al., 2011). Adicionalmente, a incorporação de programas de rastreio e detecção precoce do HPV em lesões cervicais precursoras, aliado ao desenvolvimento de vacinas tanto preventivas quanto terapêuticas são medidas que tem potencial para a redução no número na incidência e mortalidade associadas ao câncer cervical.

2.4. Vacinação e Aspectos imunológicos

A implantação de vacinas preventivas contra patógenos virais que infectam humanos tem um impacto positivo na saúde pública. As vacinas profiláticas contra a infecção pelo HPV apresentam um conceito semelhante ao da vacina contra Hepatite B, e são baseadas em VLPs (*Virus-like Particles*) compostas pela proteína estrutural L1 (produzida como proteína recombinante) organizada em 72 pentâmeros que formam espontaneamente essas estruturas semelhantes ao vírus. Dessa forma, tais vacinas são baseadas no conceito de formar uma estrutura que se assemelha suficientemente ao capsídeo dos vírions de HPV nativos de modo que os anticorpos induzidos sejam capazes de reagir e inativar o vírus autêntico (SCHILLER et al. 2012).

Desde 2006, uma vacina quadrivalente (Gardasil/Silgard®, Merck & Co., Whitehouse Station, NJ USA) que abrange os tipos 6, 11 (baixo risco), 16 e 18 e uma bivalente – 16 e 18 - (Cervarix®, GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart,

Belgium) foram licenciadas em cerca de 100 países e até o início de 2012, programas nacionais de vacinação já haviam sido introduzidos em pelo menos 40 países (STERN et al. 2012). Dentro desse contexto, em 2014 o Brasil passou a disponibilizar pelo SUS a vacina profilática quadrivalente.

Deve-se considerar, no entanto, que essas vacinas são direcionadas apenas a mulheres que não entraram em contato com o vírus, visto que em muitos casos de neoplasias cervicais associadas ao HPV, as células infectadas não expressam níveis detectáveis dos antígenos do capsídeo viral (L1 e L2). Além disso, as principais regiões de superfície expostas na proteína L1 compreendem uma série de alças hipervariáveis que divergem entre diferentes tipos de HPV em resposta a uma pressão seletiva imposta pelo sistema imune do hospedeiro; com isso, anticorpos gerados contra um tipo de HPV se ligam fracamente a outros tipos de HPV (DOOBAR et al., 2015). Essa resposta tipo - específica tem uma implicância importante no contexto das vacinas profiláticas que oferecem uma proteção cruzada limitada. A vacina distribuída no Brasil, por exemplo, engloba os HPVs de alto risco oncogênico -16 e -18, que são os mais prevalentes a nível global, mas deixa de fora outros tipos com potencial oncogênico como -31 e -33, que em diferentes regiões ocupam o segundo lugar como mais freqüente (SILVA et al., 2012). Embora tenha sido relatada proteção-cruzada parcial contra tipos de HPVs não contemplados pelas vacinas licenciadas, a significância clínica dessa proteção parcial permanece incerta (SCHILLER et al., 2012).

Ainda que uma vacina nonavalente (que além dos tipos incluídos na quadrivalente também inclui VLPs dos HPVs - 31, 33, 45, 52 e 58) tenha sido desenvolvida e esteja sendo testada (JOURA et al., 2015), deve-se levar em

conta que o custo de produção de vacinas como esta ainda é elevado e limita sua implantação em países em desenvolvimento.

Diante deste quadro, é evidente a necessidade de desenvolver vacinas profiláticas alternativas. Um alvo interessante para esse tipo de abordagem é a proteína estrutural L2, que é imunogênica e cuja região N-terminal é altamente conservada entre tipos de HPV, podendo elicitar resposta imune neutralizante cruzada (WU et al., 2015). Uma das explicações para essa conservação em L2 é o fato de que essa proteína está menos exposta no capsídeo, ao contrário dos *loops* superficiais de L1 que formam os epítomos neutralizantes das VLPs (RODEN et al., 2001). Uma vez que a resposta humoral gerada seria direcionada contra epítomos de L2 lineares, tais vacinas pan-HPV podem ser baseadas em peptídeos produzidos em bactéria tendo, portanto, um custo de produção menor e uma vida útil mais longa (HELLNER e MÜNGER, 2011). Um ponto importante a ser considerado é que em VLPs compostas por L1 e L2, a resposta humoral gerada nos ensaios de imunização é predominantemente voltada para L1. Por essa razão, o desafio no desenvolvimento de vacinas baseadas em L2 é utilizar o melhor método para expor essa proteína ao sistema imune e manter, em longo prazo, os níveis de anticorpos neutralizantes contra os epítomos de L2 (WANG e RODEN, 2013).

2.4.1. Vacinas Terapêuticas

Abordagens alternativas às existentes se fazem necessárias no cenário atual, dado o expressivo número de pessoas já infectadas, a eficácia limitada dos tratamentos atuais e a baixa adesão à vacinação preventiva (STERN et al. 2012).

Vacinas com potencial não só profilático como também terapêutico tem sido objeto de estudo de diversos grupos de pesquisa nos últimos anos (TRIMBLE et al., 2009; SU et al. 2010). As vacinas terapêuticas têm como alvo infecções já estabelecidas e visam reduzir as lesões tumorais provocadas pelo vírus e impedir a progressão tumoral nas células do epitélio cervical infectadas, reforçando a imunidade celular adaptativa mediada por células T HPV - específicas e podem ter um impacto mais imediato na redução da incidência do câncer cervical (LIN et al. 2010). Células TCD8⁺ desempenham um papel crítico na resposta a células infectadas por vírus; assim, uma vacina com enfoque terapêutico para lesões provocadas pelo HPV é dependente da geração da resposta de células TCD8⁺ contra as células infectadas com o HPV (BAGARAZZI et al. 2012) (Figura10).

Nesse sentido, um largo espectro de estratégias vacinais com esse enfoque vem sendo desenvolvidas incluindo vetores virais recombinantes, vacinas de DNA, vacinas baseadas em proteínas ou peptídeos recombinantes e vacinas baseadas em células dendríticas (SU et al. 2010); algumas dessas já estão sendo testadas em ensaios clínicos e pré-clínicos (BOLHASSANI et al., 2009; KAWANA et al., 2012). Além disso, o desenvolvimento de uma vacina combinada (profilático-terapêutica) poderia oferecer uma combinação interessante de um impacto mais imediato e efetividade a longo-prazo (QIAN et al. 2006).

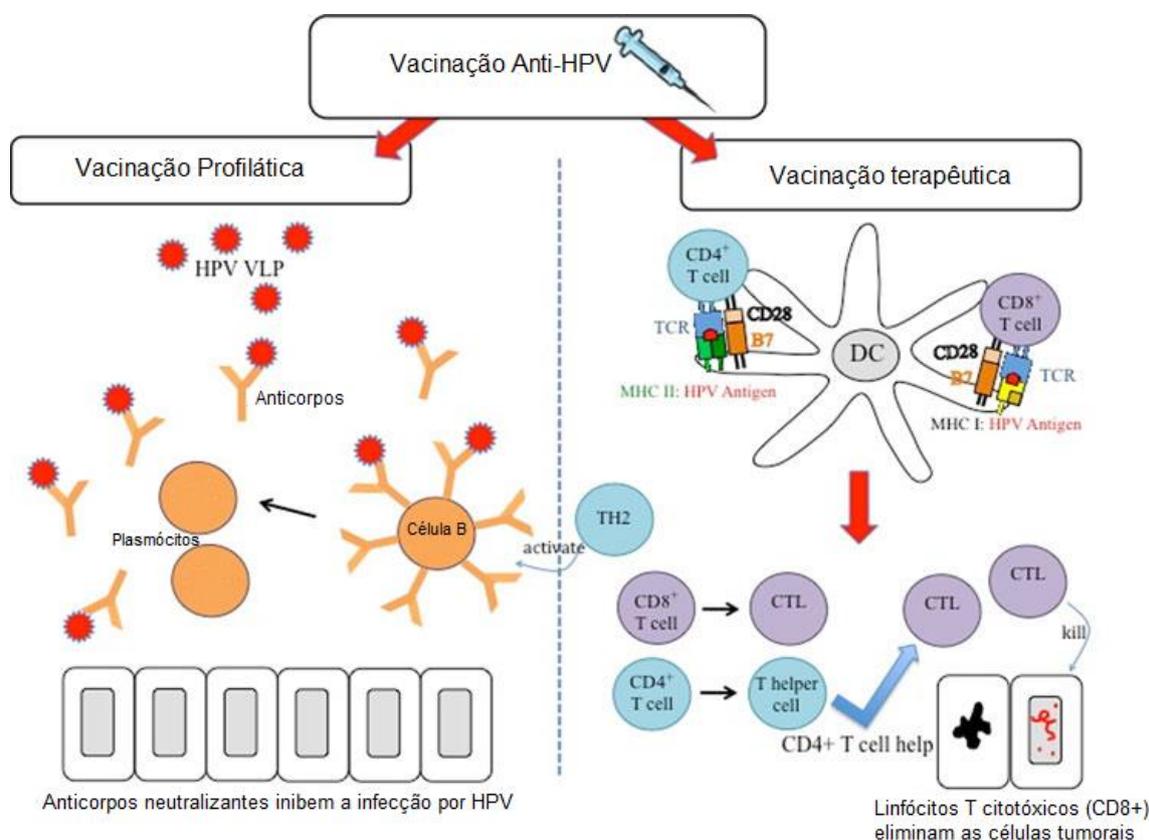


Figura 10: Resumo da resposta imune gerada mediante vacinação anti-HPV. As vacinas profiláticas são focadas na resposta imune humoral: células B se ligam às VLPs e são ativadas por linfócitos T CD4⁺ (células T auxiliares), diferenciando-se em plasmócitos que secretam anticorpos neutralizantes que induzem proteção contra HPV. Em contrapartida, a vacinação terapêutica é voltada para a imunidade mediada por células e envolve a interação entre células apresentadoras de antígeno que apresentam os complexos peptídeo-MHC a células T *naïve* que se tornarão células efetoras CD4⁺ se apresentadas via MHC classe II, ou CD8⁺ se apresentadas via MHC classe I. As células CD4⁺ se diferenciam em células T auxiliares que atuam aumentando a resposta imune CTL ou ativam células B produtoras de anticorpos. (Adaptado de Lin et al., 2010)

2.4.2. VLPs e Capsômeros como Plataformas Vacinais

Estudos acerca das estruturas secundárias formadas pela proteína L1 (Figura 11A) permitem o desenvolvimento de formas alternativas para a exposição de antígenos vacinais. Alterações nos 10 primeiros resíduos da região N-terminal ou nos 30 últimos da região C-terminal de L1 são toleradas e podem ocorrer sem afetar a montagem das partículas virais (CHEN et al. 2001). Por outro

lado, alterações em regiões críticas para as interações entre as estruturas intermediárias ao capsídeo, impedem a formação dos virions, mas podem preservar a formação dos capsômeros (pentâmeros compostos por monômeros da proteína L1). Esses capsômeros apresentam similaridades antigênicas com o vírion de HPV nativo, podem induzir linfócitos citotóxicos contra L1 (OHKSCHLAGER et al. 2003) e tem mostrado capacidade de induzir altos títulos de anticorpos neutralizantes e resposta imune celular mediada por linfócitos T através de imunização oral, intranasal e imunização; tendo também mostrado proteção contra papilomavírus oral em cães (SCHADLICH et al., 2009).

A geração de VLPs ou capsômeros quiméricos contendo resíduos de antígenos heterólogos seja na região C-terminal ou em *loops* expostos na superfície dos monômeros de L1, vem sendo descrita em diversos estudos (VARSANI et al, 2003; SLUPETZKY et al. 2001). Já foi evidenciado que a proteína L1 com deleção C-terminal dos últimos 30 aminoácidos fusionada a oncoproteína E7 com deleção N-terminal de 60 aminoácidos pode produzir VLPs quiméricas que induzem uma resposta humoral neutralizante (BIAN et al., 2008). Nesse mesmo estudo, camundongos imunizados com capsômeros produziram resposta mediada por células contra ambas as proteínas L1 e E7 do HPV16. Dessa forma, proteínas quiméricas resultantes da inserção de epítomos das oncoproteínas E5, E6 ou E7 em L1 podem permitir a indução de uma resposta imune profilático-terapêutica.

Além da região C-terminal, a hélice h4 de L1 vem sendo estudada para apresentação antigênica de epítomos heterólogos (MURATA et al. 2009). Ainda que a deleção de h4 elimine a habilidade de L1 formar VLPs, a montagem dos capsômeros é mantida (BISHOP et al. 2007). Desse modo, epítomos inseridos

dentro do domínio h4 podem ser imunogênicos quando apresentados no contexto dos capsômeros (MURATA et al. 2009).

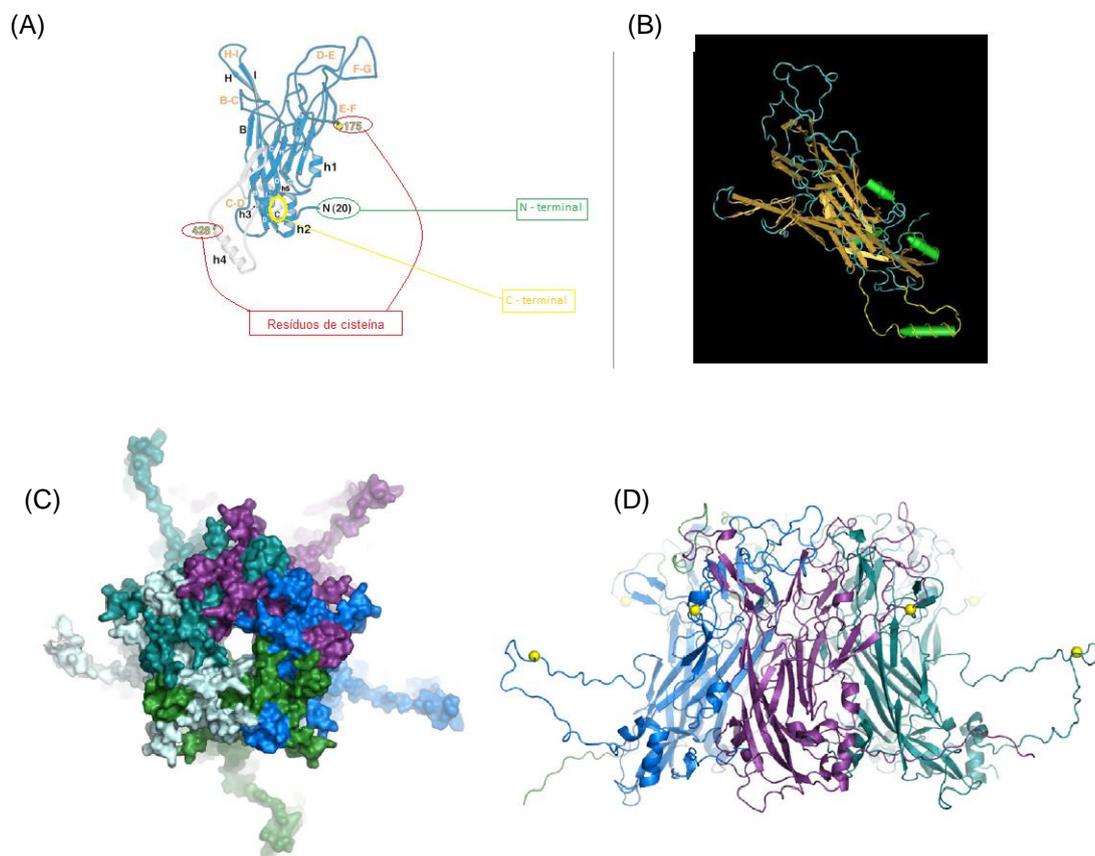


Figura 11: Monômero de L1 e capsômeros. **(A)** Monômero de L1, evidenciando as regiões C-terminal e N-terminal, além dos resíduos de cisteína que formam ponte dissulfeto entre os pentâmeros (Adaptado de MODIS et al., 2002). **(B)** Domínio h4 do monômero de L1 (HPV-16), onde a estrutura h4 está exposta para fora do plano do diagrama. **(C)** Vista lateral de um capsômero (pentâmero), os resíduos de cisteína estão destacados em amarelo. **(D)** Vista superior de um capsômero, onde cada monômero é representado com uma cor diferente (Adaptado de BUCK et al., 2013).

2.5. Sistemas para Expressão Heteróloga

Atualmente mais de 150 proteínas recombinantes com aplicação terapêutica são aprovadas pelas agências de vigilância tanto americana quanto européia (*FDA - Food and Drug Administration*- e Agência Européia de Medicamentos), para diferentes indicações clínicas. Aproximadamente um terço dessas proteínas aprovadas é produzido em *Escherichia coli*, colocando esse

microorganismo como principal hospedeiro para produção desses recombinantes (HUANG et al., 2012). *E. coli* tem sua biologia molecular e características genéticas bem descritas e o grande número de estudos acerca desse organismo como sistema de expressão facilita o conhecimento e o cumprimento das normas de segurança e qualidade definidas pelas autoridades que regulam o uso *in vivo* de proteínas heterólogas para fins terapêuticos.

A produção de proteínas recombinantes em *E. coli* é menos dispendiosa e mais fácil de ser manipulada que em outros sistemas de expressão (GOPAL e KUMAR, 2013). Alguns aspectos podem ser ponderados quando se pretende expressar uma proteína em *E. coli* e são pontos passíveis de otimização, incluindo a linhagem celular utilizada, o vetor de expressão (atentando para o número de cópias, método de indução e promotor), tradução da proteína (estabilidade do mRNA e *codon usage*), expressão citoplasmática (formação de corpos de inclusão e protocolos de solubilização de proteínas), secreção periplasmática e/ ou extracelular, e fermentação como método de produção em larga escala (HUANG et al., 2012). Apesar da ocorrência de problemas relacionados à ausência de uma maquinaria para modificações pós-traducionais, a habilidade da *E. coli* em acumular proteínas recombinantes em até 80% do seu peso seco contribui com a preferência desse sistema de expressão para uma ampla gama de aplicações (PACHECO, et al, 2011).

Sistemas baseados em células de mamífero (MOSSADEGH et al., 2004), inseto (ROSE et al., 1993), leveduras (NEEPER et al.,1996; COIMBRA et al., 2011), bactérias (AIRES et al., 2006; MA et al., 2007) e plantas (MACLEAN et al., 2007; HASSAN et al., 2014) tem sido usados para a expressão de L1 e produção de VLPs ou capsômeros. As atuais vacinas preventivas baseadas em

VLPs são produzidas em células de levedura (Gardasil) e em células de inseto (Cervarix) (SCHILLER et al. 2012). Embora esses sistemas sejam bem estabelecidos quando se visa a produção de proteínas recombinantes em larga escala, eles apresentam custos de produção e distribuição elevados quando comparados ao sistema de expressão bacteriano, por exemplo, que apresenta melhor custo-benefício, fácil manipulação e bom rendimento (ANDERSEN e KRUMMEN, 2002).

Uma abordagem alternativa para reduzir substancialmente o custo de produção das vacinas é o emprego dos capsômeros de L1 substituindo as VLPs. O emprego de capsômeros de L1 produzidos em *Escherichia coli* tem demonstrado sucesso na indução de anticorpos em modelos animais (LI et al. 1997; ROSE et al. 1998). Além disso, vacinas baseadas em capsômeros são estáveis em temperatura ambiente não necessitando de refrigeração, o que pode facilitar a logística e os custos de armazenamento e distribuição dessas vacinas (LIN et al. 2010).

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

O presente trabalho visou à produção de proteínas quiméricas baseadas em *E. coli* no intuito de, posteriormente, avaliar a formação de capsômeros e a imunogenicidade dessas estruturas formadas.

3.2. Objetivos Específicos

- Clonagem das construções baseadas na inserção de epítomos de E5 substituindo epítomos na hélice h4 e na porção C-terminal (34 últimos aminoácidos) de L1, além da inserção de epítomos de L2 também substituindo uma porção da região h4 e da sequência da proteína L1 do HPV16, sem modificações, em vetores de expressão bacteriana;
- Expressão dos genes recombinantes em linhagens de *Escherichia coli*;

4. Material e Métodos

4.1. Materiais

4.1.1. Genes

Os genes recombinantes utilizados nesse estudo foram o gene L1 de HPV16 (GI:27752860) e construções quiméricas (Figura 12) que se baseiam na: (I) substituição de epítomos da oncoproteína viral E5 (aminoácidos 25-33; CHEN et al., 2004) em diferentes regiões da proteína L1 (alça h4 e região C-terminal), com potencial para geração de antígenos profilático-terapêuticos, (II) substituição de epítomos da proteína estrutural L2 (aminoácidos 56-75) (KONDO et al., 2008) na região da alça h4 da proteína L1, para avaliação de possível neutralização cruzada. A amplificação dos referidos genes foi realizada a partir do genoma viral (HPV16) previamente clonado em vetor pBR322 sem otimização de códons. A construção das quimeras foi feita através de PCR de fusão, seguida de subclonagem em vetor pGEM-T Easy (Promega) (MARIZ, tese em preparação).

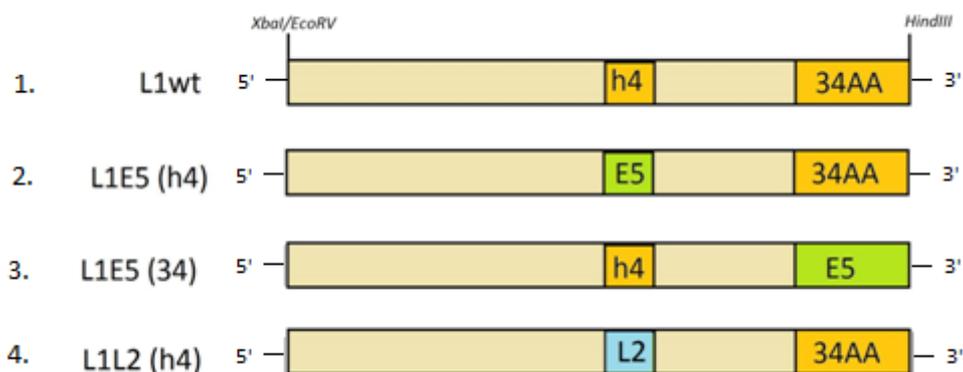


Figura 12: Desenho esquemático dos genes de estudo. Todos os genes apresentam sítios de restrição para as enzimas *XbaI* e *EcoRV* na região 5' e para *HindIII* na região 3'. **1.** Gene *L1* selvagem, sem modificações (1544pb). **2.** Substituição na região da alça h4 de *L1* por epítomos do gene *E5* (1538pb). **3.** Substituição na região C-terminal de *L1* referente aos últimos 34 aminoácidos por epítomos do gene *E5* (1514pb). **4.** Substituição na região da alça h4 de *L1* (1526pb) por epítomos do gene *L2*.

4.1.2. Vetores

Os genes de interesse clonados em pGEM-T Easy (Promega) foram subclonados nos vetores de expressão pAE (RAMOS et al., 2004) e pGEX4T-3 (GE Healthcare), no intuito de permitir a produção e purificação das proteínas recombinantes em *Escherichia coli*. O vetor pAE (Figura 13) apresenta características de ambos os vetores do qual é derivado (pET-His e pRSETA): tamanho pequeno (2,8Kb), expressão de *tag* de Histidina (6XHIS) N-terminal e produção de alto número de cópias de plasmídeo por célula. Adicionalmente, o referido vetor tem sistema de controle transcricional baseado no gene T7 RNA polimerase e apresenta o gene de resistência a ampicilina como marca de seleção.

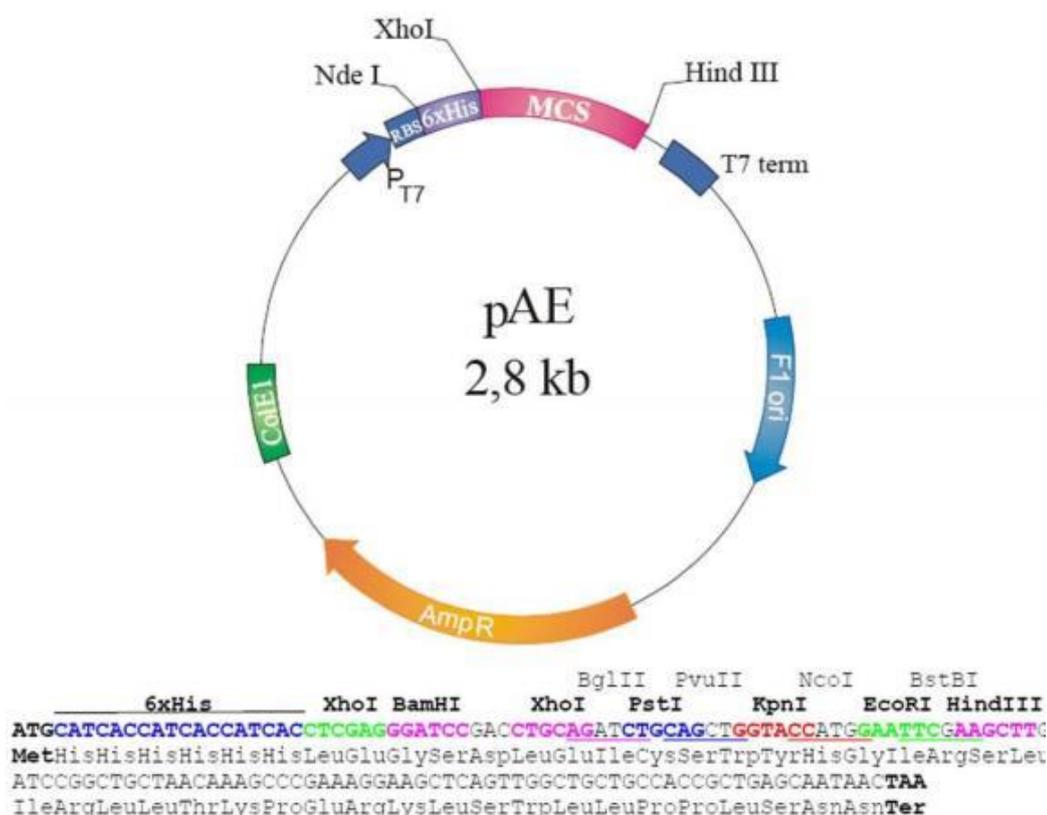


Figura 13: Mapa do vetor pAE (RAMOS et al., 2004)

Por outro lado, o vetor pGEX4T-3 (4,9 kb) tem GST (Glutathione S-transferase), 26KDa, como proteína de fusão N-terminal e a expressão dos genes clonados nesse vetor está sob o controle do promotor *tac* que é induzível por IPTG (isopropil- β -D-galactosídeo), assim como o promotor T7 presente no pAE (Figura 14).

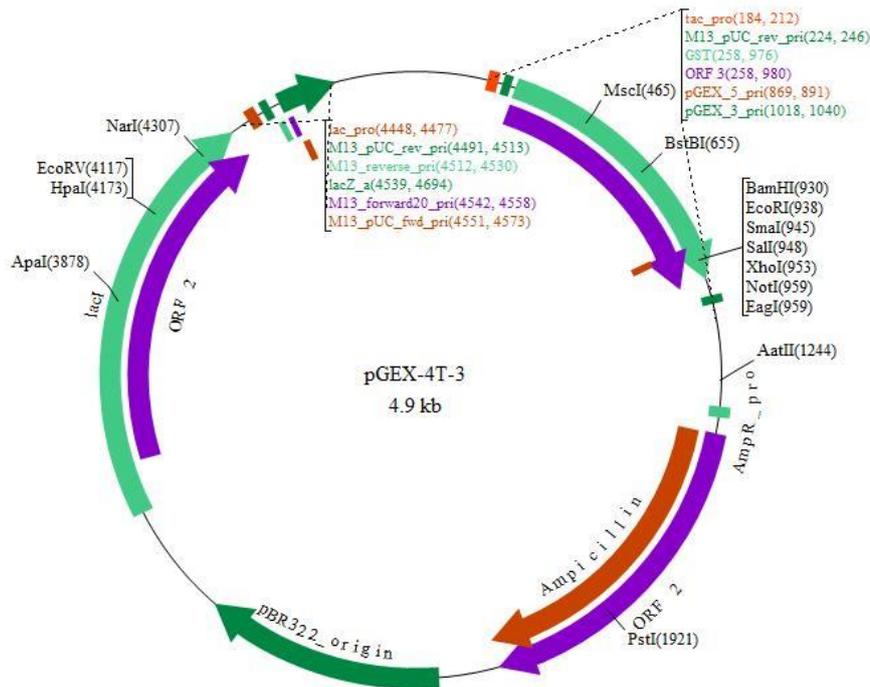


Figura 14: Mapa do vetor pGEX4T-3 (GE Healthcare)

4.1.3. Linhagens de Microorganismos

Diferentes linhagens de *Escherichia coli* foram utilizadas nos experimentos de clonagem e expressão dos recombinantes, como descrito no Quadro 2.

Quadro 2: Genótipos e aplicações das cepas de *E. coli* utilizadas no estudo

LINHAGEM	GENÓTIPO	APLICAÇÃO
Top10	<i>F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)φ 80lacZΔ M15 ΔlacX74 recA1 araD139Δ (ara leu)7697 galJ galK rpsL (StrR) endA1 nupG</i>	Propagação de DNAs plasmidiais provenientes das ligações de produtos de PCR no vetor pGEM-T <i>Easy</i> e de plasmídeos com alto número de cópias. As mutações <i>endA1</i> e <i>recA1</i> são vantajosas por eliminar degradação pela endonuclease I e reduzir ocorrência de recombinação não-específica, levando a uma inserção mais estável.
BL21 DE3	<i>F-ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm λ(DE3)</i>	Alto nível de expressão de proteínas recombinantes com promoção de uma estabilidade aumentada dos transcritos de RNAm. Sistema de expressão baseado no promotor T7, sendo a adição de IPTG necessária para induzir a expressão das proteínas heterólogas.
Rosetta DE3	<i>(F- ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3) pRARE (Cam^R)</i>	Apresenta as mesmas características e aplicações que a cepa BL21, além de compensar os tRNAs para os códons AGG, AGA, AUA, CUA, CCC e GGA que são os códons menos frequentes em <i>E. coli</i> .

4.1.4. Meio de Cultura e Condições de Cultivo

Para as etapas de transformação, repique e inóculo foi utilizado o meio de cultura Luria-Bertani (LB) que apresenta a seguinte composição: triptona 1%, extrato de levedura 0.5% e NaCl 1%, adicionando 100 µg/mL de Ampicilina. Para meio sólido, foi acrescentado 1,5% de ágar. A temperatura de incubação para cultivo foi 37°C, overnight. Durante os ensaios de indução, o pré-inoculo e o inoculo foram cultivados a 37°C e após a adição de IPTG a temperatura foi mantida a 25°C.

4.1.5. Soluções e Tampões

Soluções para extração de DNA plasmidial, segundo protocolo descrito por SAMBROOK et al (1989): Solução I: Tris-HCl 25mM, EDTA (Ácido Tetracético Etilenodiamina) 10mM, glicose 50mM, água destilada estéril; Solução II: NaOH

0,4N, SDS 2%; Solução III: acetato de potássio 5M, ácido acético glacial, água destilada estéril.

Tampão de corrida para eletroforese de DNA: TAE 10x: Tris base 400mM, ácido acético 190mM, EDTA 10mM pH 7.6.

Soluções para SDS-PAGE: Tampão de corrida (10x, pH 8.6): Tris 25mM, SDS 0,1%, glicina 192mM; Tampão de Amostra 2X (L2x): Tris-HCl (pH 6.8 - 0.5M), glicerol 100%, SDS 10%, Azul de bromofenol, 2-Mercaptoetanol; *Coomassie Brilliant Blue*: azul de Coomassie-blue G-250 0,05%, metanol 45%, ácido acético 10% e água destilada estéril 45%; Solução descorante: Ácido acético 7%, metanol 25% e água destilada estéril 68%.

Soluções para transferência e *Western blot*: Tampão de transferência: Tris 60mM, Glicina 48mM, SDS 10%, metanol 20%; Solução tampão TBS (Tris-Salina) 10x: Tris-HCl 0.5M, NaCl 1.5M pH 7.6 (para solução de lavagem com TBS-Tween, diluir 1:100 e acrescentar 100 μ L de Tween para 1L de TBS 1x); Solução de bloqueio: leite 5% diluído em TBS-Tween.

4.1.6. Géis para Eletroforese de DNA e de Proteínas

Para realização de eletroforese para DNA foram utilizados géis de agarose a 1% com o tampão TAE 1X. Foi adicionado ao gel solução de brometo de etídeo (0,5 μ g/ml) para promover visualização das bandas de DNA através de um transluminador de luz ultravioleta. O material foi aplicado junto com tampão de amostra (*Loading Dye* 6X), tendo como referencial o marcador de 1Kb (Gene Ruler DNA Ladder, *Loading Dye* e água milliQ).

Os géis de poliacrilamida para SDS-PAGE foram preparados com concentração de 12,5%. As amostras do extrato protéico foram ressuspensas em tampão desnaturante (L2x) e aquecidas a 75°C (10 minutos) ou 95°C (5

minutos). Foi empregado o tampão de corrida para SDS-PAGE 1X. As corridas de eletroforese foram realizadas com fonte de tensão constante e ajustável por cerca de 90 minutos, 35mA. Para visualização das bandas de proteínas, os géis foram corados com *Coomassie Brilliant Blue*. Como referencial para análise das bandas de proteínas, foi utilizado marcador de peso molecular *Page Ruler Prestained Protein Ladder* (ThermoScientific).

4.1.7. Enzimas

As enzimas e as condições das reações enzimáticas utilizadas ao longo do presente trabalho estão relacionadas na Quadro 3.

Quadro 3: Enzimas e reações

REAÇÃO	ENZIMAS	FABRICANTE	SÍTIO DE CLIVAGEM	TEMPERATURA	VOLUME	DURAÇÃO
Digestão	<i>EcoRV</i>	Promega	GAT [^] ATC	37°C	20µL	3h ou overnight
	<i>HindIII</i>	Fermentas	A [^] AGCTT	37°C		
	<i>NcoI</i>	Fermentas	C [^] CATGG	37°C		
	<i>SalI</i>	Promega	G [^] TCGAC	37°C		
	<i>SmaI</i>	Promega	CCC [^] GGG	25°C		
Ligação	T4 DNA ligase	Promega	-	4°C ou temperatura ambiente (de acordo com a duração)	10µL	3h ou overnight

4.2. Métodos

4.2.1. Clonagem no vetor pAE

As construções plasmídias contendo os genes de interesse clonados em pGEM-T Easy (Promega) foram digeridas com as enzimas de restrição *NcoI* e *HindIII*, escolhidas após análise dos sítios de restrição presentes no vetor pAE. Após a digestão, os genes foram purificados do gel de agarose com o *kit Wizard*

SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). O mesmo procedimento foi utilizado para o vetor pAE. Uma vez digeridos e purificados, os insertos e o vetor foram submetidos à reação de ligação (tabela 3) sob ação da enzima T4 *ligase*, seguindo orientações do fabricante, numa proporção 5:1 (inserto:vetor) e os plasmídeos resultantes da reação foram usados como agente transformante para *Escherichia coli* (Top10). Resumidamente, o protocolo de transformação utilizado consistiu das seguintes etapas: os produtos da reação de ligação (10µL) foram adicionados a 50µL de células quimiocompetentes (previamente tratadas com CaCl₂), homogeneizados e mantidos no gelo por 25 minutos; passado esse período de incubação, as células foram submetidas a um choque térmico (42°C) por 5 minutos. Após o choque, as células foram mantidas no gelo por mais 5 minutos e então foi adicionado 800µL de meio LB sem antibiótico, com posterior incubação a 37°C por 1 hora. As células foram então centrifugadas a 1200 rpm e alíquotas de 200µL foram semeadas em placas de LB com ampicilina.

As colônias resistentes a ampicilina foram selecionadas e repicadas para triagem das colônias com os recombinantes, com subsequente inoculo e extração do DNA plasmidial (segundo protocolo descrito por SAMBROOK et al., 1989). A confirmação da clonagem se deu por análise dos fragmentos obtidos após o tratamento das moléculas de DNA resultantes com enzimas de restrição e análise dos insertos gerados. Foram preparados preservados dos clones confirmados (500µL de Glicerol 100% + 500µL de cultura), com acondicionamento a -80°C.

4.2.2. Indução da Expressão Gênica

Os plasmídios recombinantes portando cada construção -L1wt, L1L2, L1E5(h4) e L1E5(34)- foram transformados (conforme metodologia já descrita) em *E. coli* BL21 e Rosetta, com posterior repique das colônias resultantes. Os

ensaios de indução foram feitos inicialmente em cultura de 2mL conforme o seguinte protocolo inicial: 100µL de cultura overnight em meio LB com ampicilina foram inoculados em 2mL de meio com antibiótico; após 2 horas de crescimento (37°C, 150rpm) foi adicionado IPTG como agente indutor numa concentração final de 0,3mM e a cultura foi mantida a 25°C, por 4h (150 rpm). Ao fim do período de indução foram feitas alíquotas de 500µL e 1mL para posterior análise tanto por visualização em SDS-PAGE, quanto por *Western blot*. As alíquotas de 500µL e 1mL foram centrifugadas (12000 rpm; 5 minutos), os sobrenadantes resultantes da centrifugação foram descartados e os sedimentos (*pellets*) foram ressuspensos em 100µL e 200µL do tampão desnaturante (L2x) e submetidas a banho-maria a 95°C por 5 minutos. Também foram retiradas alíquotas (500µL) de cada cultura antes da adição do agente indutor, servindo como controle não induzido. Uma linhagem recombinante contendo o vetor pAE sem inserto também foi induzida para ser usada como controle negativo nos experimentos de imunodeteção.

Ao longo das análises dos resultados obtidos foram feitas modificações no protocolo-piloto de indução e preparo das amostras. Foram testadas concentrações de IPTG de 0,4 e 0,5mM, além de aumento no tempo de indução de 4h para aproximadamente 20h em culturas de 20mL, mantendo-se a temperatura de incubação em 25°C. As amostras passaram a ser aquecidas a 75°C por 10 minutos. A alteração na temperatura e tempo para lise das amostras se deu com objetivo de melhorar o padrão de corrida.

Além das mini-induções, foi realizada indução em um volume maior de cultura (100mL) com objetivo de recuperar uma maior quantidade de material para posterior purificação usando resina de níquel (resina Ni-NTA agarose Qiagen). As

amostras foram induzidas com 0.5mM de IPTG, por 4h a 25°C. O pellet foi ressuspensionado em 4 mL de tampão de lise (Tris 20mM, NaCl 50mM, CaCl₂ 2mM; pH 7.5), e a lise se deu por ciclos de congelamento (5 ciclos de 10 minutos, -80°C) e descongelamento (temperatura ambiente). O protocolo de purificação foi executado de acordo com orientações do fabricante. Ao longo do processo foram retiradas as seguintes alíquotas para posterior checagem (através de SDS-PAGE e *western blot*): lisado, fração não-adsorvida, lavagens (3) e eluições (3).

A avaliação da expressão das proteínas recombinantes foi feita inicialmente por meio de análise de SDS-PAGE. Os géis de poliacrilamida (12,5%) foram corados com *Coomassie Brilliant Blue* para permitir a visualização das bandas.

4.2.3. Análise da Expressão Heteróloga por *Western Blot*

Após visualização do extrato protéico total das amostras induzidas, em SDS-PAGE, foram realizados ensaios de *Western blot* para confirmação da produção das proteínas. As amostras foram submetidas a eletroforese por 90 minutos, 35mA, seguida por transferência (25V, 35 minutos) para membrana de PVDF (Fluoreto de Polivinilideno) em cuba de transferência semi-seca. A eficiência da transferência foi checada através da coloração da membrana com *Ponceau-S*. A imunodeteção foi realizada após bloqueio da membrana com solução de leite 5% em TBS-Tween, hibridização com anticorpo monoclonal anti-L1 de HPV-16 Camvir® (Chemicon®) e hibridização com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase. As diluições (em solução bloqueio) de anticorpo primário testadas ao longo dos experimentos foram de 1:2000 e 1:3000, e para o anticorpo secundário foram de 1:5000 e 1:10000.

Foram realizadas duas etapas de lavagem das membranas com TBS-Tween 1X (três incubações por 10min em cada etapa), entre as incubações com os anticorpos primário e secundário, bem como antes da revelação da reação. Os tempos de incubação em solução de bloqueio testados foram de 60 minutos e 90 minutos a temperatura ambiente ou por 16 horas a 4°C. A incubação com anticorpo primário foi realizada durante 3 e 4 horas a temperatura ambiente ou por 16 horas a 4°C. Já as incubações com anticorpo secundário ocorreram por 1 hora em todos os experimentos. Como controle positivo foi usado uma amostra do extrato protéico de uma linhagem recombinante de *Pichia pastoris* expressando a proteína L1 de HPV-16 (MARIZ et al. 2015).

Para revelação da reação, utilizou-se substrato quimioluminescente baseado em três reagentes: Luminol e Iodofenol, ambos da SigmaAldrich®, e peróxido de hidrogênio comercial. Para visualização da reação quimioluminscente, empregou-se filme *Amersham Hyperfilm ECL* e reagente Dektol (Kodak), e soluções de ácido acético para fixação.

4.2.4. Clonagem e expressão utilizando o vetor pGEX4T-3

Ao longo dos experimentos e mediante dos resultados obtidos, algumas otimizações foram realizadas, com o objetivo de melhorar os níveis de expressão obtidos. Algumas dessas alterações já foram mencionadas como troca da cepa a alguns parâmetros de cultivo, como sumarizado no quadro 4. Desse modo, além do vetor pAE, as construções foram clonadas no vetor pGEX4T-3 com objetivo de comparar os perfis de expressão utilizando cada vetor. Os genes foram retirados do vetor pGEM-T *Easy* através de digestão com as enzimas *EcoRV* e *SaII*. O vetor pGEX4T-3 foi digerido com as enzimas *SmaI* e *SaII*. Após digestão e purificação,

os insertos e o vetor foram submetidos a reação de ligação e utilizados para transformação de células *E. coli* Top10, conforme protocolo descrito anteriormente.

A indução e análise da expressão foram executados nas mesmas condições descritas nos tópicos 4.2.3 e 4.2.4.

Quadro 4: Otimizações realizadas ao longo dos experimentos

Fatores	Alterações
Vetor	pAE → pGEX 4T-3
Proteína de Fusão	His-tag → GST-tag
Linhagem celular	BL21 → Rosetta
Parâmetros de cultivo	Tempo, concentração de IPTG, temperatura de incubação

4.2.5. Análise da ocorrência de códons raros

O número de códons raros nas sequências dos genes do presente estudo foi calculado utilizando o “*Rare Codon Calculator (RaCC)*”, que é uma ferramenta online disponível em <http://nihserver.mbi.ucla.edu/RACC/>. Tal ferramenta fornece o número de códons que codificam os aminoácidos: Arginina, Leucina, Isoleucina e Prolina, que são os códons que ocorrem em menor frequência em *E. coli* (Kane 1995). Essa investigação foi feita com o objetivo de observar se o número total de códons raros influencia de alguma forma a expressão dos genes, atentando particularmente para os códons de Arginina (AGA e AGG) que, assim como seus tRNAs cognatos, são os menos frequentes em *E. coli* e tem mostrado associação com erros traducionais e baixos níveis de expressão (Calderone et al, 1996; Burgess-Brown et al.2008). Além do número de códons Arg, são mostradas suas

posições dentro da sequência e o número de repetições duplas e triplas em tandem.

4.2.6. Solubilização dos corpos de inclusão

A indução da produção de proteínas heterólogas em *E. coli* pode levar a formação de agregados protéicos insolúveis denominados corpos de inclusão. Para acessar as proteínas presentes nesses agregados se faz necessário adotar protocolos de solubilização. O protocolo seguido no presente trabalho foi adaptado de Lai e Middelberg (2002). Após indução da expressão dos genes clonados no vetor pAE, utilizando-se IPTG 0,3mM, por 20h a 25°C, culturas de 15mL (*E. coli* BL21) foram centrifugadas a 5000rpm por 15 minutos e o *pellet* resultante da centrifugação foi ressuspendido em 600µL de Tampão de Lise (Tris 50mM – pH 8.0; EDTA 6 mM; 0,1mM PMSF). A lise celular se deu através de 5 ciclos de congelamento (-80°C, 5 minutos) e descongelamento (temperatura ambiente), com posterior centrifugação a 10000rpm por 10 minutos. O sobrenadante (lisado) foi armazenado a -20°C e o sedimento foi submetido a três lavagens para remoção de contaminantes solúveis. 1º lavagem: 1mL do Tampão A (pH 8.0) composto por Tris 100mM; NaCl 100mM; 1% Triton X-100. 2º lavagem: 1mL do Tampão A + Ureia 2M. 3º lavagem: 1mL solução Tris 50mM (pH 8.0). Entre cada lavagem foram realizadas centrifugações de 10000 rpm por 10 minutos. O *pellet* resultante da centrifugação da última lavagem foi ressuspendido em 600µL de Tampão de Solubilização (Tris 50mM – pH 8.0; DTT 50mM; Ureia 8M; PMSF 0,1mM) e centrifugado nas mesmas condições dos passos anteriores. Adicionalmente, após essa última centrifugação o *pellet* foi ressuspendido novamente em 600µL de Tampão de Solubilização e incubado por 2h a 25°C sob agitação, com posterior centrifugação. Os sobrenadantes de cada etapa: extrato

protéico total (lisados), lavagens e extratos solubilizados foram armazenados a -20°C até o momento da análise por SDS-PAGE. Para aplicação das amostras foram feitas alíquotas de 60µL e adicionado o tampão de amostra *L2x*, numa proporção de 1:1. As amostras foram, então, aquecidas e aplicadas (30µL) em gel de poliacrilamida (12,5%).

5. Resultados

5.1. Clonagens pAE

Após análise dos sítios de restrição, os genes clonados no vetor pGEM-T Easy e o vetor pAE sem inserto foram digeridos com as enzimas *Nco*I e *Hind*III, e posteriormente purificados (Figura 15-a e 15-b). Dessa forma, os fragmentos de interesse e o vetor passaram a apresentar terminais coesivos, o que possibilitou a inserção dos genes e a obtenção das construções por meio de reação de ligação com a enzima T4 DNA ligase. Células *E. coli* Top 10 quimiocompetentes transformadas com alíquotas da reação de ligação mostraram-se resistentes à ampicilina quando submetidas à seleção em placa. As linhagens recombinantes obtidas foram submetidas à extração plasmidial e análises de restrição enzimática confirmaram a correta obtenção dos vetores de expressão (Figura 15-c).

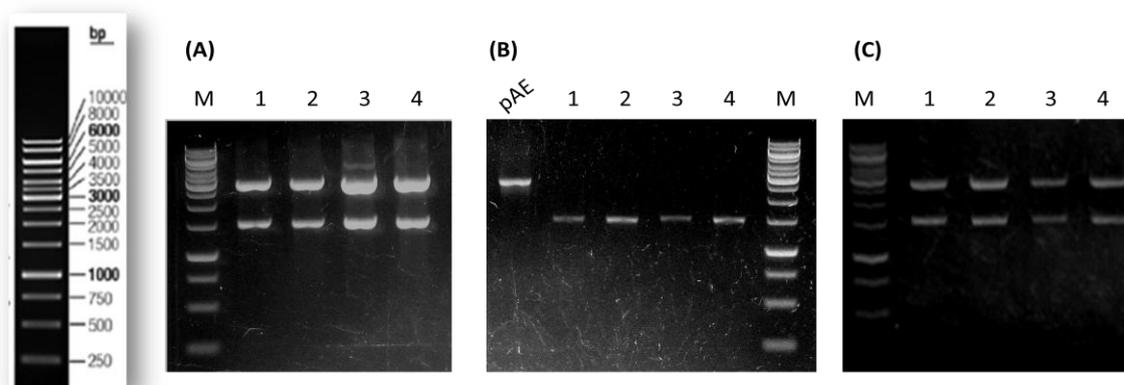


Figura 15: Clonagens pAE. Digestões *Nco*I e *Hind*III; Eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE; (A) Clones pGEM-T Easy; (B) Purificação das digestões dos clones pGEM-T Easy e vetor pAE (sem inserto – 3Kb); (C) Clones pAE. M- Marcador Ladder Gene Ruler 1Kb ThermoScientific. Ordem das amostras para os três géis: 1- L1wt (1544bp), 2-L1L2 (1538bp), 3-L1E5(h4) (1514bp), 4-L1E5(34) (1526bp).

5.2. Produção e Detecção das Proteínas em *E. coli* BL21

Após confirmação da clonagem dos genes de interesse em pAE, alíquotas dos vetores de expressão foram empregadas para transformação de *E. coli* BL21 e alguns clones foram selecionados para os ensaios de indução da expressão das

proteínas heterólogas. Inicialmente, a avaliação da produção das proteínas foi feita por análise dos géis de poliacrilamida corados com Coomassie. Como mostrado na Figura 16, não foi possível observar diferença no padrão de expressão quanto a presença de bandas em torno de 55 kDa (peso molecular esperado tanto para a proteína L1 selvagem quanto para as quimeras) quando comparamos as amostras de extrato protéico provenientes de células induzidas com as não-induzidas, bem como com bactérias transformadas com o vetor sem inserto (usado como controle negativo de expressão).

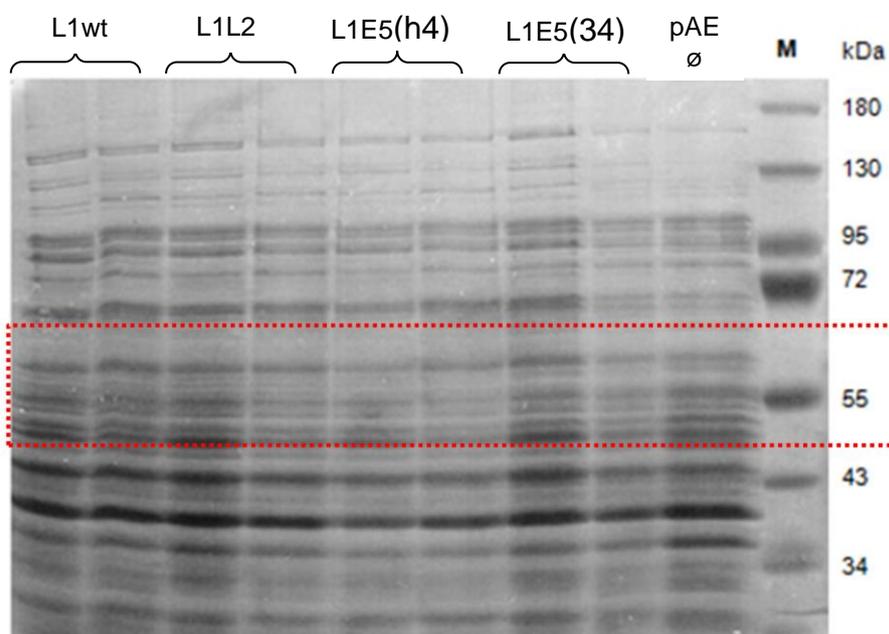


Figura 16: SDS-PAGE 12,5% (corado com *Coomassie*) do extrato proteico de células de *E. coli* BL21 induzidas com IPTG 0.3mM *versus* Extrato de células não-induzidas transformadas com cada construção; **M** – marcador de peso molecular pré-corado PageRuler™ (ThermoScientific). Tomando como base o marcador, a banda de referência para o tamanho esperado para as proteínas é a de 55KDa.

A confirmação da produção das proteínas recombinantes ocorreu por meio de imunodeteção, empregando o anticorpo monoclonal CamVir (anti-L1 de HPV16) com posterior hibridização com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase e revelação da reação por

quimioluminescência. Ao longo dos experimentos foi necessário otimizar as condições de preparo e aplicação das amostras visando melhorar o padrão de corrida observado a partir dos extratos proteicos. Nesse sentido, foram testados modos diferentes de lise, mudando a temperatura (de 95°C para 75°C) e o tempo de aquecimento das amostras (de 5 para 10 minutos), além do ajuste na quantidade de tampão desnaturante (L2x) usado para ressuspender os *pellets* resultantes da indução. Tais alterações melhoraram o padrão de corrida, diminuindo o rastro nas amostras que havia sido observado tanto no SDS-PAGE quanto nos experimentos de *Western blot* subsequentes.

No intuito de melhorar os níveis de expressão, também foram realizados ajustes nas concentrações de IPTG e tempo de indução. As concentrações de IPTG utilizadas variaram de 0.2mM a 0.5mM, mas não foi observada diferença marcante na expressão. Os primeiros ensaios de indução foram realizados por 4h, a 25°C, e posteriormente, foi testado protocolo com tempo de indução prolongado (20h), mantendo-se a temperatura usada. Esse prolongamento do período de indução não resultou em notável aumento nos níveis de expressão, comparando a alíquota retirada após 4 horas de indução e a alíquota após indução *overnight* (Figura 17).

A produção da quimera L1E5(34) foi detectada apenas após a adoção do protocolo de indução por tempo prolongado. De todas as construções analisadas, apenas a quimera L1E5(h4) não teve sua expressão detectada. As demais proteínas recombinantes apresentaram tamanho molecular de aproximadamente 55KDa como esperado e em concordância com a proteína observada na amostra controle positivo (linhagem de *P. pastoris* expressando L1 de HPV16).

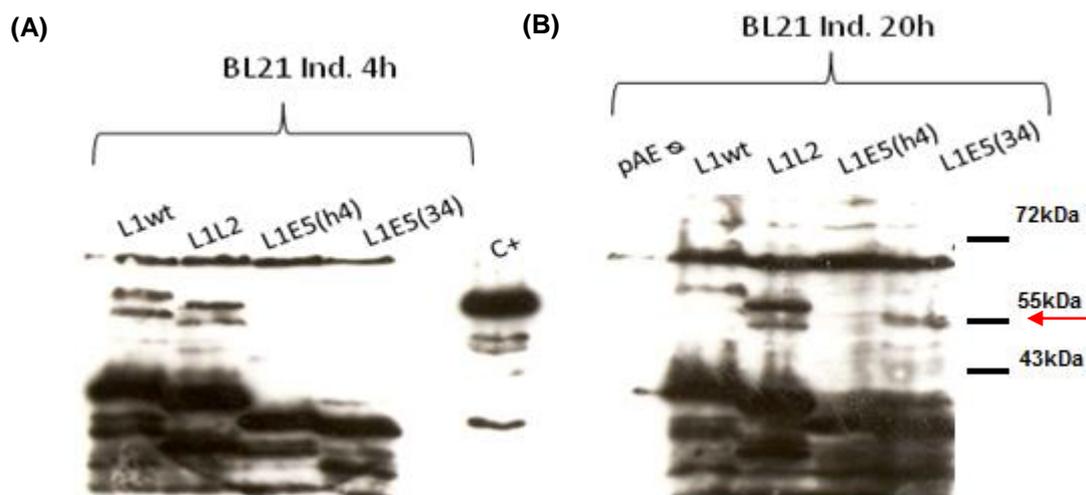


Figura 17: Western blot com o extrato proteico de culturas BL21 induzidas (IPTG 0.3mM) durante 4h (A) e 20 horas (B). **C-:** extrato proteico de células induzidas transformadas com vetor pAE (vetor sem inserto). **C+:** Lisado L1wt (*Pichia pastoris*, ind. 48h). Anticorpo primário: CamVir (1:3000), e secundário: anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (1:5000). A seta vermelha indica a banda de referência para o tamanho esperado para as proteínas (55kDa).

Com o objetivo de recuperar uma maior quantidade de material para purificação das proteínas recombinantes, um ensaio de indução em maior escala (100mL) foi realizado. A purificação foi feita por cromatografia de afinidade, usando resina de níquel (Ni-NTA agarose Qiagen). Tal procedimento é aplicável uma vez que o vetor pAE fusiona cauda de poli-histidina às proteínas recombinantes. Foram retiradas alíquotas de cada etapa do processo (lisado, fração não-adsorvida, lavagens e eluições), entretanto não foram visualizadas bandas referentes às proteínas purificadas nas alíquotas das eluições após análise de SDS-PAGE corado com *Coomassie*. As análises por *western blot* com tais amostras forneceram detecção apenas das proteínas nas alíquotas referentes ao lisado protéico e fração não-adsorvida (Figura 18).

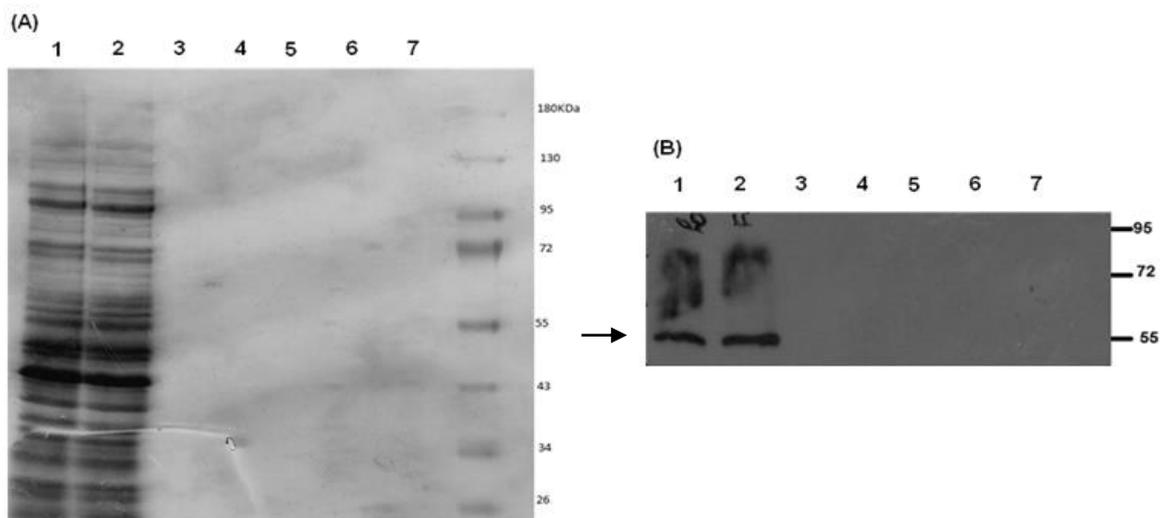


Figura 18: SDS-PAGE e Western blot com amostras referentes às etapas do processo de purificação por resina de níquel. (A) SDS- PAGE 12% (B) *Western blot* (Anticorpo primário: CamVir (1:3000), e secundário: anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase). **1:** Lisado (Extrato total), **2:** Fração não-adsorvida, **3:** Lavagem-1, **4:** Lavagem-2, **5:** Eluição 1, **6:** Eluição 2. A seta indica a banda de referência para o tamanho esperado para as proteínas (55KDa).

5.3. Análise da ocorrência de códons raros

Visando analisar as sequências dos genes quanto à presença de códons considerados raros para *E. coli*, foi utilizada a ferramenta *online* RaCC. Os resultados gerados estão dispostos na Tabela 1. O número total de códons foi semelhante entre as quatro sequências, diferindo apenas em L1wt que apresentou um número maior que as demais. Nesse tipo de análise é importante atentar para o número de códons Arg que são os menos freqüentes em *E. coli* e, de acordo com o número e disposição dentro da sequência, podem acarretar problemas na síntese protéica. Esses códons estão mais densamente distribuídos entre os primeiros 40 e 300 nucleotídeos, mas não foram encontrados formando repetições em tandem.

Tabela 1: Resultado da análise das seqüências a respeito da presença de códons raros

GENE	TAMANHO (pb)	NÚMERO DE CÓDONS Arg	POSIÇÃO DOS CÓDONS Arg	REPETIÇÕES (DUPLAS OU TRIPLAS) DOS CÓDONS Arg EM TANDEM	NÚMERO TOTAL DE CÓDONS RAROS
L1wt	1544	11	41, 71, 74, 144, 252, 258, 263, 315, 365, 419, 485	-	33
L1L2	1526	10	41, 71, 74, 144, 252, 258, 263, 315, 365, 479	-	31
L1E5(h4)	1538	10	41, 71, 74, 144, 252, 258, 263, 315, 365, 483	-	31
L1E5(34)	1514	10	41, 71, 74, 144, 252, 258, 263, 315, 365, 419	-	31

5.4. Produção e Detecção das Proteínas em *E. coli* Rosetta DE3

Os mesmos clones utilizados na transformação de células de *E. coli* BL21, foram utilizados nos experimentos com Rosetta DE3. Essa nova cepa compensa tRNAs para os códons AGG, AGA, AUA, CUA, CCC e GGA comumente usados em eucariotos, mas raramente utilizados por *E. coli*. A Figura 19 mostra o resultado do *western blot* feito com os extratos induzidos por IPTG 0,3mM (4h, 25°C). A membrana foi incubada com os mesmos anticorpos e nas mesmas condições dos experimentos anteriores. O padrão de expressão observado foi semelhante aos que já haviam sido obtidos utilizando-se a linhagem BL21.

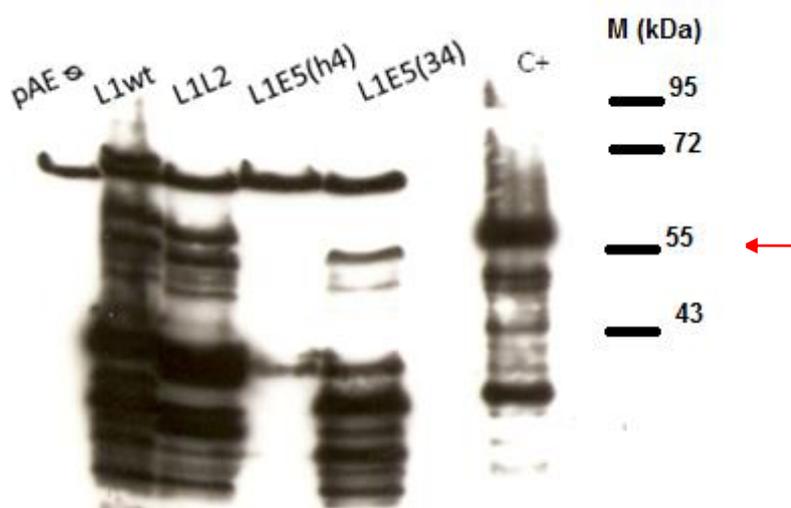


Figura 19: Western blot com o extrato proteico de culturas Rosetta DE3. Indução: IPTG 0.3mM, por 4h. **C-**: extrato proteico de células induzidas transformadas com vetor pAE (vetor sem inserto). **C+**: Lisado L1wt (*Pichia pastoris*, ind. 48h). Anticorpo primário: CamVir (1:3000), e secundário: anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (1:5000). A seta vermelha indica a banda de referência para o tamanho esperado para as proteínas (55KDa).

5.5. Clonagens e Indução da expressão com o vetor pGEX4T-3

Outra estratégia adotada nas otimizações dos níveis de expressão foi a clonagem dos genes de interesse em outro vetor de expressão: o pGEX4T-3, que também levou a alteração no promotor (*Tac*) e na proteína de fusão (GST). Para tanto, os genes foram retirados do pGEM-T Easy através de digestão com as enzimas *EcoRV* e *Sall*, e clonados utilizando os sítios *SmaI* e *Sall* (Figura 20). Mesmo com enzimas diferentes, a ligação inserto-vetor foi possível porque o padrão de corte gerado por *EcoRV* e por *SmaI* geram terminais *blunt* (cegos).

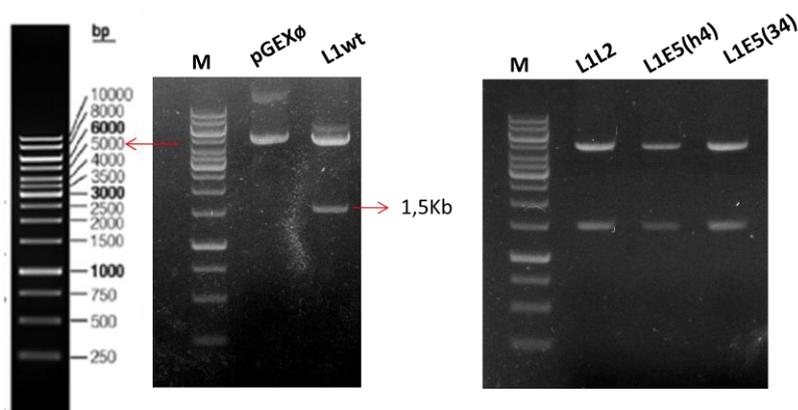


Figura 20: Clonagens pGEX4T-3. Digestões *XbaI* e *HindIII*; Eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE; M- Marcador Ladder Gene Ruler 1Kb ThermoScientific. pGEX4T-3 (4,9 Kb), L1wt (1544bp), L1L2 (1538bp), L1E5(h4) (1514bp), L1E5(34) (1526bp).

Uma vez confirmadas as clonagens, os recombinantes foram utilizados para transformar células de *E. coli* BL21. As colônias crescidas em placas LB com ampicilina foram repicadas e posteriormente utilizadas nos inoculos nos ensaios de indução. Os extratos foram induzidos em 20mL de cultura com IPTG 0,3mM, por 4h a 25°C. A análise pós-indução se deu por SDS-PAGE e *Western blot*, conforme mostrado na Figura 21. Apenas L1wt foi detectada nesse ensaio, com uma banda acima de 72KDa (marcador) referente a fusão de L1wt com GST e

outra banda com cerca de 55kDa que correspondente a L1wt não fusionada a GST.

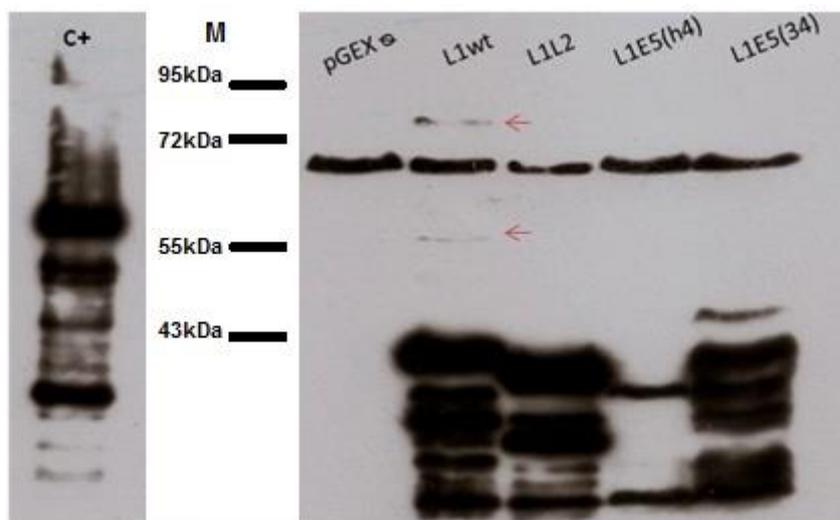


Figura 21: Western blot com o extrato proteico de culturas BL21 (Clones pGEX4T-3). Indução: IPTG 0.3mM, por 4h. **C-:** extrato proteico de células induzidas transformadas com vetor pGEX4T-3 (vetor sem inserto). **C+:** Lisado L1wt (*Pichia pastoris*, ind. 48h). Anticorpo primário: CamVir (1:3000), e secundário: anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (1:5000). Seta superior: L1 + GST = 81kDa. Seta inferior: L1wt = 55kDa.

5.6. Solubilização dos corpos de inclusão

O protocolo utilizado para solubilização dos corpos de inclusão empregou fortes agentes desnaturantes (uréia 8M) e redutores (DTT 50mM). Quando se compara o perfil de bandas a partir do gel de poliacrilamida entre o extrato protéico obtido após a lise e o extrato solúvel, observa-se uma banda com peso molecular aproximado de 55kDa que é o peso esperado para as proteínas do presente estudo presente com mais intensidade no extrato solúvel (Figura 22). Tal resultado indica que é possível recuperar uma quantidade maior de proteína utilizando tal metodologia.

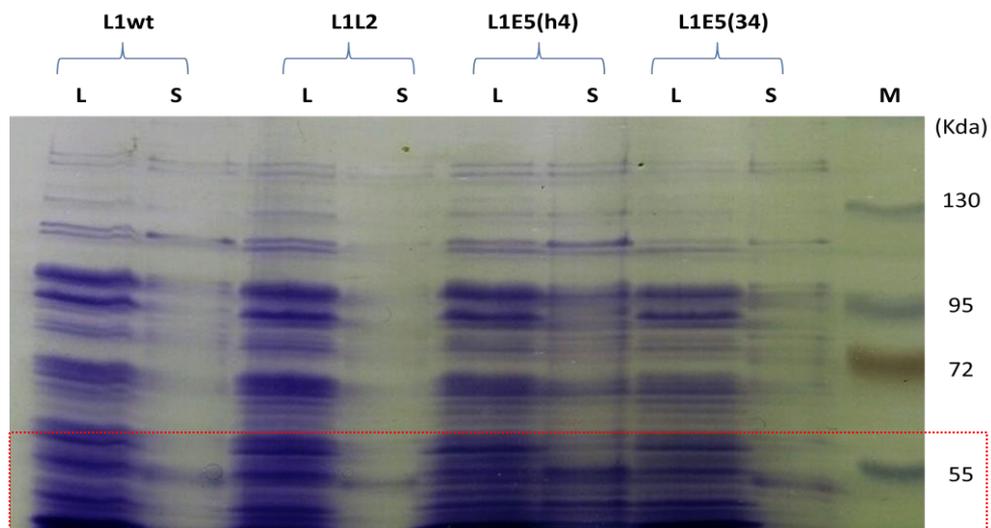


Figura 22: SDS-PAGE (12,5%) corado com Azul de *Coomassie* a partir do lisado do extrato protéico total (L) e extrato solúvel (S) de culturas de 15mL em células de *E.coli* BL21 (Clones pAE) induzidas por IPTG 0.3mM, por 20h.

6. Discussão

Dada a importância de se buscar estratégias vacinais alternativas, é fundamental que elas tenham como base plataformas de produção com menor custo-benefício, que possam atingir mulheres já infectadas pelo HPV, com ou sem desenvolvimento de lesões pré-malignas. Diante dessas necessidades, além de vacinas profiláticas, abordagens de vacinas com enfoque terapêutico também vem sendo estudadas. As oncoproteínas E6 e E7 têm sido mais exploradas como antígenos terapêuticos, com graus variados de sucesso (SCHILLER et al. 2012). Em contrapartida, a oncoproteína E5 vem se destacando como um alvo promissor para a imunização genética por conta da sua superexpressão nos estágios iniciais do câncer cervical (CORDEIRO et al., 2015). A produção desses antígenos vacinais alternativos em sistema procarioto é uma plataforma interessante por apresentar alto rendimento aliado a um baixo custo de produção.

Tendo isso em mente, o presente trabalho visou a produção de proteínas quiméricas baseadas na inserção de epítomos de E5 substituindo epítomos na hélice h4 e na porção C-terminal (34 últimos aminoácidos) de L1, além da inserção de epítomos de L2 também substituindo uma porção da região h4 e da produção da proteína L1 do HPV-16, sem modificações. As quimeras L1E5 (h4) e L1E5(-34) foram desenvolvidas no intuito de induzir uma resposta imune tanto humoral (profilática) por parte de L1, quanto celular (para fins terapêuticos) devido a E5. Estratégia semelhante foi empregada por Bian et al. (2008), onde uma quimera composta por L1 e E7 (C-terminal) foi produzida em *E. coli* e utilizada em ensaios de imunização em camudongos, exibindo propriedades profilático-terapêuticas. Em contrapartida, uma vez que epítomos da região N-terminal de L2 apresentam a propriedade de gerar uma proteção cruzada entre diferentes tipos

de HPV (JAGU et al. 2009), a proteína resultante da fusão L1L2(h4) visou a formação de capsômeros com exposição de epítomos de L2 em h4 com objetivo de gerar uma resposta imune neutralizante cruzada. Embora alguns trabalhos já tenham relatado a expressão da proteína L1 do HPV16 em *E. coli* (ZHANG et al. 1998; CHEN et al. 2001; ZHENGHAI MA et al. 2007), as construções quiméricas do presente trabalho foram produzidas pela primeira vez em sistema de expressão procarioto.

Para tanto, foi realizada a clonagem dos genes L1wt, L1L2, L1E5(h4) e L1E5(-34) no vetor de expressão bacteriano pAE, células de *E. coli* BL21 foram transformadas com os clones obtidos, com subseqüentes ensaios de indução por IPTG para produção das proteínas recombinantes. A princípio, apenas as proteínas L1wt e L1L2 tiveram sua produção detectada ainda que em baixos níveis quando comparadas ao controle positivo, fazendo-se necessário buscar as possíveis causas desses baixos níveis e aplicar metodologias que visassem melhorar os resultados encontrados.

Uma das vantagens em utilizar *E. coli* para expressão de genes heterólogos é a facilidade de manipulação do sistema no intuito de otimizar o rendimento protéico. Alguns aspectos podem ser pontos-chaves passíveis de alteração como: o vetor, a linhagem celular, as condições de cultivo, o *codon usage*, entre outros.

Sob a regulação de promotores fortes, como o T7 e *tac*, presentes em alguns vetores de expressão, genes heterólogos podem ser expressos em altos níveis em *E. coli*. No entanto, essa alta expressão pode não ser prontamente observada nos experimentos de detecção da proteína produzida pós-indução. Quando há uma produção muito elevada da proteína recombinante em bactérias,

parte da proteína produzida pode apresentar falhas em seu dobramento devido a incapacidade em alcançar a conformação nativa ou em interagir com moduladores de dobramento em tempo hábil (SOREHSEN e MORTENSEN, 2005). Como consequência desse desequilíbrio, essas proteínas podem formar agregados insolúveis (corpos de inclusão) ou serem encaminhadas para degradação (BANEYX e MUJACIC, 2004). Ambos os eventos podem estar relacionados aos baixos níveis de produção observados no presente estudo.

Em relação a formação desses corpos de inclusão, alguns aspectos devem ser ponderados. Entre os fatores que levam a ocorrência dessas estruturas estão: a geração de produtos tóxicos, a instabilidade do mRNA, a ausência de modificações pós-traducionais necessárias a proteína-alvo e a saturação da maquinaria celular de dobramento protéico (IDICULA-THOMAS e BALAJI, 2004). Apesar de esses agregados serem biologicamente inativos, uma gama de proteínas terapêuticas, como interferons e interleucinas, são produzidas na forma de corpos de inclusão e depois recuperadas (GRAUMANN e PREMSTALLER, 2006). Existem algumas vantagens na deposição de proteínas nesses agregados: eles são estáveis, resistentes a atividade de proteases *in vivo* e apresentam uma composição relativamente homogênea (VENTURA et al., 2006). Dessa forma, foi adotado um protocolo de lise e solubilização com agentes redutores e desnaturantes, semelhante ao empregado por Lai e Middelberg (2002) que produziu L1 em *E. coli* e a recuperou a partir dos corpos de inclusão. Tal metodologia mostrou-se adequada para a extração das proteínas a partir desses corpos de inclusão, mas deve ser confirmada mediante *western blot*. Adicionalmente, se faz necessário o emprego de protocolos que promovam a remontagem da estrutura nativa das proteínas, formando os capsômeros.

Em contrapartida, também é necessário atentar que as proteínas recombinantes encontradas em corpos de inclusão estão muitas vezes em um estado conformacional inadequado e o *refolding* das proteínas recuperadas dos agregados requer consideráveis otimizações que podem variar bastante de acordo com cada proteína alvo.

Portanto, é desejável buscar métodos que minimizem a agregação e aumentem a solubilidade das proteínas produzidas. Ajustes nas condições de cultivo para indução da expressão em *E.coli* podem auxiliar nesse processo. Uma das estratégias utilizadas é adotar um período de indução prolongado, em baixas temperaturas (GOPAL et al. 2013), criando um ambiente favorável à estabilidade e ao padrão correto de dobramento das proteínas. O crescimento em baixas temperaturas leva a uma significativa redução na degradação das proteínas produzidas (KHOW e SUNTRARACHUN, 2012). Nesse sentido, foram realizados ensaios de indução durante 20 horas, a 25°C em culturas de 20mL. Após essa alteração, a proteína L1E5(34) passou a ser detectada. Quanto às demais proteínas, no entanto, não foi observada notável diferença na expressão quando comparados com os extratos protéicos induzidos durante 4 horas.

Outra metodologia comumente utilizada para aumentar a solubilidade das proteínas recombinantes é a clonagem do gene de interesse em vetores com proteínas de fusão, como GST (Glutathione S-Transferase) (CHENG e LEE, 2010; GOPAL et al 2013). Partindo desse princípio, os genes do presente estudo foram clonados no vetor pGEX-4T-3 que tem GST como proteína de fusão N-terminal. Após a confirmação da clonagem, procedeu-se os experimentos de indução nas condições já otimizadas para o vetor pAE. Embora existam evidências da influência da fusão de *tags* N-terminal na solubilidade de proteínas recombinantes

(IDICULA-THOMAS e BALAJI, 2004), apenas a proteína L1wt reagiu com o anticorpo utilizado nos ensaios de imunodeteccção, formando uma banda com cerca de 80KDa referente a L1 (55KDa) fusionada a GST (26KDa). Adicionalmente, outra banda referente a L1 não-fusionada também foi detectada no mesmo ensaio. A mudança no vetor levou a troca no promotor (T7 para *tac*), além da *tag* de fusão mas tais alterações não foram suficientes para provocar diferença na solubilidade e rendimento protéico. Outros trabalhos já haviam utilizado o vetor pGEX para expressar L1 em *E. coli* (CHEN et al., 2001; MA et al., 2007). Baixos níveis de expressão de L1 também foram encontrados por Zhenghai Ma e colaboradores (2007). Nesse trabalho, para aumentar a expressão, os primeiros 129 nucleotídeos do gene *L1* foram deletados e tal deleccção gerou aumento significativo na produccção da proteína em *E. coli* comparando-se a expressão obtida com o gene selvagem. Essa modificação parece ter implicações na expressão e conseqüente rendimento da proteína produzida, uma vez que região alterada tem sido relacionada a elementos inibitórios no mRNA de L1 (COLLIER et al., 2002).

Além dos pontos já mencionados, o *codon usage* também tem uma implicação prática importante nos níveis de expressão obtidos em *E. coli*. Frequência elevada de códons pouco utilizados pela célula hospedeira pode ocasionar uma terminação prematura da traduccção ou uma incorporação de aminoácidos equivocada, formando polipeptídeos truncados (TEGEL et al., 2013) que podem ser alvo de degradação intracelular (BANEYX e MUJACIC, 2004). É necessário, desse modo, analisar a sequênciade do gene recombinante quanto ao número de códons raros presentes. Uma maneira de solucionar esse tipo de questão é otimizar a sequênciade nucleotídica de acordo com os códons

preferencialmente utilizados pela célula hospedeira. Alternativamente, a linhagem de *E. coli* Rosetta DE3 apresenta tRNAs que codificam os aminoácidos Arginina, Leucina, Isoleucina e Prolina que ocorrem em menor frequência nesse organismo (KANE 1995), podendo ser uma ferramenta mais prática e barata que a otimização da sequência inteira (ROSANO e CECCARELLI, 2009; HUANG et al., 2012).

Em um estudo comparativo realizado por Tegel et al. (2013), genes com mais de oito códons raros em *E. coli* foram mais prontamente expressos na linhagem Rosetta DE3, quando comparada a BL21. As sequências dos genes recombinantes do presente estudo foram analisadas quanto a presença de códons raros através do “*Rare Codon Calculator (RaCC)*” e todas apresentaram no mínimo 30 códons raros, pelo menos 10 desses correspondentes a códons Arg. É importante atentar para as trincas que codificam Arginina (AGG e AGA) visto que elas ocorrem numa frequência inferior a 1% em *E. coli* (KANE 1995). Diante de tal resultado, mostrou-se pertinente utilizar a linhagem Rosetta DE3 para expressão dos genes recombinantes como modo de aumentar o rendimento protéico. Os clones obtidos com o vetor pAE foram usados na transformação dessa nova linhagem celular e induzidos conforme protocolos já estabelecidos para BL21. No entanto, os resultados observados mediante *Western blot* não mostraram diferença expressiva comparado ao que já havia sido obtido utilizando *E. coli* BL21.

Ao longo dos experimentos de imunodeteção, além da detecção das proteínas de interesse que apresentam em torno de 55 KDa, também foram observadas algumas proteínas de baixo peso molecular (43 KDa – 30 KDa). Visto que estas proteínas reagiram positivamente com o CamVir e que tal evento não

foi observado no controle negativo (vetor sem inserto), sugere-se a ocorrência de proteólise intracelular das proteínas recombinantes investigadas (ZHENGHAI MA et al. 2007). Esse padrão é recorrente em outros trabalhos que expressaram L1 de HPV16 tanto em *E. coli* (LAI et al. 2002; MA et al 2007) quanto em outros sistemas de expressão como células de inseto (ROSE et al, 1993) e levedura (MARIZ et al., 2015), por exemplo. Tal padrão observado foi recorrente nos experimentos com diferentes tempos de indução, linhagens e vetores de expressão, sendo, provavelmente, relacionado a características nas sequências das proteínas em questão. Alguns dos estudos que detectaram essas proteínas de peso molecular inferior a L1 atribuem esse evento a ocorrência de códons de iniciação alternativos (KOZAK 1983) dentro das sequências. Ainda que ATG seja o códon de iniciação clássico, ele não é único e corresponde a apenas 83% dos códons de iniciação em *E. coli* e os códons GTG (Val) e TTG (Leu), que correspondem a 14% e 3%, respectivamente, também podem ser reconhecidos pelo formil-Met-tRNA. Aponta-se que, a ocorrência de sítios críticos para iniciação da tradução dentro da região codificante de genes heterólogos *in frame* com o quadro de leitura do gene em questão, pode gerar proteínas truncadas (JENNINGS et al., 2016).

Uma produção eficiente e em ampla quantidade é necessária quando se pretende desenvolver estudos bioquímicos, estruturais e funcionais da proteína de interesse. Além disso, obter a proteína purificada L1, bem como as quimeras, seria ideal para os posteriores ensaios de montagens dos capsômeros. Por essa razão, além de ensaios preliminares em culturas de menor escala para triagem dos clones recombinantes, ensaios de indução em grande escala seguidos da purificação das proteínas são demandados. Tendo isso em mente, foi realizada

indução em 100mL de cultura com objetivo de purificar as proteínas de estudo através de cromatografia de afinidade, utilizando resina de níquel. Tanto nas análises por SDS-PAGE corado com *Coomassie*, quanto por *Western blot*, foi possível observar níveis detectáveis da proteína apenas nas amostras do lisado e fração não-adsorvida, sugerindo que não houve uma ligação eficiente das proteínas fusionadas a His-tag com a resina. Problemas no procedimento de purificação com baixo rendimento das proteínas recombinantes conjugadas a His-tag podem ocorrer em virtude de uma conformação inadequada ou não exposição dessa proteína de fusão quando fusionada a L1 (MARIZ, 2012), o que prejudicou tanto a ligação com a resina de níquel, quanto o reconhecimento da tag pelo Anti-His em experimentos de imunodeteção (resultado não mostrado).

A comparação da produção das proteínas recombinantes do presente estudo em outros sistemas de expressão é válida. Todos os genes do presente estudo estão sendo expressos, em paralelo, em *Leishmania tarentolae* (MARIZ, tese em preparação). Embora, a produção da proteína L1E5(h4) não tenha sido detectada nos experimentos de *western blot* realizados a partir de extratos de culturas de *E. coli*, essa proteína foi detectada em culturas celulares utilizando *L. tarentolae* como organismo hospedeiro.

7. Conclusões

Os resultados obtidos até o presente momento demonstram a produção dos antígenos recombinantes, com exceção da proteína L1E5(h4), utilizando *Escherichia coli* como sistema de expressão sendo uma alternativa às plataformas que vem sendo trabalhadas atualmente para a produção de antígenos vacinais para o HPV.

Algumas estratégias foram empregadas para melhorar os níveis de produção das proteínas, como alterações nas condições de cultivo, vetor e linhagem celular, entretanto, não foram observadas diferenças significativas mediante às otimizações

Desde que se tenham obtido as proteínas, devem ser empregadas metodologias para purificação de L1 e das quimeras além de protocolos para montagem e purificação dos capsômeros que podem ser feitas através de ultracentrifugação em gradiente de sacarose. Os capsômeros produzidos serão validados em futuros ensaios imunológicos quanto à capacidade de induzir respostas imunes profiláticas e terapêuticas em animais desafiados.

8. Referências Bibliográficas

- Andersen DC, Krummen L (2002) Recombinant protein expression for therapeutic applications. *Cur Opin Biotech.* 13:117–123.
- Aires KA; Cianciarullo AM; Carneiro SM; Villa LL; Boccardo E; Martinez GP; Arellano IP; Oliveira MLS; Ho PL (2006) Production of Human Papillomavirus Type 16 L1 Virus-Like Particles by Recombinant *Lactobacillus casei* Cells. *72* (1): 745–752.
- Ashrafi GH, Brown DR, Fife KH, Campo MS (2006) Down-regulation of MHC class I is a property common to papillomavirus E5 proteins. *Virus Research.* 120: 208-211.
- Bagarazzi ML, Yan J, Morrow MP, Shen X, Parker RL, Lee JC, Giffear M, Pankhong, Khan AS, Broderick KE, Knott C, Lin F, Boyer JD, Draghia-Akli R, White CJ, Kim JJ, Weiner DB, Sardesai NY (2012) Immunotherapy Against HPV16/18 Generates Potent TH1 and Cytotoxic Cellular Immune Responses. *Sci Transl Med.* 4(155).
- Baneyx F; Mujacic M (2004) Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat Biotec.* 22 (11): 1399 – 1408.
- Bian T, Wang Y, Lu Z, Ye Z, Zhao L, Ren J, Zhang H, Ruan L e Tian H.(2008) Human papillomavirus type 16 L1E7 chimeric capsomeres have prophylactic and therapeutic efficacy against papillomavirus in mice. *Mol Cancer Ther.* 7: 1329-1335.
- Bishop B, Dasgupta J, Chen XS (2007) Structure-based engineering of papillomavirus major capsid I1: controlling particle assembly. *Virology*, 4:3.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Informática do SUS (Datasus). Sistema de Informações sobre mortalidade - SIM. <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0205>. Acesso em: 26 abr. 2015.
- Bolhassani A, Mohit E, Rafati S (2009) Different spectra of therapeutic vaccine development against HPV infections. *Human Vaccines* 5: 671-689.
- Bosch FX (2011) Human papillomavirus: science and technologies for the elimination of cervical cancer. *Expert Opin Pharmacol Ther.* 12(14): 2189-204.
- Boulenouar S, Weyn C, Noppen MV, Ali MM, Favre M, Delvenne PO, Bex F, Noel A, Englert Y, Fontaine V (2010) Effects of HPV-16 E5, E6 and E7 proteins on survival, adhesion, migration and invasion of trophoblastic cells. *Carcinogenesis.* 31 (3): 473–480.
- Boulet G, Horvath C, Broeck DV, Sahebali S, Bogers J (2007) Human papillomavirus: E6 and E7 oncogenes. *Int J Bioch Cell Bio.* 39: 2006–2011.
- Buck CB; Day PM; Trus BL (2013) The papillomavirus major capsid protein L1. *Virology.* 445: 169–174.
- Burchell NA, Winer RL, Sanjosé S, Franco EL. (2006) Chapter 6: Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. *Vaccine.* 24(S3): 52-61.
- Burd EM (2003) Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Clin Microbiol Rev.* 16 (1): 1–17.
- Cardone G, Moyer AL, Cheng N, Thompson CD, Dvoretzky I, Lowy DR, Schiller JT, Steven AC, Buck CB, Trus BL. (2014) Maturation of the Human Papillomavirus 16 Capsid. *mBio.* 5 (4): 1104-14.
- Castellsagué X, Bosch FX, Muñoz N. (2002) Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res.* 89(2):191-9.

- Chen Y-F, Lin C-W, Tsao Y-P e Chen S-L (2004) Cytotoxic-T-Lymphocyte Human Papillomavirus Type 16 E5 Peptide with CpG-Oligodeoxynucleotide Can Eliminate Tumor Growth in C57BL/6 Mice. *J Virol.* 78 (3): 1333–1343.
- Chen XS, Casini G, Harrison SC e Garcea RL (2001) Papillomavirus Capsid Protein Expression in *Escherichia coli*: Purification and Assembly of HPV11 and HPV16 L1. *J. Mol. Biol.* 307: 173-182.
- Cheng C-H; Lee W-C (2010) Protein solubility and differential proteomic profiling of recombinant *Escherichia coli* overexpressing double-tagged fusion proteins. *Micro Cell Fact.* 9:63.
- Cheung JLK, Cheung T-H, Yu MY, Chan PKS (2013) Virological characteristics of cervical cancers carrying pure episomal form of HPV16 genome. *Gynec Oncol.* 131: 374–379.
- Coimbra EC; Gomes FB; Campos JF; D'arc M; Carvalho JC; Mariz FC; Jesus ALS; Stocco RC; Beçak W; Freitas AC (2011) Production of L1 protein from different types of HPV in *Pichia pastoris* using an integrative vector. *Braz J Med Biol Res.* 44(12): 1209-1214.
- Collier B; Öberg D; Zhao X; Schwartz S (2002) Specific inactivation of inhibitory sequences in the 5' end of the human papillomavirus type 16 L1 open reading frame results in production of high levels of L1 protein in human epithelial cells, *J. Virol.* 76: 2739–2752.
- Cordeiro MN; Paolini F; Massa S; Curzio G; Illiano E; Silva AJD; Franconi R; Bissa M; Morghen CG; Freitas AC; Venuti A (2015) Anti-tumor effects of genetic vaccines against HPV major oncogenes. *Hum Vac & Immunotherap.* 11(1):, 1–8.
- Day PM; Schiller JT (2009) The role of furin in papillomavirus infection. *Fut Microbiol.* 4: 1255–1262.
- De Freitas AC; Gurgel APAD; Chagas BS; Coimbra EC; Amaral CMM (2012) Susceptibility to cervical cancer: An overview, *Gynecol Oncol.* doi:10.1016/j.ygyno.2012.03.047.
- De Martel C, Ferlay J, Franceschi S, Vignat J, Bray F, Forman D, et al. (2012) The global burden of cancers attributable to infections in the year 2008: a review and synthetic analysis. *Lancet Oncol.* 13:607–615.
- De Villiers E-M, Fauquet C, Broker TR, Bernard H-U, Zur Hausen H (2004) Classification Of Papillomaviruses. *Virology.* 324: 17 – 27.
- Dimaio D, Petti LM (2013) The E5 proteins. *Viol.* 445: 99–114.
- Doobar J. (2005) Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci.* 110: 525–541.
- Doobar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, Stanley MA (2012) The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. *Vaccine.* 30S: F55– F70.
- Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, Murakami I (2015) Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Rev. Med. Virol.* 25: 2–23.
- Duelli D; Lazebnik Y (2007) Cell-to-cell fusion as a link between viruses and cancer. *Nature* 7: 968-976.
- Egawa K. (2003) Do human papillomaviruses target epidermal stem cells? *Dermatology.* 207: 251–254.
- ESTIMATIVA 2016: INCIDÊNCIA DE CÂNCER NO BRASIL. Instituto Nacional De Câncer José Alencar Gomes Da Silva (INCA)/ Ministério da Saúde, Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e

- Vigilância. – Rio de Janeiro: INCA, 2016. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/index.asp>>
- Fauquet CM, Mayo M.A, Maniloff J, Desselberger U. e Ball LA (2005) Virus Taxonomy, Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier/Academic Press, London.
- Ferlay J; Soerjomataram I; Ervik M, et al. (2013) Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base N^o.11. WHO International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2012. [online] Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr>>
- Forman D, Martel C, Lacey CJ, Soerjomataram I, Lortet-Tieulent J, Bruni L, Vignat J, Ferlay J, Bray F, Plummer M e Franceschi S (2012) Vaccine. 30S: F12–F23.
- Frazer IH; Leggatt GR; Mattarollo SR (2011) Prevention and Treatment of Papillomavirus-Related Cancers Through Immunization. Annu. Rev. Immunol. 29: 111–138.
- Freitas A.C.; Mariz F.C.; Coimbra E.C.; Cordeiro M.N.; Jesus A.L.S. (2012) Vaccine Strategies against Human Papillomavirus: A Discussion Focused on Developing Countries. J Clin Cell Immunol. S4:004.
- Formana D, Martel C, Lacey CJ, Soerjomataram I, Lortet-Tieulent J, Bruni L, Vignat J, Ferlay J, Bray F, Plummer M, Franceschi S. (2012) Global Burden of Human Papillomavirus and Related Diseases. Vaccine. 30S:F12–F23.
- Gao P; Zheng J (2010) High-risk HPV E5-induced cell fusion: a critical initiating event in the early stage of HPV-associated cervical cancer. Virol J. 7:238.
- Garnett TO, Duerksen-Hughes PJ (2006) Modulation of Apoptosis by Human Papillomavirus (HPV) Oncoproteins. Arch Virol. 151(12): 2321–2335.
- Ghenter-Williams SM, Disbrow GL, Schkegel R, Lee D, Threadgill DW, Lambert PF (2005) Requirement of epidermal growth factor receptor for hyperplasia induced by E5, a high-risk human papillomavirus oncogene. Can Res. 65: 34-42.
- Gopal GJ, Kumar A (2013) Strategies for the Production of Recombinant Protein in *Escherichia coli*. Prot J. 32: 419–425.
- Graumann K; Premstaller A (2006) Manufacturing of recombinant therapeutic proteins in microbial systems. Biotechnol J. 1(2):164-186.
- Greco D; Kivi N; Qian K; Leivonen SK; Auvinen P; Auvinen E (2011) Human papillomavirus 16 E5 modulates the expression of host microRNAs. PLoS One. 6:21646.
- Gromme M; Uytdehaag FG; Janssen H; Calafat J; van Binnendijk RS; Kenter MJ; Tulp A; Verwoerd D; Neefjes J (1999) Recycling MHC class I molecules and endosomal peptide loading. Proc. Natl. Acad. Sci. 96: 10326-10331.
- Hassan SW; Waheed MT; Müller M; Clarke JL; Shinwari ZK; Lössl AG (2014) Expression of HPV-16 L1 capsomeres with glutathione-S-transferase as a fusion protein in tobacco plastids: An approach for a capsomere based HPV vaccine. Hum Vac & Immunotherap, 10 (10): 2975-2982.
- Hellner K e Münger K (2011) Human Papillomaviruses As Therapeutic Targets in Human Cancer. J Clin Oncol. 29:1785-1794.
- Huang C-Jr; Lin H; Yang X (2012) Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. J Ind Microbiol Biotechnol. 39: 383–399.

- Idicula-Thomas S; Balaji PV (2004) Understanding the relationship between the primary structure of proteins and its propensity to be soluble on overexpression in *Escherichia coli*. *Prot Sci*.14:582–592.
- Instituto Nacional do Câncer - Brasil (2015) Controle do Câncer do Colo do Útero<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoaes_programas/site/home/nobrasil/programa_nacional_controle_cancer_colo_uter0>. Acesso em 26 abr. 15.
- International Agency Of Research On Cancer (IARC). Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (2007) Human papillomaviruses. 636p. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, v. 90).
- Jagu S, Karanam B, Gambhira R, Chivukula SV, Chaganti RJ, Lowy DR, Schiller JT, Roden RBS (2009) Concatenated Multitype L2 Fusion Proteins as Candidate Prophylactic Pan-Human Papillomavirus Vaccines. *J Natl Cancer Inst*. 101: 782 – 792.
- Jennings MJ; Barrios AF; Tan S (2016) Elimination of truncated recombinant protein expressed in *Escherichia coli* by removing cryptic translation initiation site. *Prot Exp and Purif*. 121: 17-21.
- Joura EA; Giuliano AR; Iversen O-E; Bouchard C; Mao C; Mehlsen J; Moreira ED; Ngan YJr; Petersen LK; Lazcano- Ponce E; Pitisuttithum P; Restrepo JA; Stuart G; Woelber L; Yang YC; Cuzick J; Garland SM; Huh W; Kjaer SK; Bautista OM, Chan ISF; Chen J; Gesser R; Moeller E; Ritter M; Vuocolo S; Luxembourg A (2015) A 9-Valent HPV Vaccine against Infection and Intraepithelial Neoplasia in Women. *N Engl J Med*. 372(8): 711-723.
- Kajitani N; Satsuka A; Kawate A; Sakai H (2012) Productive life cycle of human papillomaviruses that depends upon squamous epithelial differentiation. *Front in Micro*. 3: 1-12.
- Kane JF (1995) Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Cur Opin in Biotech*. 6: 494-500.
- Kanodia S; Fahey LM; Kast WM (2007) Mechanisms Used by Human Papillomaviruses to Escape the Host Immune Response. *Cur Canc Drug Targets*. 7:79-89.
- Kawana K; Adachi K; Kojima S; Kozuma S; Fujii T (2012) Therapeutic Human Papillomavirus (HPV) Vaccines: A Novel Approach. *The Open Virol J*. 6 (Suppl 2: M12): 264-269.
- Khow O; Suntrarachun S (2012) Strategies for production of active eukaryotic proteins in bacterial expression system. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2(2): 159-162.
- Kim S-W, Yang J-S (2006) Human Papillomavirus Type 16 E5 Protein as a Therapeutic Target. *Yonsei Med J*. 47(1):1-14.
- Kjellberg L; Hallmans G; Åhren A-M; Johansson R; Bergman F; Wadell G; Ångström T e Dillner J. (2000) Smoking, diet, pregnancy and oral contraceptive use as risk factors for cervical intra-epithelial neoplasia in relation to human papillomavirus infection. *Brit J Cancer*. 82(7):1332–1338.
- Klingelutz AJ; Roman A (2012) Cellular transformation by human papillomaviruses: Lessons learned by comparing high- and low-risk viruses. *Virol*. 424(2): 77–98.
- Kozak M (1983) Comparison of initiation of protein-synthesis in procaryotes, eukaryotes, and organelles. *Microbiol Rev* 47:1–45.

- Kondo K; Ochi H; Matsumoto T; Yoshikawa H; Kanda T (2008) Modification of human papillomavirus-like particle vaccine by insertion of the cross-reactive L2-epitopes. *J Med Virol.* 80(5):841-846.
- Lai WB, Middelberg APJ (2002) The production of human papillomavirus type 16 L1 vaccine product from *Escherichia coli* inclusion bodies. *Biosyst Eng* 25: 121–128.
- Lee SY, Kang TH, Knoff J, Huang Z, Soong R-S, Alvarez RD, Hung C-F, WU T-C (2013) Intratumoral injection of therapeutic HPV vaccinia vaccine following cisplatin enhances HPV-specific antitumor effects. *Cancer Immunol Immunother.* 62:1175–1185.
- Leonardo A (2011) Desarrollo de una vacuna profiláctica de segunda generación contra el papilomavirus humano. *Medicina.* 71 (3): 261-266.
- Lewis C, Baro MF, Marques M, Gruner M, Alonso A, Bravo IG (2008) The first hydrophobic region of the HPV16 E5 protein determines protein cellular location and facilitates anchorage-independent growth. *Virol J.* 5: 30-40.
- Li M, Cripe TP, Estes PA, Lyon MK, Rose RC, Garcea RL (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.*71:2988–2995.
- Liao S-J, Deng D-R, Zeng D, Zhang L, Hu X-J, Zhang W-N, Li L, Jiang X-F, Wang C-Y, Zhou J-F, Wang S-X, Zhang H-W, Ma D (2013) HPV16 E5 Peptide Vaccine in Treatment of Cervical Cancer In Vitro and In Vivo. *J Huazhong Univ Sci Technol [Med Sci]* 33(5): 735-742.
- Lin K, Roosinovich E, Ma B, Hung C-F, Wu T-C. (2010) Therapeutic HPV DNA vaccines. *Immunol Res.* 47:86–112.
- Lin K, Doolan K, Hung C-F, Wu T-C (2010) Perspectives for Preventive and Therapeutic HPV Vaccines. *Formos Med Assoc.* 109(1): 4–24.
- Longworth MS, Laimins LA (2004) Pathogenesis of Human Papillomaviruses in Differentiating Epithelia. *Microb Mol Bio Rev.* 68 (2):362-372.
- Ma Z, Chen B, Zhang F, Yu M, Liu T, Liu L (2007) Increasing the expression levels of papillomavirus major capsid protein in *Escherichia coli* by N-terminal deletion. *Prot Expand Purif.* 56:72–79.
- Maclean J; Koekemoer M; Olivier AJ; Stewart D; Hitzeroth II; Rademacher T; Fischer R; Williamson AL; Rybicki EP (2007) Optimization of human papillomavirus type 16 (HPV-16) L1 expression in plants: comparison of the suitability of different HPV-16 L1 gene variants and different cell-compartment localization. *J of Gen Virol.* 88: 1460–1469.
- Malik AI (2005) The Role of Human Papillomavirus (HPV) in the etiology of Cervical Cancer. *J Pak Med Assoc.* 55 (12): 553-558.
- Markowitz LE, Tsu V, Deeks SL, Cubie H, Wang SA, Vicari AS, Brotherton JLM (2012) Human Papillomavirus Vaccine Introduction – The First Five Years. *Vaccine* 30S: 139-148.
- Mariz FC (2012) Expressão do gene L1 de HPV-16 em *Pichia pastoris* empregando promotor induzível Paox1 e promotor constitutivo Ppgk1 visando desenvolvimento de um sistema para produção vacinal (Dissertação - PPGIT) Universidade Federal de Pernambuco.
- Mariz FC, Coimbra EC, Jesus ALS, Nascimento LM, Torres FAG e Freitas AC (2015) Development of an IP-Free Biotechnology Platform for Constitutive Production of HPV16 L1 Capsid Protein Using the *Pichia pastoris* PGK1 Promoter. *BioMed Res Intern.*

- Maufort JP, Shai A, Pitot HC, Lambert PF (2010) A Role for HPV16 E5 in Cervical Carcinogenesis. *Cancer Res.* 70:2924-2931. Ministério da Saúde (2014). Vacinação contra o HPV no SUS Brasília/DF, janeiro de 2014. Programa Nacional de Imunização (PNI). Secretaria de Vigilância em Saúde. <http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/00NDS/Apresentacoes/2014/1_RO_CIB/10.pdf> Acesso em: 29 abr 2015.
- Modis Y; Trus BL; Harrison SC (2002) Atomic model of the papillomavirus capsid. *The EMBO Journal.* 21(18): 4754±4762.
- Moscicki A-B, Schiffman M, Burchell A, Albero G, Giuliano AR, Goodman MT, Kjaer SK, Palefsky J (2012) Updating the Natural History of Human Papillomavirus and Anogenital Cancers. *Vaccine* 30S: F24– F33.
- Mossadegh N; Gissmann L; Müller M; Zentgraf H; Alonso A; Tomakidib P (2004) Codon optimization of the human papillomavirus 11 (HPV 11) L1 gene leads to increased gene expression and formation of virus-like particles in mammalian epithelial cells. *Virology* 326: 57–66.
- Miura S; Kawana K; Schust DJ; Fujii T; Yokoyama T; Iwasawa Y; Nagamatsu T; Adachi K; Tomio A; Tomio K; Kojima S; Yasugi T; Kozuma S; Taketani Y (2010) CD1d, a Sentinel Molecule Bridging Innate and Adaptive Immunity, Is Downregulated by the Human Papillomavirus (HPV) E5 Protein: a Possible Mechanism for Immune Evasion by HPV. *J. Virol.* 11614–11623.
- Murata Y, Lightfoote PM, Rose RC e Walsh EE (2009) Antigenic presentation of heterologous epitopes engineered into the outer surface-exposed helix 4 loop region of human papillomavirus L1 capsomeres. *Virology*, 6:81.
- Neeper MP; Hofmann KJ; Jansen KU (1996) Expression of the major capsid protein of human papillomavirus type 11 in *Saccharomyces cerevisiae*. 180: 1 – 6.
- Öhlschläger P; Osen W; Dell K; Faath S; Garcea RL; Jochmus I; Müller M; Pawlita M; Schäfer K; Sehr P; Staib S; Sutter G; Gissmann L (2003) Human Papillomavirus Type 16 L1 Capsomeres Induce L1-Specific Cytotoxic T Lymphocytes and Tumor Regression in C57BL/6 Mice. *J. Virol.* 77(8): 4635–4645.
- Pinto AP (2001) Etiopatogenia do câncer vulvar. *J Bras Patol Med Lab.* 38: 55-63.
- Qian J, Dong Y, Pang Y-YS, Ibrahim R, Berzofsky JA, Schiller JT e Khleif SN (2006) Combined prophylactic and therapeutic cancer vaccine: Enhancing CTL responses to HPV16 E2 using a chimeric VLP in HLA-A2 mice. *Int J Cancer.* 118: 3022–3029.
- Pacheco B, Crombet L, Loppnau P, Cossar D (2012) A screening strategy for heterologous protein expression in *Escherichia coli* with the highest return of investment. *Prot Exp Purif.* 81: 33–41.
- Ramos CR, Abreu PA, Nascimento AL e HO PL (2004) A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. *Braz J Med Biol Res* 37(8): 1103-1109.
- Reich Z; Altman JD; Boniface JJ; Lyons DS; Kozono H; Ogg G; Morgan C; Davis MM (1997) Stability of empty and peptideloading class II major histocompatibility complex molecules at neutral and endosomal pH: comparison to class I proteins. *Proc.Natl. Acad. Sci.* 94: 2495-2500.
- Roden RBS; Yutzy WH; Fallon R; Inglis S; Lowy DR; Schiller JT (2000) Minor capsid protein of human genital papillomaviruses contains subdominant, cross- neutralizing epitopes. *Virology.* 270: 254–257.

- Rosano GL; Ceccarelli EA (2009) Rare codon content affects the solubility of recombinant proteins in a codon bias-adjusted *Escherichia coli* strain. *Micro Cell Fact.* 8:41.
- Rose RC, Bonnef W, Reichman RC, Garcea RL (1993) Expression of human papillomavirus type 11 L1 protein in insects cells: in vivo and in vitro assembly of viruslike particles. *J. Virol.* 67: 1936-1944.
- Rose RC, White WI, Li M, Suzich JA, Lane C, Garcea RL(1998) Human papillomavirus type 11 recombinant L1 capsomeres induce virus-neutralizing antibodies. *J Virol.* 72: 6151–6154.
- Sakakibara N, Mitra R, MCBRIDE AAA (2011) The Papillomavirus E1 Helicase Activates a Cellular DNA Damage Response in Viral Replication Foci. *J Virol.* 85: 8981–8995.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual.* 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 800 p.
- Schädlich L; Senger T; Gerlach B; Mücke N; Klein C; Bravo IG; Müller M; Gissmann L (2009) Analysis of Modified Human Papillomavirus Type 16 L1 Capsomeres: the Ability To Assemble into Larger Particles Correlates with Higher Immunogenicity. *J. Virol.* 83 (15): 7690–7705.
- Schiller JT, Castellsagué X, Garland SM (2012) A Review of Clinical Trials of Human Papillomavirus Prophylactic Vaccines. *30S: F123– F138.*
- Sellors JW, Sankaranarayanan R (2004) Colposcopia e tratamento da neoplasia intra-epitelial cervical: Manual para principiantes, Centro Internacional de Pesquisas sobre o Câncer (IARC). <<http://screening.iarc.fr/colpochap.php?lang=4&chap=2>>. Acesso em: 26 abr. 2015.
- Silva MFPTB; Guimarães V; Silva MAR; Amaral CMM; Beçak W; Stocco RC; Freitas AC; Crovella S (2012) Frequency of human papillomavirus types 16, 18, 31, and 33 and sites of cervical lesions in gynecological patients from Recife, Brazil. *GMR.* 11 (1): 462-466.
- Slupetzky K, Shafti-Keramat S, Lenz P, Brandt S, Grassauer A, Sara M e Kirnbauer R. (2001) Chimeric papillomavirus-like particles expressing a foreign epitope on capsid surface loops. *J Gen Virol.* 82: 2799–2804.
- Sørensen H.P.; Mortensen K. K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology.* v. 115, p. 113–128, 2005.
- Stanley MA (2001) Human papillomavirus and cervical carcinogenesis. *Best practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology.* 15 (5): 663 – 676.
- Stanley MA (2005) Human papillomavirus vaccines. *Rev Medl Virol.* 16(3): 139–149.
- Stern PL, van der Burg SH, Hampson IN, Broker TR, Fiander A, Lacey CJ, Kitchener HC, Einstein MH (2012) Therapy of Human Papillomavirus-Related Disease. *Vaccine* 30S:F71– F82.
- Su JH, Wu A, Scotney E, Ma B, Monie A, Hung CF, Wu TC (2010) Immunotherapy for cervical cancer: research status and clinical potential. *BioDrugs.* 24:109–129.
- Tegel H; Tourle S; Ottosson J; Persson A (2010) Increased levels of recombinant human proteins with the *Escherichia coli* strain Rosetta(DE3). *Prot Exp and Purif.* 69: 159–167.
- Van Doorslaer K. (2013) Evolution of the Papillomaviridae. *Virology.* 445: 11–20.

- Van Doorslaer K; Tan Q; Xirasagar S; Bandaru S; Gopalan V; Mohamoud Y; Huyen Y; McBride AA (2013) The Papillomavirus Episteme: a central resource for papillomavirus sequence data and analysis. *Nucleic Acids Res.* 41: D571–D578.
- Varsani A, Williamson A-L, De Villiers D, Becker I, Christensen ND e Rybicki EP (2003) Chimeric Human Papillomavirus Type 16 (HPV-16) L1 Particles Presenting the Common Neutralizing Epitope for the L2 Minor Capsid Protein of HPV-6 and HPV-16. *J Virol.* 77 (15): 8386–8393.
- Ventura S; Villaverde A (2006) Protein quality in bacterial inclusion bodies. *Trends Biotechnol.* 24(4):179–185.
- Venuti A, Paolini F, Nasir L, Corteggio A, Roperto S, Campo MS, Borzacchiello SG (2011) Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions. *Molecular Cancer.* 10: 140.
- Wang JW; Roden RBS (2013) L2, the minor capsid protein of papillomavirus. *Virology.* 445: 175–186.
- Wilson VG, West M, Woytek K, Rangasamy D (2002) Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features. *Virus Genes.* 24: 275–290.
- WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre) (2010). Human Papillomavirus and Related Cancers in World. Summary Report 2010.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (2015) Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer. <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs380/en/>>. Acesso em: 21 abr. 2015.
- Wu W-H, Alkutkar T, Karanam B, Roden RBS, Ketner G, Ibeanu OA (2015) Capsid display of a conserved human papillomavirus L2 peptide in the adenovirus 5 hexon protein: a candidate prophylactic hpv vaccine approach. *Virology. J.* 12:140.
- Zhang B; Li P; Wang E; Brahmi Z; Dunn KW; Blum JS; Roman A (2003) The E5 protein of human papillomavirus type 16 perturbs MHC class II antigen maturation in human foreskin keratinocytes treated with interferon-gamma. *Virology.* 310: 100-108.
- Zhang W, Carmichael J, Ferguson J, Inglis S, Ashrafian H e Stanley M (1998) Expression of Human Papillomavirus Type 16 L1 Protein in *Escherichia coli*: Denaturation, Renaturation, and Self-Assembly of Virus-like Particles in Vitro. *Virology.* 243: 423–431.
- Zheng ZM; Baker CC (2006) Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci.* 11: 2286–2302.
- Zur Hausen H (1991) Viruses in human cancers. *Science.* 254: 1167-1173.
- Zur Hausen H (1996) Papillomavirus infections-a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta.* 1288(2): F55–78.
- Zur Hausen H (2000) Papillomaviruses Causing Cancer: Evasion From Host-Cell Control in Early Events in Carcinogenesis. *J of the Nat Canc Inst.* 92 (9): 690-698.

9. Curriculum vitae (Lattes)

Anna Jessica Duarte Silva

Curriculum Vitae

Dados pessoais

Nome Anna Jessica Duarte Silva
Filiação Luiz Aureliano da Silva e Maria das Graças Duarte Santos Silva
Nascimento 13/08/1992 - Serra Talhada/PE - Brasil
Carteira de Identidade 8565237 SDS - PE - 06/06/2008
CPF 092.588.744-71

Formação acadêmica/titulação

2014 Mestrado em Genética.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Desenvolvimento de estratégias profilático-terapêuticas contra o Papilomavírus humano (HPV): produção de antígenos imunizantes baseados em L1 e E5 em sistema de expressão procarioto
Orientador: Antonio Carlos de Freitas
Co-orientador: Christian Robson de Souza Reis
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

2010 - 2014 Graduação em Biomedicina.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Construção e avaliação de vetor de expressão bacteriano para o gene E5 do Papilomavírus Humano Tipo 16
Orientador: Antonio Carlos de Freitas

Formação complementar

2015 - 2015 Curso de curta duração em Big Data em Genética e Genômica. (Carga horária: 3h).
Sociedade Brasileira de Genética, SBG, Ribeirão Preto, Brasil

Produção

Produção bibliográfica

Artigos aceitos para publicação

1. CORDEIRO, MARCELO NAZÁRIO, PAOLINI, FRANCESCA, MASSA, SILVIA, CURZIO, GIANFRANCA, ILLIANO, ELENA, **DUARTE SILVA, ANNA JÉSSICA**, FRANCONI, ROSELLA, BISSA, MASSIMILIANO, MORGHEN, CARLO DE GIULI, DE FREITAS, ANTONIO CARLOS, VENUTI, ALDO
Anti-tumor effects of genetic vaccines against HPV major oncogenes. Human Vaccines & Immunotherapeutics. , 2015.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. LIMA, G. B., SILVA, A., **SILVA, A. J. D.**, GOMES, B. S.
Avaliação do conhecimento básico de genética de alunos concluintes ou em conclusão do ensino médio da rede pública do estado de Pernambuco. In: XX Encontro de Genética do Nordeste, 2014, Campina Grande - PB.
Anais do XX ENGENE - ENCONTRO DE GENÉTICA DO NORDESTE. , 2014.
2. **SILVA, A. J. D.**, MARIZ, F. C., DE FREITAS, ANTONIO CARLOS
Desenvolvimento de estratégias profilático-terapêuticas contra o Papilomavírus humano (HPV): construção de antígenos imunizantes para produção em sistema de expressão procarioto In: XX Encontro de Genética do Nordeste, 2014, Campina Grande - PB.
Anais do XX ENGENE - ENCONTRO DE GENÉTICA DO NORDESTE. , 2014.
3. CHAGAS, B. S., **DUARTE SILVA, ANNA JÉSSICA**, SILVA, R.C.O, CROVELLA, S., DE FREITAS, ANTONIO CARLOS
Distribuição de Polimorfismo de Base Única (SNPs) no gene do Fator de Necrose Tumoral (Tnfα) (-308) entre pacientes com lesão cervical e infectadas pelo Papilomavírus Humano In: XX Encontro de Genética do Nordeste, 2014, Campina Grande - PB.
Anais do XX ENGENE - ENCONTRO DE GENÉTICA DO NORDESTE. , 2014.

Apresentação de trabalho e palestra

1. **SILVA, A. J. D.**, MARIZ, F. C., REIS, CRS, DE FREITAS, ANTONIO CARLOS
Desenvolvimento de Estratégias Profilático-Terapêuticas contra o Papilomavírus Humano (HPV) em Sistema de Expressão Procarioto, 2015. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)
2. **DUARTE SILVA, ANNA JÉSSICA**, MARIZ, F. C., REIS, CRS, DE FREITAS, ANTONIO CARLOS
Development of Prophylactic and Therapeutic Strategies against Human Papillomavirus (HPV) in a Prokaryotic Expression System, 2015. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
3. LIMA, GB, SILVA, A., **SILVA, A. J. D.**, GOMES, B. S., DE MELO NETO, OP
Avaliação do conhecimento básico de genética de alunos concluintes ou em conclusão do ensino médio da rede pública do estado de Pernambuco., 2014. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
4. **SILVA, A. J. D.**, MARIZ, F. C., DE FREITAS, ANTONIO CARLOS
Desenvolvimento de estratégias profilático-terapêuticas contra o Papilomavírus humano (HPV): construção de antígenos imunizantes para produção em sistema de expressão procarioto, 2014. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
5. CHAGAS, B. S., **DUARTE SILVA, ANNA JÉSSICA**, SILVA, R.C.O, CROVELLA, S., DE FREITAS, ANTONIO CARLOS
Distribuição de polimorfismos de base única (SNPS) no gene do fator de necrose tumoral (TNFα) (-308) entre pacientes com lesão carvical e infectadas pelo Papilomavírus Humano, 2014. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

Eventos

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) **V Jornada de Pós graduação em Genética PPGG UFPE**, 2015. (Outra)
DESENVOLVIMENTO DE ESTRATÉGIAS PROFILÁTICO-TERAPÊUTICAS CONTRA O

PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) EM SISTEMA DE EXPRESSÃO PROCARIOTO.

2. Apresentação de Poster / Painel no(a) **61º Congresso Brasileiro de Genética**, 2015. (Congresso)

Development prophylactic and therapeutic strategies against human papillomavirus (HPV) in a prokaryotic expression system.

3. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XX Encontro de Genética do Nordeste**, 2014. (Encontro)

“DESENVOLVIMENTO DE ESTRATÉGIAS PROFILÁTICO-TERAPÊUTICAS CONTRA O PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV): CONSTRUÇÃO DE ANTÍGENOS IMUNIZANTES PARA PRODUÇÃO EM SISTEMA DE EXPRESSÃO PROCARIOTO.