

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

Desenvolvimento de duas plataformas biotecnológicas baseadas em *Pichia pastoris* e *Leishmania tarentolae* para produção de candidatos vacinais contra os Papilomavírus humano (HPV) e bovino (BPV)

Filipe Colaço Mariz

Recife/ Pernambuco

Agosto de 2016

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

Filipe Colaço Mariz

Desenvolvimento de duas plataformas biotecnológicas baseadas em *Pichia pastoris* e *Leishmania tarentolae* para produção de candidatos vacinais contra os Papilomavírus humano (HPV) e bovino (BPV)

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

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

Orientador:

Prof. Dr Antonio Carlos de Freitas, Depto. de Genética, UFPE.

Co-orientador:

Prof. Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto, Depto. de Microbiologia, FIOCRUZ-PE.

Profa. Dra. Barbara Papadopoulou, Department of Microbiology-Infectious Diseases and Immunology, Laval University, Canadá..

Recife/ Pernambuco

Agosto de 2016

Mariz, F. C.	Desenvolvimento de duas plataformas biotecnológicas baseadas em linhagens recombinantes de <i>Pichia pastoris</i> e <i>Leishmania tarentolae</i> para produção de candidatos vacinais contra...	2,5 cm espaço reservado para etiqueta de localização	Doutorado PPGITUFPE 2016
--------------	---	--	--------------------------------

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

REITOR

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Profa. Florisbela de Arruda Camara e Siqueira Campos

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Profa. Maria Eduarda de Larrazábal

VICE- DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Profa. Oliane Maria Correia Magalhães

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

Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta

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

Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares

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

Mariz, Filipe Colaço

Desenvolvimento de duas plataformas biotecnológicas baseadas em *Pichia pastoris* e *Leishmania tarentolae* para a produção de candidatos vacinais contra os Papilomavírus humano (HPV) e bovino (BPV) / Filipe Colaço Mariz. – Recife: O Autor, 2016.

205 f.: il.

Orientadores: Antônio Carlos de Freitas, Osvaldo Pompílio de Melo Neto, Barbara Papadopoulou

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, 2016.

Inclui referências

1. Papilomavírus 2. Papilomavírus - Vacina I. Freitas, Antônio Carlos de (orient.) II. Melo Neto, Osvaldo Pompílio (coorient.) III. Papadopoulou, Barbara (coorient.) IV. Título.

579.2445

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017-143

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

PARECER DA COMISSÃO EXAMINADORA DE DEFESA DE TESE

“Desenvolvimento de duas plataformas biotecnológicas baseadas em *Pichia pastoris* e *Leishmania tarentolae* para produção de candidatos vacinais contra os Papilomavírus humano (HPV) e bovino (BPV)”

por

Filipe Colaço Mariz

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

Recife/Pernambuco

Agosto de 2016.

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

Membro Externo: Prof. Dr. Marcos A. de Moraes Junior (Depto de Genética – UFPE)

Membro Externo: Prof. Dr. Tercílio Calsa Junior (Depto de Genética – UFPE)

Membro Externo: Prof. Dr. Roberto D. Lins Neto (LAVITE – CPqAM)

Membro Externo: Prof. Dr. Lindomar José Pena (LAVITE – CPqAM)

Membro Interno/Coordenadora do Programa: Profa. Dra. Maira Galdino da R. Pitta
(Depto de Bioquímica, UFPE)

“Tomorrow belongs to those who can hear it
coming”

David Bowie

Fora, Temer!

À Profa. Suely Galdino (*in memorian*), pelo estímulo e inspiração; ao Prof. Waldecyro Colaço, pelo exemplo; e a Leonel “Leon”, pela alegria.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas, por uma vida acadêmica de apoio, confiança e compreensão sem iguais. Ao Prof. Osvaldo Pompílio de Melo Neto (Departamento de Microbiologia/CPqAM), pelas oportunidades, gentileza e retidão. À Profa. Barbara Papadopoulou (*Axe des Maladies Infectieuses et Immunitaires* - CHUL de Québec, Canadá), pela confiança, *expertise* compartilhada e caloroso acolhimento em um lugar longe de casa.

Ao Prof. Dr. Fernando Araripe Gonçalves Torres (Departamento de Biologia Celular/UnB), pelas colaborações e sugestões técnicas imprescindíveis a este trabalho.

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

À Larissa, pelo companheirismo e suporte profissionais necessários a este trabalho, e pelo precioso carinho fora dele.

Ao Dr. Christian de Souza Reis e Dra. Danielle Moura pela assistência e discussões técnicas; ao Dr. Antonio Rezende, pelas discussões críticas nas análises de Bioinformática; à Dra. Cássia Docena, Dra. Karina Conceição Araújo e Dr. Antonio Pereira-Neves, pelo suporte nas preparações e análises por microscopia confocal e eletrônica.

À Dra. Vanina Alvarez (IIB-INTECH, Argentina), pela gentil colaboração para os ensaios relacionados à SUMOilação.

Aos amigos e colegas do LEMTE/LabCen e BioMolTrip/CPqAM, pelo prazeroso ambiente de trabalho. Aos técnicos do Departamento de Microbiologia/CPqAM, pelo suporte necessário ao andamento deste trabalho. Aos colegas do corredor 12 do *Axe des Maladies Infectieuses et Immunitaires* - CHUL de Québec, Carole Dumas, Dra. Ouafa Zghidi-Abouzid e Hiva Azizi, pelo profissionalismo, companheirismo e discussões críticas.

À Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta, pela atenção e revisão crítica do trabalho.

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

À Haydée e Leonel, pela alegria que salva sobretudo os dias difíceis e por me transformar a cada dia. A minha mãe Waldêny, meus sogros José Antonio e Elieuda, meu irmão Jairinho e tia Eliane, pelas orações e amparo. A Pedro Correia, Alexandre, Susie e familiares, pelo carinhoso acolhimento e inestimável amizade para os quais serei eternamente grato.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Revisão de Literatura	
Figura 1	Comparação entre a configuração dos genomas de dois PVs, o BPV1 e do HPV18. 22
Figura 2	Reconstrução filogenética da família <i>Papillomaviridae</i> a partir do concatenamento dos genes E1-E2-L1. 24
Figura 3	Diagrama esquemático do ciclo viral durante infecção produtiva pelo PV. 26
Figura 4	Integração do DNA do HPV no genoma da célula hospedeira. 29
Figura 5	A carcinogênese pelo BPV. 31
Figura 6	Mortalidade mundial pelo câncer cervical. 32
Figura 7	A incidência do câncer cervical no Brasil. 34
Figura 8	Os tumores induzidos pelo BPV afetam diferentes sítios corpóreos em bovinos 36
Figura 9	Caracterização estrutural dos vírions, VLPs e capsômeros do PV 41
Figura 10	Diagrama ilustrativo da proteína L2 do PV. 44
Figura 11	Regulação da expressão gênica em <i>Leishmania</i> . 52
Resultados	
Figura 12	Amplificação e construção dos candidatos vacinais baseados em L1 e L2 de HPV16. 67
Figura 13	Amplificação dos candidatos vacinais baseados na ORF E5. 68
Figura 14	Estrutura tridimensional das quimeras L1-L2, L1-E5multi.h4 e L1-E5multi.34. 69
Figura 15	Clonagem dos candidatos vacinais em vetor de expressão pSP-BT1.YNEO α . 71
Figura 16	Clonagem dos candidatos vacinais nos vetores de expressão pSP- 72

$\alpha\alpha$ NEO e pSP-YHYG α .

Figura 17	Clonagem dos candidatos vacinais em vetor de expressão pSP-rRNAp- $\alpha\alpha$ Neo.	73
Figura 18	Construção do cassete pPGK Δ 3-L1H16 para expressão intracelular de L1 sob regulação do promotor P _{PGK1} .	75
Figura 19	Análise da expressão dos candidatos vacinais em <i>L. tarentolae</i> .	77
Figura 20	Deteção dos candidatos vacinais E5otH16 e E5multi e análise da transcrição dos referidos genes nas linhagens recombinantes de <i>L. tarentolae</i> .	79
Figura 21	Seleção e varredura dos clones de <i>P. pastoris</i> com múltiplas cópias do cassete de expressão pPGK Δ 3-L1H16.	80
Figura 22	<i>Western blotting</i> dos extratos intracelulares provenientes dos clones de <i>P. pastoris</i> cultivados em frascos.	81
Figura 23	Evidências da montagem espontânea de VLPs no citoplasma dos clones de <i>P. pastoris</i> expressando L1 sob controle do promotor constitutivo PGK1.	82
Figura 24	Imunolocalização da proteína L2wt e caracterização de sua modificação pós-traducional em <i>L. tarentolae</i> .	85
Figura 25	<i>Western blotting</i> empregando as frações do gradiente de sacarose para deteção dos candidatos vacinais baseados em L1 produzidos em <i>L. tarentolae</i> .	86
Figura 26	<i>Western blotting</i> empregando as frações obtidas a partir da purificação com a resina heparina-sepharose.	87
Figura 27	Microscopia de imunofluorescência dos protozoários recombinantes expressando os candidatos vacinais baseados em L1.	88
Figura 28	Microscopia eletrônica de transmissão empregando os protozoários recombinantes expressando os candidatos vacinais baseados em L1.	89
Figura 29	Imunocitoquímica com o CamVir-1 empregando as linhagens de <i>L. tarentolae</i> recombinantes.	90

LISTA DE TABELAS

	Página
Métodos	
Tabela 1	
Sequências dos <i>primers</i> utilizados para as análises envolvendo os sistemas genéticos baseados no promotor P _{PGK1} de <i>P. pastoris</i> .	59
Tabela 2	
Sequências dos <i>primers</i> utilizados para amplificação dos candidatos vacinais explorados em <i>L. tarentolae</i>	60
Tabela 3	
Análise das sequências de aminoácidos preditas para os genes envolvidos na via de SUMOilação em <i>L. tarentolae</i> , de acordo com alinhamento pelo BLAST.	84

LISTA DE ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
AOX	Álcool oxidase
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BPV	Papilomavírus bovino
BT1	transportador-1 de biopterina, do inglês <i>Biopterine transporter-1</i>
COPV	Papilomavírus oral canino
CRPV	Papilomavírus do coelho <i>cottontail</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DST	Doença sexualmente transmissível
E1-7	Genes de expressão precoce ou inicial, do inglês <i>Early genes</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GRAS	Geralmente reconhecida como segura, do inglês <i>Generally Recognized As Safe</i>
HBsAg	Antígeno de superfície da hepatite B, do inglês <i>Hepatitis B Antigen</i>
HBV	Vírus da hepatite B, do inglês <i>Hepatitis B virus</i>
HCV	Vírus da hepatite C, do inglês <i>Hepatitis C virus</i>
HPV	Papilomavírus humano
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton

L1 e L2	Genes de expressão tardia, do inglês <i>Late genes 1, 2</i>
LCR	Longa região de controle, do inglês <i>Long Region Control</i>
MHC-I/II	Complexo de histocompatibilidade principal classe I/II, do inglês <i>Major Histocompatibility Complex class I/II</i>
NIC 1-3	Neoplasia Intraepitelial Cervical
NTS	Espaçadores não transcritos, do inglês <i>Nontranscribed spacers</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	Quadro aberto de leitura, do inglês <i>Open Reading Frame</i>
pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato – salina, do inglês <i>Phosphate buffer-saline</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase, do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PGK	Enzima 3-fosfoglicerato quinase, do inglês <i>3-phosphoglycerate kinase</i>
<i>PGK1</i>	Gene codificante da enzima 3-fosfoglicerato quinase, do inglês <i>3-phosphoglycerate kinase gene</i>
PMSF	<i>Phenylmethanesulphonyl fluoride</i>
pRB	Proteína do retinoblastoma
PV	Papilomavírus
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
SDS	Dodecil sulfato de sódio
<i>Sh ble</i>	Gene que confere resistência à droga Zeocina relacionada à bleomicina
SUMO	Pequenos modificadores semelhantes a ubiquitina, do inglês <i>Small</i>

ubiquitine-like modifier

TBS	Tampão tris-salina
TBST	Tampão tris-salina contendo Tween
URR	Região regulatória à jusante, do inglês <i>Upstream Regulatory Region</i>
UTR	Região não traduzida, do inglês <i>Untranslated Region</i>
VLPs	Partículas semelhantes ao vírus, do inglês <i>Virus-like particles</i>
cVLPs	Partículas quiméricas semelhantes ao vírus, do inglês <i>chimeric Virus-like particles</i>
YNB	Y east N itrogen B ase
ZIKV	Zika vírus

RESUMO

Mariz, F.C. **Desenvolvimento de duas plataformas biotecnológicas baseadas em *Pichia pastoris* e *Leishmania tarentolae* para produção de candidatos vacinais contra os Papilomavírus humano (HPV) e bovino (BPV).**

O Papilomavírus (PV) é um reconhecido agente de lesões hiperproliferativas benignas que, sob determinadas circunstâncias, podem evoluir para lesões cancerosas. Em humanos, o HPV está relacionado ao desenvolvimento do câncer cervical e anogenital, enquanto o BPV é o agente de cânceres em bovinos e equinos. Atualmente, duas vacinas estão licenciadas para profilaxia contra o HPV, as quais se baseiam em partículas semelhantes ao vírus (VLPs, *virus-like particles*) obtidas a partir da produção da proteína L1 em sistemas de expressão heteróloga. Apesar de comprovadamente eficazes, ambas as vacinas apresentam importantes limitações relacionadas ao baixo espectro de proteção e elevado custo, o que impede sua implementação sobretudo nos países em desenvolvimento. Neste trabalho, apresentamos o desenvolvimento de duas plataformas biotecnológicas para produção de candidatos vacinais contra o HPV e BPV. Uma das plataformas emprega um sistema genético baseado no promotor constitutivo do gene *PGK1* da levedura *Pichia pastoris* para expressão intracelular da proteína L1 de HPV16. Em paralelo, diferentes candidatos vacinais do HPV e BPV foram desenvolvidos para expressão em *Leishmania tarentolae* através do emprego de distintos sistemas genéticos. As análises de expressão por *dot blotting* e *western blotting* com anticorpos monoclonais demonstram a presença dos candidatos vacinais no lisado das leveduras recombinantes, enquanto evidências obtidas por microscopia eletrônica de transmissão sugerem a formação de VLPs no citoplasma dos clones cultivados. Em contrapartida, as análises por ultracentrifugação e purificação com resina de heparina-sepharose evidenciaram a formação de capsômeros e VLPs quiméricas a partir dos candidatos vacinais produzidos em *L. tarentolae*. Interessantemente, nossos ensaios apresentam evidências de uma modificação pós-traducional ainda não revelada em espécies de *Leishmania*, denominada SUMOilação. Demonstramos por diferentes abordagens que tal modificação, ao ser realizada na proteína L2, ocorre através de um padrão semelhante ao descrito em células de mamíferos. Futuros ensaios focarão na determinação dos níveis de produção a partir de cultivos em biorreator e na imunogenicidade de candidatos vacinais desenvolvidos. Esses resultados demonstram a viabilidade do emprego de *P. pastoris* e *L. tarentolae* como plataforma vacinal para o desenvolvimento de abordagens potencialmente mais econômicas e de largo espectro contra a papilomatose humana e animal.

Palavras-chave: Papilomavírus. *Pichia pastoris*. *PGK1*. *Leishmania tarentolae*. VLPs. SUMOilação.

ABSTRACT

Mariz, F.C. **Development of two biotechnologic platforms based on *Pichia pastoris* and *Leishmania tarentolae* strains for producing of candidate vaccines against human and animal papillomatosis.**

Infection by Papillomavirus (PV) is a well-known cause for the establishment of hyperproliferative and benign lesions (warts) that can evolve to carcinoma under specific circumstances. In human, HPV is related to cervical and other anogenital cancer, while BPV is the causal agent of different types of cancer in cattle. The current HPV vaccines licensed for prophylaxis against cervical cancer are based on virus-like particles (VLPs) obtained through the expression of major capsid L1 protein in heterologous expression systems. Although highly effective, both vaccines present important limitations related to their low spectrum of protection and high cost, which compromises their implementation worldwide, mainly in developing countries. Herein, we present the development of two biotechnologic platforms for production of vaccine candidates against HPV and BPV. The first one employs a genetic system based on the *Pichia pastoris* PGK1 constitutive promoter for intracellular expression of HPV16 L1 protein. In parallel, we designed different HPV16 and BPV1 vaccine candidates for expression in the protozoan *Leishmania tarentolae* through distinct genetic systems. Expression analysis by dot blotting and western blotting using monoclonal antibodies demonstrated the detection of L1 protein in the total protein lysate of recombinant yeasts, in addition to the electron microscopy evidences suggesting VLP assembling within the cytosol of the clones. In the other hand, ultracentrifugation and purification on heparin-sepharose resin evidenced the assembling of capsomeres and VLP by expressing of L1-based candidates in *L. tarentolae*. Interestingly, our set of data indicates the occurrence of a post-translational modification by small ubiquitine-like modifier (SUMO) still not revealed in *Leishmania* species. For the first time, we demonstrate that such modification (SUMOylation), when presented in the *L. tarentolae*-expressed HPV16 L2 protein, takes place in a mammalian-like pattern. Future studies will focus on immunogenicity assays with the vaccine candidates developed here. The data presented here demonstrated the feasibility of *P. pastoris* PGK1-based system and *L. tarentolae* as platforms for the developing of low cost and large spectrum vaccine strategies against human and animal papillomatosis.

Keywords: Papillomavirus. *Pichia pastoris*. PGK1. *Leishmania tarentolae*. VLPs. SUMOylation.

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS	12
1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 O PAPILOMAVÍRUS	21
2.1.1 Classificação e estrutura viral	22
2.1.2 História natural da infecção pelo PV	24
2.1.3 A carcinogênese pelo HPV e BPV	28
2.1.4 Epidemiologia do câncer cervical	31
2.1.5 Epidemiologia da papilomatose animal pelo BPV	35
2.2 A RESPOSTA IMUNE CONTRA O PV E O DESENVOLVIMENTO DE VACINAS	38
2.2.1 Vacinas autóloga, heteróloga e baseadas em vírions purificados	39
2.2.2 Vacinas recombinantes baseadas nas proteínas L1 e L2	40
2.2.3 Vacinas baseadas em partículas semelhantes ao vírus (VLPs)	40
2.2.4 Vacinas baseadas em VLPs contra o HPV	41
2.2.5 Vacinas de segunda geração contra o HPV	43
2.2.6 Vacinas de segunda geração baseadas em subunidades da proteína L1	43
2.2.7 Vacinas de segunda geração baseadas na proteína L2	44
2.2.8 Vacinas de segunda geração com propriedades profiláticas e terapêuticas	45
2.2.9 Vacinas contra o BPV	46
2.3 SISTEMAS DE EXPRESSÃO HETERÓLOGA PARA PRODUÇÃO DE IMUNÓGENOS DO PV	47
2.3.1 Sistemas baseados em <i>Pichia pastoris</i>	48
2.3.2 Sistemas baseados em <i>Leishmania tarentolae</i>	49
3 JUSTIFICATIVAS	53
4 OBJETIVOS	55
4.1 OBJETIVO GERAL	55
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	55
5 MATERIAL E MÉTODOS	56
5.1 MATERIAL	56
5.1.1 Linhagens de microrganismos	56
5.1.2 Plasmídeos	56
5.1.3 Tampões, Soluções e meios de cultura	57
5.1.4 Enzimas, kits e anticorpos	57
5.2 MÉTODOS	59
5.2.1 Desenho de <i>primers</i> , genes e sequenciamentos	59
5.2.2 Cultivo de microrganismos	61
5.2.3 Manipulação de ácidos nucleicos e proteínas	62
5.2.4 Imunodeteccões e <i>northern blotting</i>	62
5.2.5 Ensaios de imunolocalização	63
5.2.6 Ultracentrifugação em gradiente de sacarose	63

5.2.7 Purificação com resina de heparina-sepharose	64
5.2.8 Microscopia eletrônica de transmissão e imunocitoquímica	64
6 RESULTADOS	66
6.1 CONSTRUÇÃO DOS CANDIDATOS VACINAIS PARA EXPRESSÃO EM <i>L. tarentolae</i>	66
6.2 CONSTRUÇÃO DOS CASSETES DE EXPRESSÃO E OBTENÇÃO DE LINHAGENS RECOMBINANTES DE <i>L. tarentolae</i>	70
6.3 CONSTRUÇÃO DO VETOR PARA EXPRESSÃO DE L1 EM <i>P. pastoris</i> E OBTENÇÃO DE LEVEDURAS RECOMBINANTES	74
6.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS CANDIDATOS VACINAIS EM <i>L. tarentolae</i>	76
6.5 AVALIAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO DOS CANDIDATOS VACINAIS BASEADOS EM E5 NAS LINHAGENS DE <i>L. tarentolae</i>	78
6.6 SELEÇÃO E VARREDURA DOS RECOMBINANTES DE <i>P. pastoris</i> COM MÚLTIPLAS CÓPIAS DO CASSETE DE EXPRESSÃO	79
6.7 ANÁLISE DA EXPRESSÃO INTRACELULAR DA PROTEÍNA L1 EM <i>P. pastoris</i> : CULTIVO DOS CLONES EM FRASCOS	80
6.8 EVIDÊNCIAS DA MONTAGEM DE VLPS NO CITOPLASMA DOS CLONES DE <i>P. pastoris</i> EXPRESSANDO L1	81
6.9 INVESTIGAÇÃO DA MODIFICAÇÃO PÓS-TRADUCIONAL NA PROTEÍNA L2wt EXPRESSA EM <i>L. tarentolae</i>	83
6.10 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS CAPSÔMEROS E VLPS A PARTIR DA EXPRESSÃO EM <i>L. tarentolae</i>	86
7 DISCUSSÃO	92
8 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	103
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
APÊNDICE	141

1. INTRODUÇÃO

Os Papilomavírus constituem um grupo de vírus DNA dupla fita associado ao desenvolvimento de lesões epiteliais hiperproliferativas e tumores em diferentes espécies de animais. Em humanos, a infecção persistente pelo papilomavírus (HPV, Papilomavírus humano) é a doença sexualmente transmissível (DST) mais comumente relatada no mundo e tem como seu principal acometimento o câncer de colo do útero ou câncer cervical. Das quase 266.000 mulheres que vão ao óbito por ano em decorrência desse quadro no mundo, quase 90% encontram-se nos países em desenvolvimento. De maneira similar, a infecção persistente pelo Papilomavírus bovino (BPV) está associada ao desenvolvimento de cânceres no trato gastrointestinal, na bexiga urinária e no tecido cutâneo em diferentes espécies de bovinos e equinos. O Brasil se destaca mundialmente tanto pela elevada prevalência de câncer cervical quanto pelo grande número de animais infectados por BPV no seu rebanho, o maior do mundo.

Abordagens preventivas constituem a melhor opção para combater as doenças relacionadas a infecção pelo papilomavírus. Com exceção do melanoma, o câncer cervical é o tipo de câncer que apresenta maior potencial de prevenção. Desde 2009, duas vacinas profiláticas são comercializadas para proteção contra os HPVs tipos 16 e 18, os mais comumente encontrados em neoplasias cervicais. Essas vacinas anti-HPV são baseadas em partículas semelhantes ao vírus (*virus-like particles*, VLPs) obtidas a partir da produção da principal proteína do capsídeo viral (L1) em plataformas biotecnológicas ou sistemas de expressão heteróloga. Apesar de comprovadamente eficazes, essas vacinas apresentam importantes limitações: (i) elevado custo; (ii) baixo espectro de proteção. Conseqüentemente, diferentes grupos de pesquisa em todo mundo têm explorado o desenvolvimento de novas plataformas vacinais capazes de diminuir os custos de produção e atender as demandas atuais. Em paralelo, nenhuma abordagem vacinal está disponível para controle da papilomatose animal até o momento. O combate veterinário ao BPV tem se baseado exclusivamente no tratamento de lesões e tumores por remoção cirúrgica ou tratamento químico, mas tais abordagens apresentam baixa percentual de sucesso e elevada recorrência. Frequentemente, uma significativa parte do rebanho é abatida na tentativa de conter a propagação viral nas áreas de criação.

No presente trabalho, relatamos o desenvolvimento de duas plataformas biotecnológicas baseadas em linhagens da levedura *Pichia pastoris* e do parasita não patogênico a humanos *Leishmania tarentolae* para expressão de antígenos vacinais do HPV16 e BPV1. Desenvolvemos um sistema genético para expressão intracelular da proteína L1 de HPV16 sob regulação do promotor constitutivo P_{PGK1} de *P. pastoris*, paralelamente a outros sistemas genéticos para produção intracelular da proteína capsidial L2 de HPV e de versões quiméricas da proteína L1 em *L. tarentolae*, buscando a obtenção de VLPs ou subunidades do capsídeo viral denominadas capsômeros. Nessas quimeras de L1, foram adicionados epitopos da proteína capsidial L2 e da oncoproteína E5, os quais são capazes de induzir resposta humoral de proteção cruzada contra vários tipos de HPV e resposta terapêutica baseada em linfócitos T, respectivamente. A confirmação da expressão desses antígenos de HPV nas linhagens recombinantes foi realizada por *dot blotting*, *western blotting* e imunofluorescência utilizando um conjunto de anticorpos monoclonais, enquanto a caracterização estrutural dos capsômeros e VLPs foi realizada por sedimentação em gradiente de sacarose, cromatografia de afinidade e microscopia eletrônica de transmissão. Uma abordagem adicional empregou a expressão de antígenos baseados na oncoproteína E5 de BPV1 e HPV16 em *L. tarentolae*. Neste caso, obtivemos sucesso apenas na expressão da versão antigênica do BPV1, enquanto os dados obtidos por *western blotting* e *northern blotting* sugerem que a expressão dos antígenos baseados em E5 de HPV é altamente instável.

O desenvolvimento de plataformas vacinais alternativas, além de contornar os gargalos atualmente existentes, diversifica as opções de proteção disponíveis e gera competição no mercado, constituindo uma estratégia capaz de diminuir os custos das vacinas anti-HPV atualmente licenciadas. Também propomos neste trabalho o desenvolvimento de candidatos vacinais com propriedades de proteção de largo espectro e terapêutica contra o HPV. Adicionalmente, salientamos a ausência de qualquer estratégia vacinal contra o BPV e a importância de uma plataforma para produção de antígenos com finalidade terapêutica num contexto onde o país possui o maior rebanho bovino do mundo, mas não dispõe de qualquer medida de controle contra a papilomatose bovina. Estudos para otimização da produção e avaliação da funcionalidade imunológica dos antígenos estão em fase de execução.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O PAPILOMAVÍRUS

Os papilomavírus (PVs) estão dispersos entre os vertebrados de homeotérmicos e se diversificaram ao longo da história evolutiva desse grupo (GOTTSCHLING et al., 2007). São capazes de infectar diferentes espécies de mamíferos placentais das ordens Primata (humanos, chimpanzés, bonobó, gorila, macaco, colobus, macaco aranha), Carnívora (gato e cachorro), Perissodáctilo (cavalos), Artiodáctilo (gado, ovelha, cervo, alce), Cetáceo (golfinho), Lagomorfo (coelho e coelho *cottontail*), Sirenia (peixe-boi) e Rodentia (rato, hamster e porco-espinho). Também são capazes de infectar outros hospedeiros distantes, como marsupiais, pássaros e répteis (GARCÍA-VALLVÉ et al., 2006; GOTTSCHLING et al., 2007; DOORSLAER, 2013). São vírus que possuem tropismo por queratinócitos indiferenciados da camada basal do epitélio mucoso e cutâneo, estando etiologicamente relacionados ao desenvolvimento de lesões hiperproliferativas (HOWLEY & LOWY, 2001). Essas lesões, conhecidas como verrugas, são geralmente benignas e a infecção é normalmente eliminada pela resposta imune do hospedeiro, a qual é direcionada contra antígenos virais. Contudo, ocasionalmente as lesões não regredem e, sob a ação de cofatores apropriados, podem progredir para câncer (BRIEN; CAMPO, 2002; ZUR HAUSEN, 2002).

De especial importância nesse âmbito é o potencial oncogênico do Papilomavírus Humano (HPV) e do Papilomavírus bovino (BPV). O primeiro é o agente causal de lesões anogenitais denominadas condiloma acuminado, constituindo a doença sexualmente transmissível (DST) mais comum em humanos – estima-se que 50% das mulheres seja infectada pelo menos uma vez na vida – e estando associado a virtualmente todos os casos de câncer do cólio do útero, ou câncer cervical (IARC WORKING GROUP, 2005; BRUNI et al., 2015a). O BPV, por sua vez, é o agente causador da papilomatose animal, um conjunto de doenças de relevância veterinária que afeta o gado causando importantes perdas econômicas e depreciação da saúde animal (FREITAS et al., 2011; BOCANETI et al., 2016). O estudo de ambos os agentes tem promovido grandes avanços não apenas na compreensão da carcinogênese viral como também no desenvolvimento de abordagens vacinais para controle e terapia de doenças infecciosas diversas.

2.1.1 Classificação e estrutura viral

A família *Papillomaviridae* compreende pequenos vírus compostos por um capsídeo icosaédrico não envelopado. Os membros dessa família, denominados Papilomavírus (PVs), possuem genoma de DNA dupla-fita circular com aproximadamente 8000 pb, organizado em três principais regiões: a longa região de controle (LCR – *Long Control Region* ou URR – *Upstream Regulatory Region*), que contém sequências regulatórias da transcrição e expressão gênica virais e corresponde a 7-11% do conteúdo genômico; a região de expressão precoce E (*Early*), que abrange 50% do genoma e contém ORFs (*Open Reading Frames* ou Quadro Aberto de Leitura) responsáveis pela codificação de proteínas (E1-7) envolvidas na replicação viral e transformação celular; a região de expressão tardia L (*Late*), que codifica as duas proteínas estruturais L1 e L2 capazes de se auto-montarem no vírion (figura 1) (DE VILLIERS et al., 2004; BRAVO; FÉLEZ-SÁNCHEZ, 2015). Os elementos conservados e que são compartilhados por todos os PVs são a LCR, as ORFs precoces E1, E2 (e possivelmente E4, que está localizada dentro de E2) e as ORFs L1 e L2 (GARCÍA-VALLVÉ; ALONSO; BRAVO, 2005).

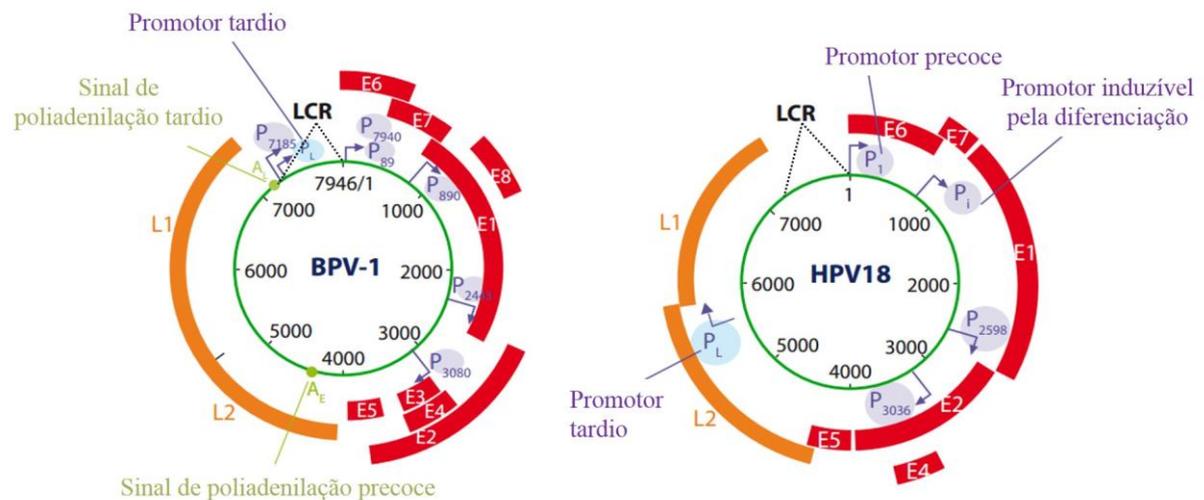


Figura 1. Comparação entre a configuração dos genomas de dois PVs, o BPV1 e do HPV18. No diagrama, o DNA dupla-fita circular com aproximadamente 8000 pb dos PVs está ilustrado como um círculo verde onde estão esquematizadas 3 distintas regiões: a LCR (linhas pontilhadas pretas), a região de expressão precoce (em vermelho) e região de expressão tardia (em laranja). Enquanto o genoma de BPV1 apresenta 8 ORFs dentro da região precoce, o genoma do HPV18 apresenta 7, as quais são arranjadas de maneira caracteristicamente diferente. Além disso, a disposição dos promotores (indicados pela letra P e por setas) e dos sítios de poliadenilação nos genomas de BPV1 e HPV18 também é distinta. Todas as ORFs, no entanto, são transcritas no mesmo sentido para todos os PVs. Fonte: adaptado de Bragard; Goubau; Michiels, 2015.

Atualmente, em torno de 210 genótipos descritos de PVs estão classificados em 29 gêneros, com base em análises filogenéticas das sequências de nucleotídeos do gene L1 (figura 2) (BERNARD *et al.*, 2010). Dois terços desse total (aproximadamente 160 genótipos) correspondem a HPVs, enquanto dos 60 genótipos de PVs animais restantes, 13 são caracterizados como BPVs (FREITAS *et al.*, 2011; BRAVO; FÉLEZ-SÁNCHEZ, 2015). Cerca de 60 genótipos de HPVs estão classificados dentro do gênero *Alphapapillomavirus* (*AlphaPVs*), dentre os quais estão todos os tipos oncogênicos associados a cânceres anogenitais. Outros 100 tipos de HPV estão classificados entre os gêneros *Beta* e *GammaPVs*. Dois outros gêneros, o *Mu* e o *NuPVs*, englobam apenas três tipos de HPV, para os quais não há nenhum outro genótipo proximamente relacionado (BRAVO; FÉLEZ-SÁNCHEZ, 2015). Por outro lado, os BPVs são classificados em três gêneros: *DeltaPVs* (BPV1, 2 e 13), *XiPVs* (BPV3, 4, 6, 9, 10, 11 e 12) e o *EpsilonPVs* (BPV5 e 8). Interessantemente, o BPV7 não ainda não foi classificado em nenhum gênero da família *Papillomaviridae* (FREITAS *et al.*, 2011).

Além das relações filogenéticas, outros critérios podem ser utilizados para classificação dos PVs. Obviamente que o propósito dessas classificações é um melhor enfoque clínico. Seguindo critérios de tropismo tecidual e características histopatológicas das lesões provocadas, por exemplo, os *Delta-BPVs* (BPV1, 2 e 13) são classificados como PVs cutâneos, os *Xi-BPVs* são epiteliotrópicos e o *Epsilon-BPVs* são cutâneos e epiteliotrópicos (BOCANETI *et al.*, 2016). Adicionalmente, a *International Agency for the Research on Cancer* (IARC) classifica os HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59 como de alto risco carcinogênico a humanos, enquanto outros genótipos (HPV5, 8 e 68, por exemplo) são classificados como de baixo risco (IARC WORKING GROUP, 2005).

De qualquer forma, é importante salientar que essas classificações não são definitivas. Mesmo isolados proximamente relacionados podem apresentar fenótipos divergentes. Dois exemplos ilustram bem esse contexto. Embora os HPV16 e 31 se encontrem no mesmo gênero e possuam tropismos similares, o HPV16 apresenta uma prevalência 15 vezes maior do que o HPV31. De maneira análoga, os HPV6 e 11 são do mesmo gênero e causam lesões produtivas similares, mas divergem no tropismo (o HPV6 está associado a verrugas genitais, enquanto o HPV11 está geralmente associado a papilomatose respiratórias) (BRAVO; FÉLEZ-SÁNCHEZ, 2015).

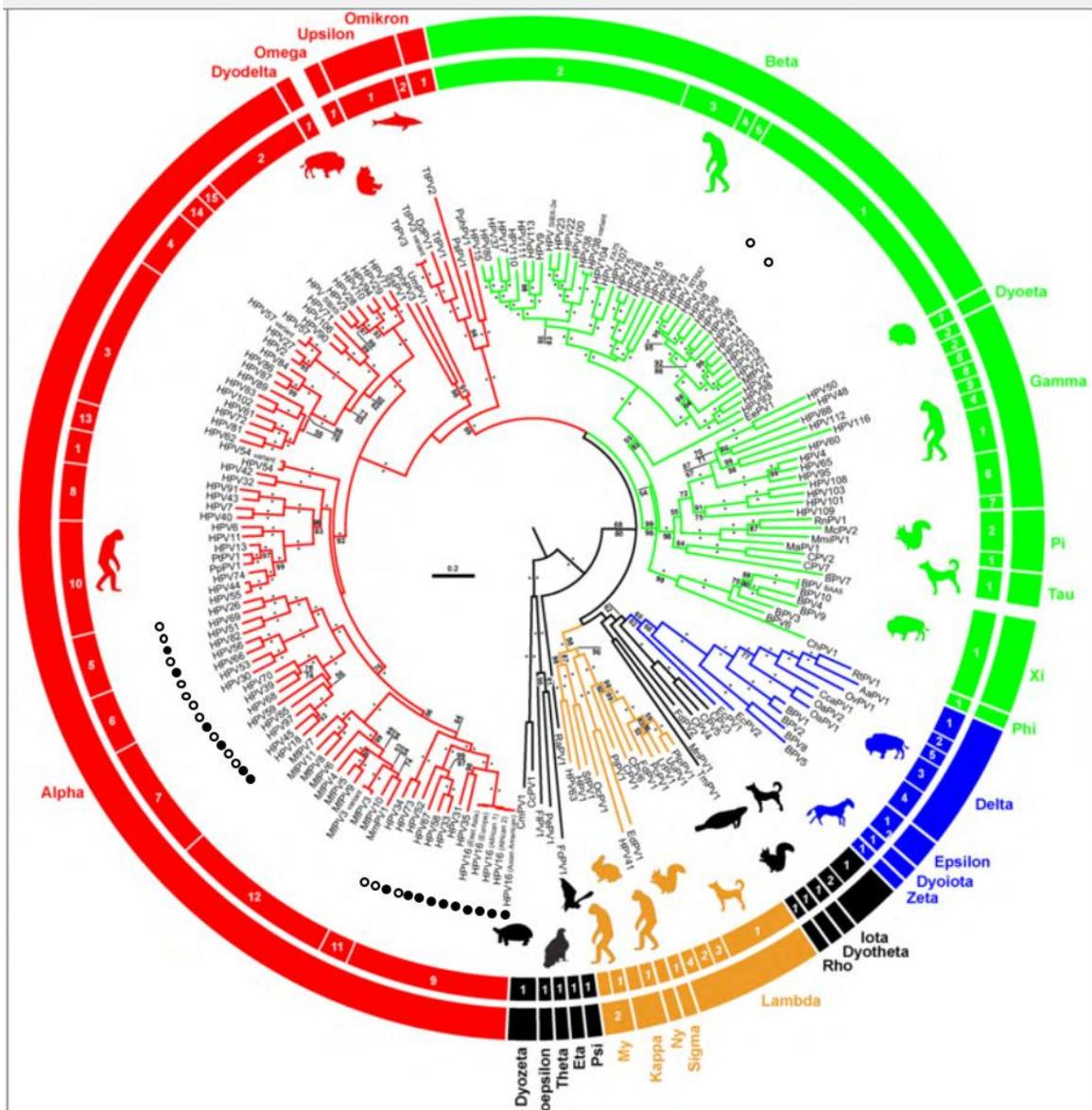


Figura 2. Reconstrução filogenética da família *Papillomaviridae* a partir do concatenamento dos genes E1-E2-L1. As cores salientam e relacionam os PVs aos quatro super-taxa da família e os PVs rotulados em pretos não estão classificados em nenhum super-taxa. As silhuetas representam os hospedeiros infectados pelos genótipos correspondentes. O potencial carcinogênico dos HPVs está indicado de acordo com a IARC: pontos pretos indicam genótipos de alto risco carcinogênico, enquanto os pontos brancos indicam os de baixo risco. Fonte: adaptado de Bravo; de Sanjosé; Gottschling, 2010.

2.1.2 História natural da infecção pelo PV

Atualmente, é bem aceito que tanto humanos quanto os demais mamíferos são colonizados por vários PVs, os quais causam infecções assintomáticas na pele e mucosas. De maneira que os PVs compõem uma parte fundamental da microbiota da pele normal de

mamíferos, sendo adquiridos durante os primeiros estágios de vida (SYRJÄNEN, 2010a; BRAVO; FÉLEZ-SÁNCHEZ, 2015). Apesar de serem considerados vírus epiteliotrópicos espécie específicos, transmissíveis por contato direto ou fômites contaminados, relevantes questionamentos existem quanto as suas vias de transmissão, seu tropismo tecidual e sua especificidade pelo hospedeiro (FREITAS et al., 2013).

Embora esteja bem adaptado a microbiota do hospedeiro, certas infecções pelo PV podem passar de apresentações clínicas autolimitantes e benignas, denominadas de verrugas, para tumores malignos. Em humanos, a infecção crônica por certos tipos de HPVs oncogênicos é um problema de saúde pública pela correlação com o desenvolvimento de neoplasias do trato anogenital, incluindo cérvix, vulva, vagina, pênis e ânus (ZUR HAUSEN, 2002). Ademais, associam-se também ao HPV alguns tipos de cânceres não genitais, como de cabeça (SYRJÄNEN, 2005; BRUNI et al., 2015a), laríngeo, esofágico, pulmonar (MAMMAS et al., 2011; BRUNI et al., 2015a) e de pele (STERLING, 2005). De maneira semelhante, certas circunstâncias conduzem a transformação de lesões e tumores benignos causados pelo BPV no tecido epitelial cutâneo e mucoso até carcinomas de células escamosas em bovinos e equinos (CAMPO, 2002; NASIR; CAMPO, 2008).

O ciclo de infecção do PV é não lítico e está intrinsecamente relacionado aos estágios de diferenciação das células epiteliais do hospedeiro (figura 3) (BRAVO; FÉLEZ-SÁNCHEZ, 2015). A ocorrência ou não de ciclo infeccioso produtivo depende da natureza do sítio epitelial onde a infecção se estabelece (DOORBAR et al., 2012). De acordo com o modelo atualmente proposto, a infecção requer o acesso do vírion a queratinócitos da lâmina basal, provavelmente através de microlesões e abrasões (WOODMAN; COLLINS; YOUNG, 2007; DOORBAR et al., 2012). A demonstração em modelos animais de que o ciclo infeccioso pode ser iniciado a partir da abrasão da pele seguida de exposição ao genoma viral desprovido de capsídeo sugere que o estabelecimento da infecção não requer o vírus na forma de vírion (CLADEL et al., 2008).

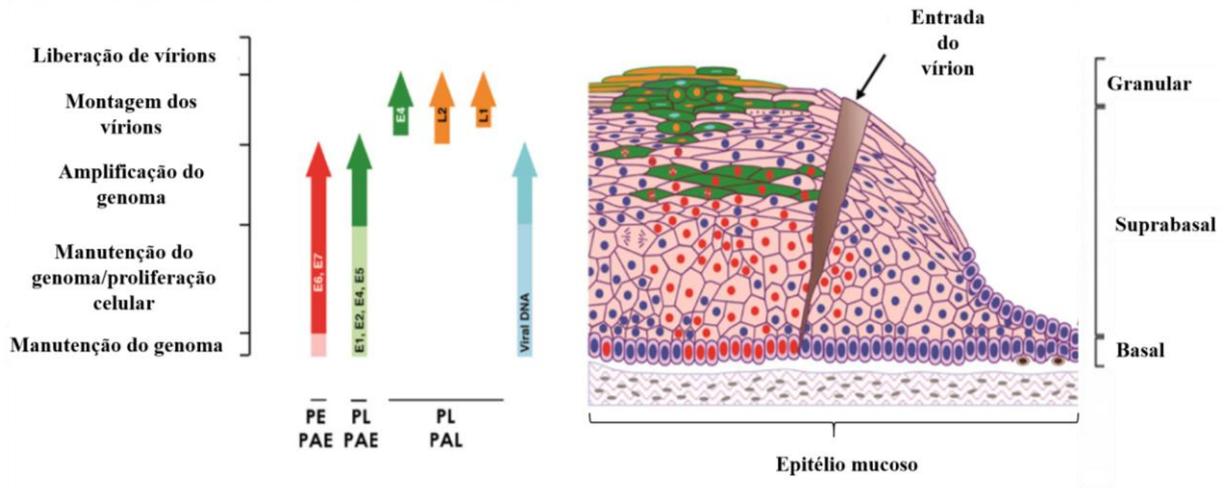


Figura 3. Diagrama esquemático do ciclo viral durante infecção produtiva pelo PV. As diferentes camadas celulares do epitélio estão indicadas à direita. A infecção se estabelece a partir de microlesões que permitem o acesso dos vírions à lâmina basal. As células basais infectadas constituem o reservatório da infecção, mantendo o genoma viral em baixas cópias epissemiais. A medida que se dividem, as células-filhas migram em direção à camada superficial do epitélio, acompanhando a diferenciação tecidual. Diferentes eventos do ciclo viral são estimulados pelos distintos estágios de diferenciação do epitélio e estão descritos à esquerda do diagrama. O conjunto de setas e a coloração das células no epitélio ilustram a regulação da expressão gênica e da replicação do genoma virais de acordo com as fases ou camadas teciduais nas quais ocorrem. As siglas PE e PL se referem aos promotores precoce (*Early*) e tardio (*Late*), respectivamente, também referidos como p97 e p670. As siglas PAE e PAL se referem ao sítio de poliadenilação precoce (*Poly-Adenylation Early*) e tardio (*Poly-Adenylation Late*), respectivamente. Fonte: adaptado de Doorbar et al., 2012.

O estágio inicial do ciclo viral na célula basal epitelial consiste, caracteristicamente, na estabilização do epissemio viral. A expressão dos genes virais ocorre através de um complexo padrão de eventos envolvendo a ativação de diferentes promotores virais em função do estágio de diferenciação epitelial (figura 3), bem como o processamento de distintos RNAs precursores policistrônicos até RNAs maduros (YANG; OKAYAMA; HOWLEY, 1985; JOHANSSON; SCHWARTZ, 2013). As proteínas E1 (helicase) e E2 atuam na amplificação inicial do genoma viral formando um complexo que se liga à origem de replicação viral e recruta a maquinaria celular necessária, mas são dispensáveis tão logo o número de cópias se estabilize (MOHR et al., 1990; FRATTINI; LAIMINST, 1994; CONGER et al., 1999). A proteína E2 funciona, ainda, como um fator de transcrição ativador ou inibidor dos demais genes E, e tem papel crítico na segregação do epissemio viral nas células basais (DOORBAR et al., 2012).

As proteínas E5, E6 e E7 são produzidas a partir do mesmo RNA policistrônico codificante das proteínas E1 e E2. De maneira geral, tanto E6 quanto E7 comprometem os mecanismos de controle do ciclo celular, conduzindo os queratinócitos em diferenciação a

uma proliferação descontrolada (ZUR HAUSEN, 2002; WOODMAN; COLLINS; YOUNG, 2007). Adicionalmente, a proteína E5 suporta a malignização das células infectadas induzindo uma hiperproliferação e inibindo a apoptose celular (VENUTI et al., 2011). O resultado de uma infecção crônica pelo PV, portanto, é uma proliferação celular descontrolada e o acúmulo de danos genéticos que predisõem a malignização das células e o desenvolvimento de tumores.

A medida que os queratinócitos migram em direção à camada apical do epitélio a atuação transformante do PV se intensifica e a progressão da diferenciação celular estimula novos eventos. O estágio final do ciclo viral caracteriza-se pelo alto nível de expressão da proteína E4 e das proteínas estruturais L1 e L2, todas corroborando para a formação dos vírions e sua posterior liberação (figuras 3). A proteína E4 atua nesse sentido ao promover o rompimento do citoesqueleto citoplasmático e dos filamentos de queratina (DOORBAR et al., 2012). As proteínas L1 e L2 superexpressas no citoplasma das células infectadas são dirigidas até o núcleo para encapsidação do genoma viral e automontagem dos vírions. Estas partículas são liberadas, portanto, pelo processo normal de descamação, sem a ocorrência de lise celular (FLORIN et al., 2002).

Recentemente, tem sido proposta a hipótese de que a formação das lesões pelo PV tem início com a infecção de células-tronco basais, ao contrário da proposta infecção de queratinócitos basais (DOORBAR et al., 2012). Essa concepção fundamenta-se na persistência de lesões por longos períodos e nas observações indicativas de latência viral. O período de latência viral tem sido invocado para justificar os estágios de transiência na detecção de genoma viral em indivíduos com detecção prévia comprovada (GRAVITT, 2011; FREITAS et al., 2013). A latência do PV seria caracterizada por um estágio de expressão proteica significativamente diminuído e manutenção do epissomo viral restrita às camadas basais do epitélio, onde as células infectadas aparentemente permanecem controladas por uma memória imunológica responsiva. Fatores capazes de suprimir o sistema imune, no entanto, causariam a reativação viral. Isso tem sido suportado por modelos animais (MAGLENNON; MCINTOSH; DOORBAR, 2011, 2014) e por achados em pacientes imunossuprimidos infectados pelo HPV (SCHMOOK et al., 2003).

2.1.3 A carcinogênese pelo HPV e BPV

A atuação do PV na carcinogênese é largamente investigada e melhor compreendida para o HPV e câncer cervical. Embora os eventos moleculares descritos a seguir possam ser aplicados a outros cânceres humanos e animais associados aos PVs, os detalhes moleculares variam entre os diferentes tipos de PVs e mesmo entre os cânceres humanos induzidos pelo HPV. Nesse sentido, considerando que o BPV tem sido largamente explorado como modelo experimental *in vivo* para a carcinogênese pelo PV (CAMPO, 2006), é oportuno estabelecer um paralelo entre os processos carcinogênicos do HPV e BPV.

O câncer cervical é caracterizado por fases progressivas bem definidas, classificadas em neoplasia intraepitelial cervical (NIC) do tipo 1 ao 3, a partir de critérios cito e histológicos e com base no aspecto morfológico atípico (displásico) e progressivo das células epiteliais (WOODMAN; COLLINS; YOUNG, 2007; MOSCICKI et al., 2012). Aceita-se, atualmente, que os níveis de expressão das proteínas E6 e E7 aumentam com a progressão das lesões, estando diretamente relacionada ao fenótipo neoplásico das lesões cervicais (DOORBAR et al., 2012).

As proteínas E6 quanto E7 apresentam propriedades oncogênicas por perturbarem os mecanismos de controle do ciclo celular e conduzirem os queratinócitos em diferenciação a um estágio de proliferação descontrolada. A oncogenicidade dessas proteínas é explicada através de dois modelos de interações com proteínas supressoras de tumor, nos quais a proteína E6 interage com a proteína p53 e E7 se liga à proteína pRB, inativando e degradando tais supressores (DYSON et al., 1989; WERNESS; LEVINE; HOWLEY, 1990). A degradação de p53 por E6 inibe a capacidade celular de reparar danos ao DNA (aumento a frequência de rearranjos, mutações e aneuploidias) ao mesmo tempo que impede a entrada da célula em apoptose. Por sua vez, a interferência na correta atuação da proteína pRB conduz ao estímulo inadequado da progressão do ciclo celular das células infectadas (VOUSDEN, 1993). Salienta-se, contudo, que esses mecanismos envolvendo as proteínas E6 e E7 são apenas a base geral para a investigação e compreensão de outros eventos implicados no desenvolvimento carcinogênico pelo PV (ZUR HAUSEN, 2002).

Embora algumas evidências demonstrem que modificações hormonais (DE VILLIERS, 2003; GARIGLIO et al., 2009) e epigenéticas (DING et al., 2009) podem provocar a desregulação na expressão desses oncogenes virais, a integração do epissomo viral

no genoma da célula infectada é, sem dúvida, o evento molecular melhor associado a esse cenário. Nas lesões cervicais de alto grau e câncer, o DNA episossomal do HPV apresenta-se integrado ao cromossomo do hospedeiro devido a uma quebra na região entre E1/E2, com consequente perda destes genes (figura 4) (WOODMAN; COLLINS; YOUNG, 2007). Isso resulta no aumento da estabilidade dos transcritos virais, descontrole da expressão dos oncogenes E6 e E7 - uma vez que E2 atua inibindo a transcrição dos mesmos - e consequente malignização dos tumores (DOORBAR et al., 2012). Ainda que a integração do DNA viral esteja associada a progressão maligna das lesões até cânceres invasivos, não está claro se este evento é crucial para a carcinogênese cervical (WOODMAN; COLLINS; YOUNG, 2007). Neste ponto, faz-se uma importante distinção entre a carcinogênese pelo HPV e pelo BPV. Diferentemente do que se observa para o HPV e para a carcinogênese cervical, o genoma do BPV é permanentemente mantido na forma episossomal nos diferentes tipos de cânceres induzidos em bovinos e equinos (CAMPO, 2002; NASIR; CAMPO, 2008; BOCANETI et al., 2016).

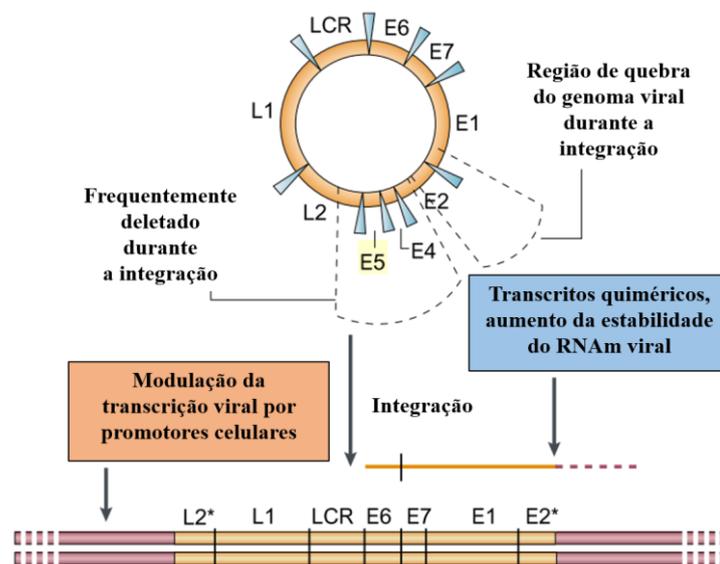


Figura 4. Integração do DNA do HPV no genoma da célula hospedeira. A quebra do genoma viral, geralmente dentro da ORF E2, promove a perda completa ou parcial (ORFs parciais estão representadas com asteriscos) de regiões adjacentes que incluem as ORFs E4, E5 e L2. Tal evento predispõe a recombinação do DNA viral em sítios frágeis do genoma das células infectadas. A síntese de transcritos virais passa a ser regulada por promotores celulares que flanqueiam a região onde o DNA viral se integra. A quebra da ORF E2 favorece a superexpressão dos genes E6 e E7, uma vez que a proteína E2 atua como um inibidor transcricional dos genes precoces. A desregulação da expressão viral é potencializada pelo aumento na estabilidade dos RNAm virais quiméricos produzidos após integração. Fonte: adaptado de zur Hausen, 2002.

Um segundo paralelo importante entre a carcinogênese pelo HPV e BPV está relacionado à atuação dos oncogenes virais durante o processo. Para as infecções pelo HPV, é comumente aceito que a proteína E5 desempenha um papel de menor protagonismo na transformação celular quando comparado com E6 e E7. Para o BPV, no entanto, E5 representa a principal oncoproteína viral, atuando de maneira preponderante tanto na transformação celular, via interação direta com o receptor do fator de crescimento plaquetário (*Platelet Derived Growth Factor Receptor β* , PDGF β -R), como na evasão viral do sistema imunológico, devido a supressão do complexo principal de histocompatibilidade de classe I (*Major Histocompatibility Complex class I*, MHC-I) (VENUTI et al., 2011), enquanto E6 e E7 são caracterizadas como coadjuvantes no processo (CAMPO, 2006; NASIR; CAMPO, 2008). Isso tem estimulado a investigação de E5 na carcinogênese pelo HPV e um número crescente de evidências tem sugerido que sua atuação é mais importante do que acredita-se (VENUTI et al., 2011). Esta proteína tem sido implicada na ativação desregulada do crescimento, diferenciação e divisão celular, bem como na inibição de supressores de tumor (HWANG; NOTTOLI; DIMAIO, 1995; DIMAIO; MATTOON, 2001; TSAI; CHEN, 2003; VENUTI et al., 2011) durante os estágios iniciais da transformação celular, mas seu papel não parece ser relevante para manutenção da neoplasia maligna das células infectadas visto que a deleção do gene E5 já foi relatada em casos de câncer cervical (DIMAIO; MATTOON, 2001; ZUR HAUSEN, 2002).

O último e interessante paralelo que a carcinogênese pelo BPV demonstra é a existência de cofatores relevantes na carcinogênese pelo PV. Tanto estudos de campo (OLSON et al., 1959) como infecções experimentais (CAMPO et al., 1992) demonstram que cofatores ambientais ou genéticos são necessários para que as lesões induzidas pelo BPV progridam até cânceres de células escamosas (figura 5). A samambaia (*Pteridium aquilinum*) tem sido identificada como principal cofator ambiental na carcinogênese induzida pelo BPV no gado (CAMPO; JARRETT, 1986; CAMPO, 2006). Diferentes agentes imunossupressores têm sido caracterizados na samambaia e a ingestão de brotos dessa planta causa duas marcantes alterações hematológicas nos animais: acentuada diminuição dos leucócitos polimorfonucleares e uma crônica queda no número de linfócitos circulantes (GAUKROGER et al., 1993; CONNOLLY et al., 1998; BENISTON et al., 2001; CAMPO, 2006). Adicionalmente, animais alimentados a base de brotos de samambaia desenvolvem elevadas anormalidade cromossômicas pela ação de agentes mutagênicos presentes nessa planta

(LEAL et al., 2003). Foi demonstrado que a ingestão crônica de samambaia associada a infecção persistente pelo BPV constitui a causa da hematúria enzoótica (HE) crônica, do câncer de bexiga urinário e do trato gastrointestinal (GI) em bovinos (CAMPO, 2006). Em animais imunocompetentes (não alimentados com samambaia), os papilomas causados pelo BPV nesses sítios corpóreos são poucos e regridem dentro de 12 meses. Essas observações conduziram, posteriormente, a identificação de cofatores ambientais (como por exemplo tabagismo, uso de contraceptivos e paridade) (IARC WORKING GROUP, 2005) e genéticos (DE FREITAS et al., 2012a) relevantes também para a carcinogênese cervical pelo HPV.

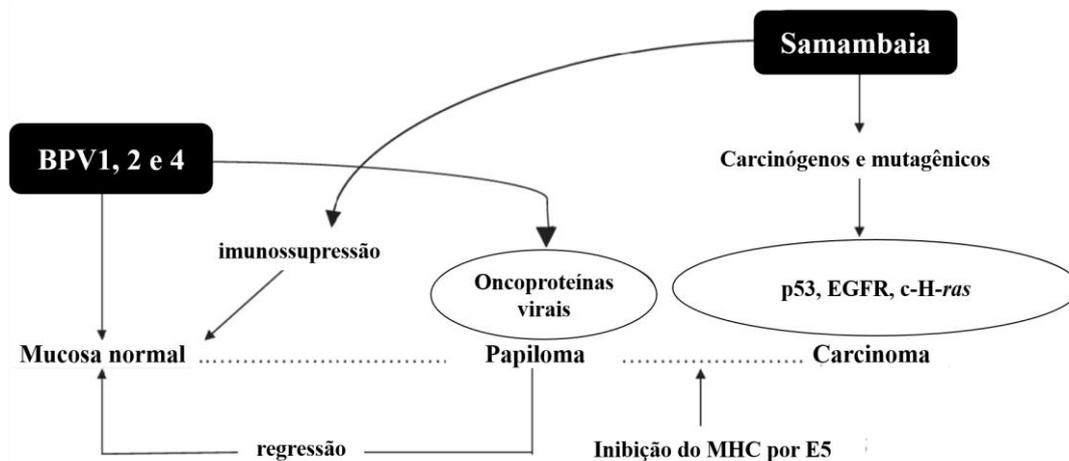


Figura 5. A carcinogênese pelo BPV. Diagrama esquemático representando o processo carcinogênico envolvido na progressão neoplásica de papilomas na bexiga causados pelos BPV1 e 2, e no trato GI pelo BPV4. A associação entre a infecção viral e a ingestão de samambaia é fundamental, visto que os papilomas causados pelos BPV1, 2 e 4 regridem naturalmente em animais imunocompetentes. Sob a ação dos agentes imunossupressores e carcinogênicos presentes na samambaia, no entanto, as lesões papilomatosas progridem até câncer, através de diferentes mecanismos moleculares (por exemplo, mutação em p53, superativação do receptor EGF e da via c-H-ras). Fonte: adaptado de Borzachiello; Roperto, 2008.

2.1.4 Epidemiologia do câncer cervical

Apesar da infecção pelo HPV estar relacionada ao desenvolvimento de outras doenças coletivamente conhecidas como papilomatose humana (verrugas dérmicas, condiloma acuminado e papilomatose respiratória, além de cânceres anogenital, de cabeça e pescoço) (SYRJÄNEN, 2010b; BRUNI et al., 2015a), o câncer cervical é sem dúvida o mais grave acometimento deste vírus em termos de saúde pública. Estimativas de 2012 indicam que mais

de 520.000 mulheres desenvolvem câncer de cérvix uterina anualmente e 265.000 irão a óbito em decorrência dessa doença. Na população feminina, o câncer cervical representa o quarto tipo de câncer mais comumente diagnosticado, representando 7,5% das mortes por câncer em mulheres (FERLAY et al., 2014).

Estima-se que 15% da população feminina mundial seja afetada pelo câncer de colo uterino, sendo observadas as maiores taxas de incidência na África e América Latina (figura 6), enquanto a Índia apresenta o maior número de casos (20%) (BRUNI et al., 2015a). Nesse interim, é característica a discrepância entre as taxas de incidência relatadas pelos países desenvolvidos e em desenvolvimento. No mundo desenvolvido, o câncer cervical representa apenas o décimo primeiro tipo de câncer mais comum e a sexta maior causa de morte por câncer na população em geral, enquanto nos países em desenvolvimento é o segundo para ambas as estatísticas (FERLAY et al., 2014). Quase 90% dos óbitos ocorrem nos países em desenvolvimento, onde os programas de controle e prevenção do câncer cervical são ineficazes ou inexistentes (figura 6) (BRUNI et al., 2015a). Nos países desenvolvidos, a sobrevida média estimada em cinco anos varia de 51% a 66%; nos países em desenvolvimento, onde os casos são encontrados em estados relativamente avançados, a sobrevida média é menor, cerca de 40% após cinco anos; a média mundial é estimada em 49% (MINISTÉRIO DA SAÚDE/INCA, 2009).

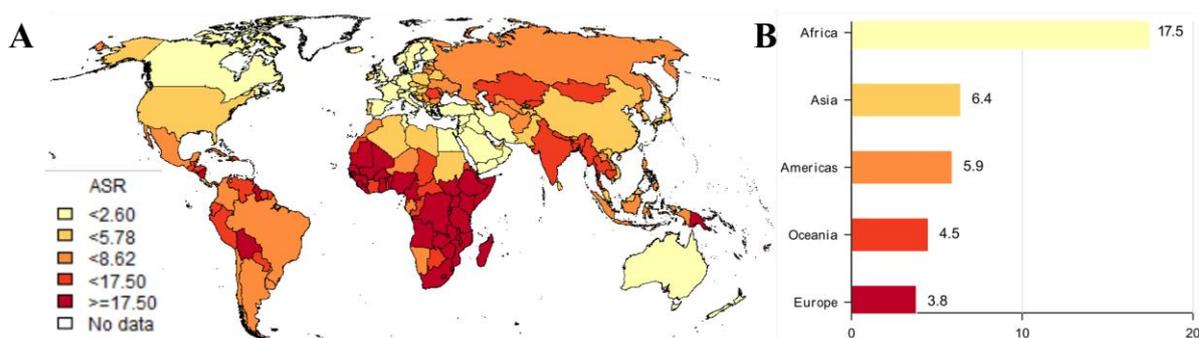


Figura 6. Mortalidade mundial pelo câncer cervical. (A) Taxa de mortalidade anual do câncer cervical (a cada 100,000 mulheres), padronizada por idade (ASR, *age-standardized incidence rates*). (B) Taxa de mortalidade anual pelo câncer cervical por continente (a cada 100,000). Fonte: adaptado de Bruni et al., 2015.

As estimativas brasileiras seguem a tendência dos países em desenvolvimento, mas significativos avanços foram alcançados. Desde 1995, observa-se uma diminuição na

incidência do câncer de colo uterino no país (figura 7A). Atualmente, o Brasil apresenta uma incidência de 16,3 casos (para cada 100.000 habitantes) de câncer cervical (padronizado por idade), o que representa a segunda menor incidência registrada na América do Sul (o Chile possui a menor taxa de incidência, 12,8 casos) (BRUNI et al., 2015b) (figura 7C). Dada a dimensão continental do país, isso representa 41% dos 45.005 casos estimados para a América do Sul (BRUNI et al., 2015a). Para 2012, foram estimados cerca de 18 mil novos casos de câncer do cólo do útero, representando o segundo tipo de câncer mais comum em mulheres com exceção aos tumores de pele não melanoma (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2011). A incidência de câncer cervical evidencia-se a partir da faixa etária de 20-29 anos e o risco aumenta rapidamente até atingir seu pico etário entre 45-55 anos (figura 7D) (BRUNI et al., 2015b).

Ainda que o país tenha avançado na prevenção do câncer cervical, tal evolução se deu de maneira desigual. À exceção dos tumores de pele não melanoma, o câncer de colo uterino continua sendo o mais incidente na Região Norte (24 casos), o segundo mais incidente nas Regiões Centro-Oeste (28 casos) e Nordeste (18 casos), o terceiro na Região Sudeste (15 casos) e o quarto mais incidente na Região Sul (14 casos) (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2011). Segundo o INCA, os estados do Mato Grosso do Sul (35 casos), Amazonas (34 casos) e Mato Grosso (33 casos) lideram as estatísticas de incidência, com taxas equiparáveis aquelas relatadas em Suriname (38 casos, terceira maior incidência nas Américas) ou nos países da África Oriental (42 casos, maiores taxas do mundo) (figura 7B) (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2011; BRUNI et al., 2015a). Em comparação com as estimativas de 2008 (MINISTÉRIO DA SAÚDE/INCA, 2009), Pernambuco apresentou uma melhora nos *rankings* nacional e regional, apresentando a décima primeira maior incidência do país (20 casos) e a quarta maior incidência no Nordeste. Acompanhando a melhora estadual, a taxa relatada na capital Recife, que durante a década de 1980 era a maior do mundo (83,2 casos) (NETO, 1991), atualmente é a décima sexta maior do país (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2011).

Quanto à prevalência dos genótipos, os levantamentos epidemiológicos demonstram que o HPV16 é responsável por 50-60% dos casos mundiais de câncer de colo uterino. O segundo genótipo mais prevalente é o HPV18, estando presente em 10% dos cânceres cervicais relatados no mundo, enquanto os genótipos -31, -33, -35, -45, -52 e -58 contribuem

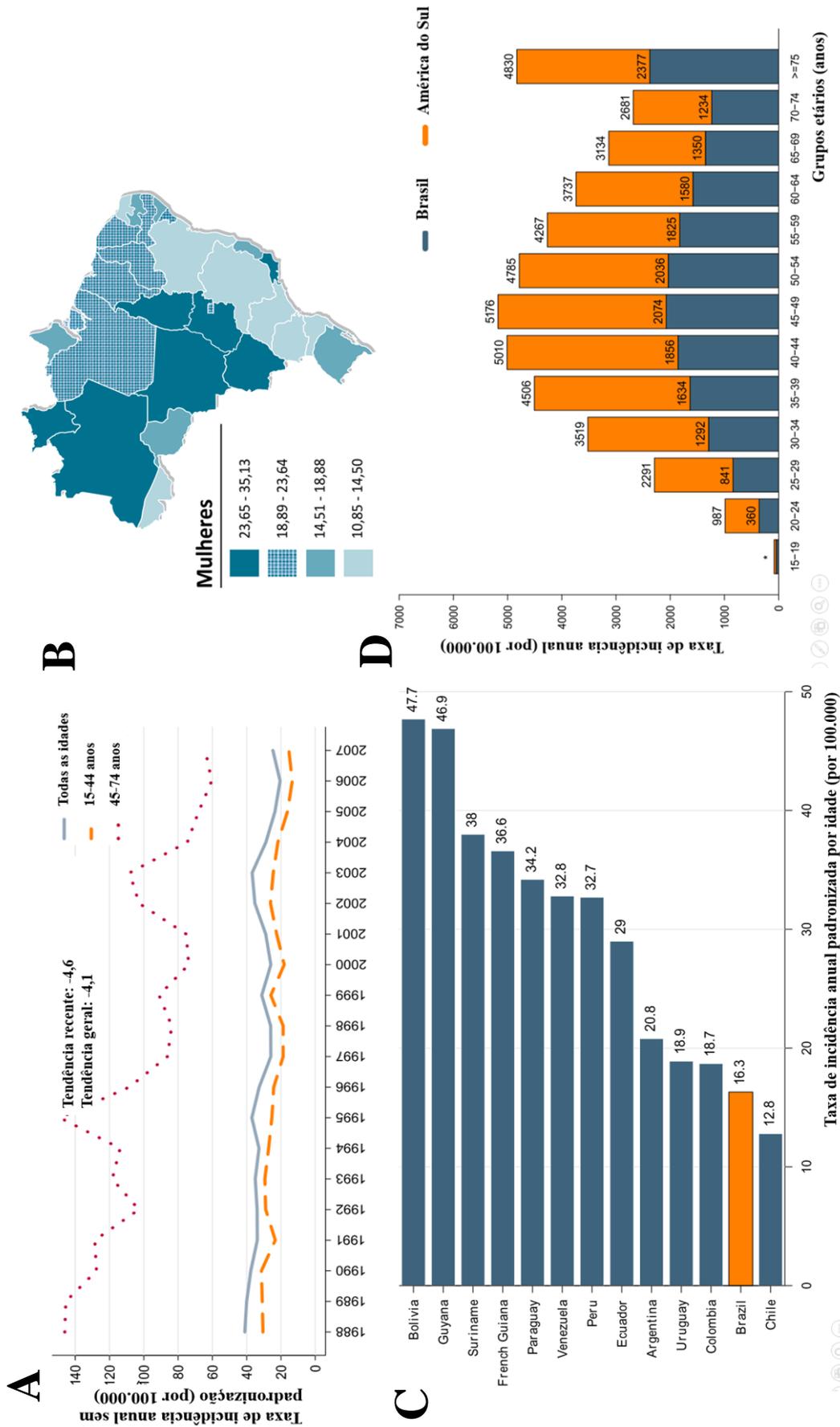


Figura 7. A incidência do câncer cervical no Brasil. (A) Gráfico demonstrando a tendência temporal (1989-2007) da incidência bruta do câncer cervical no Brasil. (B) Representação espacial das taxas brutas de incidência do câncer cervical (por 100 mil mulheres) no Brasil. (C) Comparação entre as incidências relatadas na América do Sul. O Chile e o Brasil possuem as menores taxas do subcontinente. (D) Comparação entre as incidências de novos casos de câncer cervical (por faixa etária) entre as taxas brasileiras e da América do Sul. Fonte: adaptado de Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2011;

com 20% das lesões cancerosas do colo uterino adicionais (IARC WORKING GROUP, 2005; BRUNI et al., 2015a).

2.1.5 Epidemiologia da papilomatose animal pelo BPV

Ao contrário da papilomatose humana, no entanto, a verdadeira extensão da patogênese pelo BPV, bem como suas implicações econômicas à criação do gado, é difícil de determinar porque sua epidemiologia é escassamente reconhecida. Inicialmente isolado em equinos (BRAVO; DE SANJOSÉ; GOTTSCHLING, 2010), o BPV passou a ser largamente caracterizado como agente etiológico de papilomas em bovinos. Diferentes linhas de evidências, detalhadamente discutidas por Freitas et al., (2011), demonstram que o BPV é o único PV capaz de transpassar a barreira da especificidade pelo hospedeiro e infectar bovinos, espécies proximamente relacionadas (como búfalos e girafas) e espécies não relacionadas (além de equinos, antas, antílopes, bisões e felinos). O BPV é tido, portanto, como um *playground* para estudos de evolução e carcinogênese na família *Papillomaviridae*.

Vários relatos da incidência do BPV tem sido feitos em regiões geograficamente distantes mas onde existe grande densidade de espécies ruminantes, como Itália, Reino Unido, Alemanha, Japão, Índia, Estados Unidos e Brasil (CAMPO, 1995; LIOI et al., 2004; OGAWA et al., 2004; SINGH; SOMVANSHI; TIWARI, 2009; SCHMITT; FIEDLER; MÜLLER, 2010; CARVALHO et al., 2012). Atualmente, 12 BPVs estão associados com papilomas cutâneos ou fibropapilomas, os quais podem se espalhar por todo o corpo dos bovinos (figura 8) (BOCANETI et al., 2016). A existência de co-infecções com vários tipos de BPVs, seja numa mesma lesão ou não, tem sido comumente relatada no gado (SCHMITT; FIEDLER; MÜLLER, 2010; CARVALHO et al., 2012; BATISTA et al., 2013). Adicionalmente, os BPV1 e 2 são vastamente reconhecidos como agentes etiológicas de sarcóides em equinos (CHAMBERS et al., 2003a; NASIR; CAMPO, 2008).

A principal relevância clínica da papilomatose cutânea em bovinos se dá a partir da infecção pelo BPV6 nos tetos e úberes, a qual frequentemente tende à disseminação de papilomas e fibropapilomas secundários e terciários, causando ulcerações e sangramentos que predispõem o surgimento de infecções bacterianas secundárias e mastite. Infecções pelo BPV nesses sítios corpóreos são mais prolongadas e menos propensas a resolução espontânea,

ainda que as razões para isso sejam desconhecidas (CAMPO, 2006). Inspeções realizadas em abatedouros na Escócia, Estados Unidos e Japão demonstraram que 36%, 25% e 39% das vacas apresentavam, respectivamente, papilomas nas tetas (HATAMA, 2011). A infecção pode se alastrar rapidamente pelo rebanho, como já relatado em 2007 no norte do Japão, quando lesões papilomatosas nos tetos de bovinos se tornaram epidêmicas e acometeram 80% do animais em um intervalo de apenas 4 meses (MAEDA et al., 2007). Em casos severos, os animais são sacrificados (CAMPO, 2006).

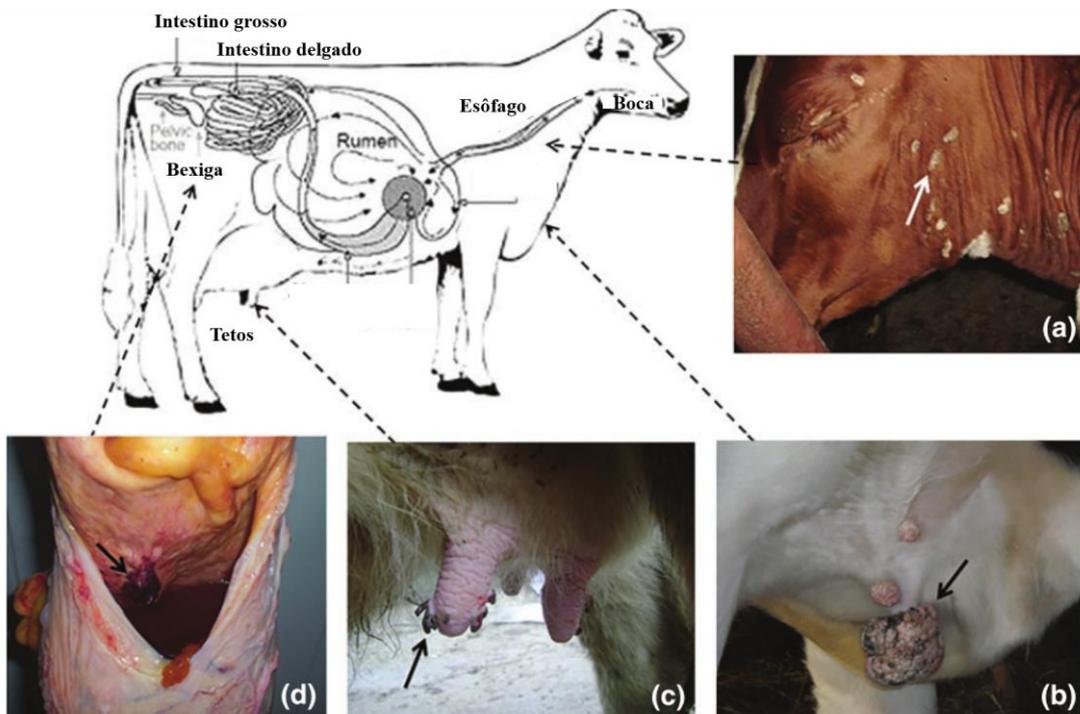


Figura 8. Os tumores induzidos pelo BPV afetam diferentes sítios corpóreos em bovinos. (A) Papilomas esofágicos (seta branca). (B) Papilomas cutâneos (seta preta). (C) Múltiplos papilomas nos tetos (seta preta). Câncer de bexiga (seta preta). Fonte: adaptado de Bocaneti et al., 2016.

Para além de tumores cutâneos benignos, a infecção persistente pelo BPV4, associado a pastagem dos animais em áreas infestadas por samambaia, constitui um risco para o desenvolvimento de carcinoma de mucosas em bovinos, especificamente no trato GI superior e inferior (CAMPO, 2006). Inspeções em abatedouros na Escócia e no norte do Inglaterra relataram a incidência de câncer no trato GI em 19% dos bovinos examinados (JARRETT et al., 1978). No Brasil, tumores de pele e subcutâneos representam o segundo tipo de neoplasia

mais comum em bovinos, sendo os tumores do trato GI o tipo mais comumente encontrado (LUCENA et al., 2011).

O envolvimento da samambaia com as infecções pelo BPV1 e 2 na carcinogênese da bexiga urinária é reconhecido há mais tempo (OLSON et al., 1959). Ambos os tipos de BPVs infectam o epitélio da bexiga urinária e estabelecem uma infecção abortiva (sem produção de vírions), à exemplo do que ocorre para os tumores do trato GI. O câncer pode ter origem mesenquimal ou epitelial, com múltiplos tumores se desenvolvendo no mesmo órgão (BORZACCHIELLO; ROPERTO, 2008). A incidência do câncer de bexiga em bovinos acompanha a distribuição geográfica da samambaia; é elevada nas regiões tropicais e subtropicais, onde há larga distribuição dessa planta e, por consequência, os animais a ingerem cronicamente; é baixa nas áreas onde tal planta está ausente (PAMUKCU; PRICE; BRYAN, 1976). Em bovinos, os tumores de bexiga urinária estão comumente associados a HE em 90% dos animais adultos e já foram registrados na Europa, ilhas Azores, Quênia, Brasil, Nova Zelândia, Índia e China (BORZACCHIELLO; ROPERTO, 2008). Em estudo retrospectivo brasileiro, o câncer de bexiga foi descrito como o quinto mais comumente relatado no gado (LUCENA et al., 2011).

Sendo o único PV capaz de transpor o limite da espécie-especificidade, o BPV estabelece infecções de pele em equinos que se desenvolvem em sarcóides. Trata-se de tumores fibroblásticos de pele locais e invasivos que podem se desenvolver como lesões únicas ou múltiplas em diferentes formas. Apresentam predileção por sítios corpóreos expostos a traumas, raramente regridem (diferentemente dos papilomas equinos) e são comumente refratários a tratamento – de 20 a 50% das lesões se reestabelecem após tratamento cirúrgico (CHAMBERS et al., 2003a; NASIR; CAMPO, 2008). Essas lesões já foram relatadas em cavalos, mulas e jumentos, constituindo o tipo de tumor de pele mais comum em equinos – de 12,9% a 67% de todos os tumores relatados nesses animais (NASIR; CAMPO, 2008). Em cavalos, os sarcóides constituem 35-90% de todas as complicações neoplásicas de pele (GOODRICH et al., 1998) e alguns relatos sugerem uma incidência de 0,6 casos/animal/ano em jumentos (NASIR; CAMPO, 2008). Ainda que alguns estudos sugiram uma prevalência de 1-12% para o sarcóides equino (GOODRICH et al., 1998), à exemplo do que ocorre para a papilomatose bovina, os estudos epidemiológicos são escassos.

Tanto o BPV1, e menos comumente, o BPV2 estão envolvidos com a patogênese do sarcóide equino. Todavia, tem sido demonstrado que sarcóides são causados por variantes

específicas do BPV que infectam e estabelecem tumores preferencialmente em equinos (CHAMBERS et al., 2003b; NASIR et al., 2007). Ainda que não existam relatos sugerindo uma predileção por sexo, o desenvolvimento de sarcóides pelo BPV em equinos costuma acometer animais jovens e estão associados a uma predisposição genética, resumidamente discutida por Nasir & Campo, 2008. Apesar de ser uma condição restrita a pele, frequentemente os animais acometidos por sarcóide são eutanasiados por constituírem um reservatório viral com risco potencial para disseminação. Esse risco é potencializada por evidências demonstrando que moscas são capazes de atuarem como vetores na transmissão de BPV entre cavalos (FINLAY et al., 2009).

2.2 RESPOSTA IMUNE CONTRA O PV E O DESENVOLVIMENTO DE VACINAS

A resposta imune contra o PV é pobre, sobretudo porque o ciclo viral se restringe às camadas acima da membrana basal e sem a ocorrência de lise celular. Isso limita o contato entre antígenos virais e células do sistema imune tipicamente localizadas abaixo da membrana basal. Adicionalmente, diferentes mecanismos de evasão viral tem sido descritos para os PVs, os quais coletivamente inibem a depleção viral pelas células de Langerhans intraepiteliais (BRIEN; CAMPO, 2002; CAMPO; RODEN, 2010). Em conjunto, esses eventos explicam parcialmente a ausência de resposta inflamatória local e persistência dos papilomas. A observação de que altos títulos de anticorpos anti-PVs são obtidos em animais com lesões ulcerativas ou tumores com sangramento suportam essa ideia (CAMPO, 2006) e sugerem que, apesar do fraco reconhecimento das proteínas virais pelo sistema imune do hospedeiro, as proteínas virais são imunogênicas.

A proteção contra as infecções pelo PVs foi relacionada a indução de anticorpos neutralizantes há 50 anos atrás (CHAMBERS; EVANS; WEISER, 1960), mas apenas na década de 1990 ficou esclarecido que a neutralização viral é dirigida por anticorpos contra a proteína capsidial L1 (KIRNBAUER et al., 1996; GHIM et al., 2000). Uma observação chave, no entanto, demonstrou que a transmissão passiva de soro é incapaz de promover a regressão de papilomas estabelecidos, apesar de proteger animais não infectados. Devido a expressão das proteínas L1 e L2 estar restrita às células diferenciadas da camada apical do epitélio, a resposta imune induzida por essas proteínas não tem algum efeito nas células basais

infectadas do epitélio – as quais mantêm a infecção do HPV (SCHILLER; LOWY, 2012). De fato, após as demonstrações iniciais de que infiltrados celulares estavam associados a regressão de papilomas (PARISH, 1961), diferentes trabalhos – detalhadamente discutidos em (NICHOLLS; STANLEY, 2000) - comprovaram que a resolução espontânea das lesões papilomatosas é dependente de uma resposta linfocitária dirigida contra as proteínas precoces do PVs, sobretudo E5, E6 e E7. A obtenção desses achados constituiu o corpo de evidências necessário para o desenvolvimento de diferentes abordagens vacinais contra o PV observado massivamente nas duas últimas décadas.

2.2.1 Vacinas autóloga, heteróloga e baseadas em vírions purificados

A vacinação contra PVs foi inicialmente avaliada na década de 1930 (SHOPE, 1937) em coelhos e teve seus estudos estendidos para bovinos na década de 1950 e 1990 (OLSON; SKIDMORE, 1959; OLSON; SEGRE; SKIDMORE, 1960; JARRETT et al., 1990a). Tais estudos envolveram a inoculação de extratos de verrugas no animal de origem (vacinação autóloga) e em animais diferentes (vacinação heteróloga), e demonstraram que as vacinas investigadas eram mais eficientes do que a infecção natural para promover tanto proteção contra novas lesões como a regressão daquelas pré-existentes. Adicionalmente, Jarrett et al. (1990a), empregando vírions purificados pela primeira vez, demonstraram que os anticorpos neutralizantes produzidos no soro dos animais vacinados (CHRISTENSEN; KREIDER, 1990; JARRETT et al., 1990a) eram tipo específicos – animais imunizados contra o BPV6 não eram imunes ao seu homólogo BPV1 (JARRETT et al., 1990b).

No entanto, a observação de que o emprego de PVs “vivos” constitui um risco para o desenvolvimento de neoplasias (BREGMAN et al., 1987; NICHOLLS; STANLEY, 2000), associada à complexidade em mimetizar a diferenciação do epitélio estratificado em cultura de células para produção de partículas virais com fins vacinais, (PYEON; LAMBERT; AHLQUIST, 2005) – constituíram fatores limitantes para as referidas estratégias vacinais.

2.2.2 Vacinas recombinantes baseadas nas proteínas L1 e L2

A imunização de animais com versões recombinantes das proteínas L1 e L2, produzidas em bactérias e obtidas na forma de fusões com outras proteínas, como beta-galactosidase, glutathione-S-transferase e trpE, sob condições desnaturantes, demonstrou a existência de epitopos neutralizantes nas proteínas capsidiais, ainda que os títulos de anticorpos produzidos tenham sido baixos (JARRETT et al., 1991; LIN et al., 1992; CAMPO et al., 1993). A importância da estrutura terciária da proteína L1 na geração de epitopos conformacionais foi esclarecida por Lin et al. (1993), que demonstraram a ausência de qualquer resposta protetora quando subfragmentos e versões desnaturadas de L1 foram empregadas para imunização. Posteriormente, diferentes trabalhos demonstraram que, quando produzida em *Escherichia coli*, a proteína L1 espontaneamente forma estruturas pentaméricas (CHEN et al., 2000, 2001) - os quais apresentam epitopos conformacionais e são denominadas capsômeros (figura 9B) – capazes de induzir altos títulos de anticorpos neutralizantes e proteger animais imunizados (YUAN et al., 2001). Interessantemente e ao contrário do que se observa para outros PVs, a proteína L2 de BPV2 é capaz de promover a regressão de tumores quando administrada profilaticamente ou após desafio experimental. Além disso, os títulos de anticorpos neutralizantes induzidos contra L2 são significativamente menores do que aqueles observados para L1 (JARRETT et al., 1991).

2.2.3 Vacinas baseadas em partículas semelhantes ao vírus (VLPs)

Kirnbauer et al. (1992 e 1993) demonstraram pioneiramente que partículas semelhantes ao vírus (*virus-like particles*, VLPs) podem ser obtidas a partir da superexpressão da proteína L1 e da coexpressão de ambas as proteínas L1 e L2 em células de inseto e leveduras. Tais partículas são espontaneamente montadas pela associação de 72 capsômeros de L1 (e 72 cópias de L2, quando esta proteína é coexpressa) em células eucarióticas e não apresentam genoma viral, sendo estrutural e antigenicamente semelhantes aos vírions (figura 9) (SCHILLER; LOWY, 2000; SCHILLER; MÜLLER, 2015). A eficiência de vacinas baseadas em VLPs de PVs foi inicialmente validada em bovinos e coelhos, atingindo quase 100% de proteção mesmo com partículas baseadas apenas em L1 (CHRISTENSEN et al.,

1996; KIRNBAUER et al., 1996), e posteriormente em caninos (SUZICH et al., 1995). Esses trabalhos, portanto, constituem a base de evidências para o desenvolvimento das atuais vacinas anti-HPV.

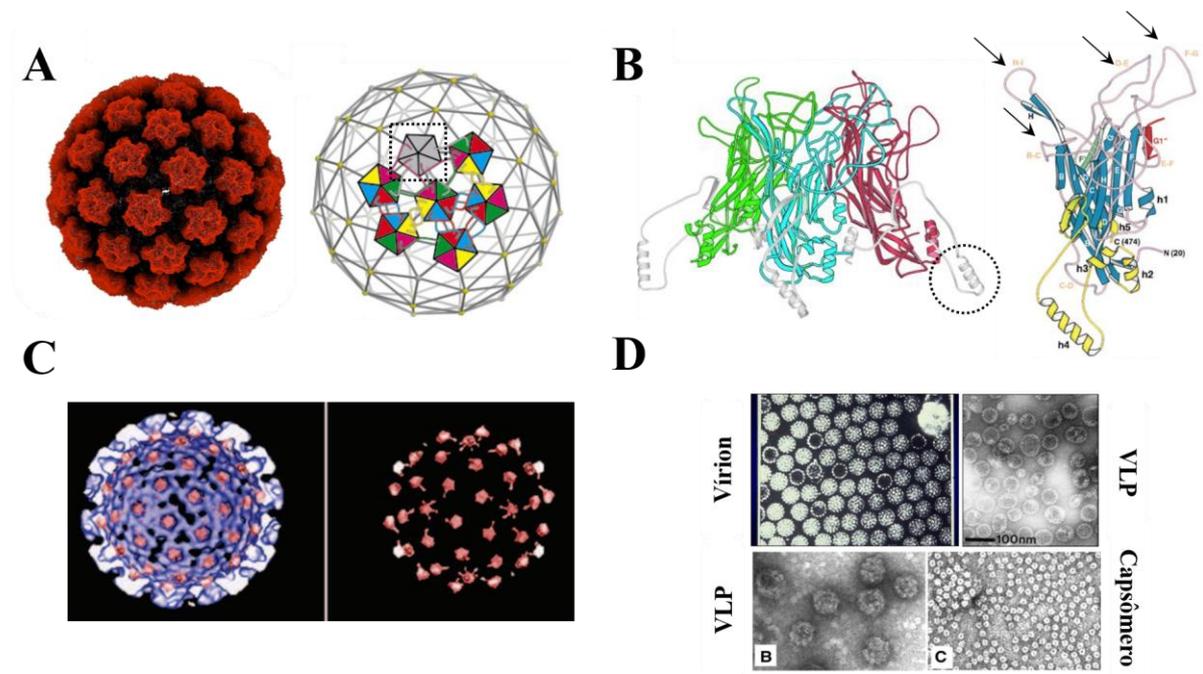


Figura 9. Caracterização estrutural dos vírions, VLPs e capsômeros do PV. **(A)** A partícula viral e as VLPs do PV são formadas por um capsídeo icosaédrico não envelopado, com diâmetro entre 55-60 nanômetros, resultante da associação entre capsômeros da proteína L1 (losangos coloridos). **(B)** A associação entre os capsômeros é mediada por uma α -hélice C-terminal da proteína L1, denominada h4 (círculo preto pontead). **(C)** Nos vírions (ou quando coexpressa com L1), cada molécula da proteína L2 produzida (em vermelho) se associa com um capsômero (em azul), totalizando 72 cópias de L2 por partícula viral ou VLP. **(D)** As VLPs - sejam apenas de L1 quanto aquelas baseadas em ambas as proteínas capsidiais L1 e L2 - são morfologicamente idênticas aos vírions nativos, apresentando epitopos conformacionais reconhecíveis pelos anticorpos neutralizantes. Uma vez que tais epitopos localizam-se nas regiões de *loops* dos monômeros de L1 **(B)**, setas pretas), tais estruturas também são apresentadas pelos capsômeros (20 nm), porém em menor quantidade quando comparada às VLPs **(D)**. Fonte: adaptado de Chen et al. (2000); Buck et al. (2008).

2.2.4 Vacinas baseadas em VLPs contra o HPV

Desde 2006, duas vacinas baseadas em VLPs do HPV estão mundialmente licenciadas para uso e constituem as primeiras abordagens vacinais a serem desenvolvidas para proteção contra DSTs causadas por vírus que infectam o trato anogenital. A vacina bivalente Cervarix[®], fabricada pela GlaxoSmithKline (GSK, Bélgica), contém VLPs dos HPV16 e

HPV18 produzidas a partir de células de inseto *Trichoplusia ni Hi5* infectadas com baculovírus recombinante expressando L1. A vacina quadrivalente Gardasil[®], fabricada pela Merck & Co. Inc. (Estados Unidos), contém VLPs dos HPV6 e HPV11 – responsáveis pela maioria das verrugas genitais - em adição às VLPs dos HPV16 e HPV18, sendo todas produzidas a partir de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* recombinantes (INGLIS; SHAW; KOENIG, 2006). Ensaios clínicos para ambas as vacinas demonstraram quase 100% de eficácia na profilaxia contra os genótipos alvo (HARPER et al., 2004; VILLA et al., 2006; SCHILLER et al., 2008) e segurança, não tendo sido relacionada alguma causalidade entre eventuais efeitos adversos sérios e a vacinação (REITER et al., 2009).

Apesar do sucesso descrito, as duas vacinas anti-HPV possuem importantes limitações que restringem tanto suas disponibilidades quanto seus potenciais efeitos em termos de saúde pública. Por basearem-se em VLPs da proteína L1, tais vacinas: (i) apresentam baixo espectro de proteção, pois não possuem atividade terapêutica contra infecções preexistentes nem conferem proteção contra os demais 11 HPVs de alto risco, responsáveis por 30% dos casos de câncer cervical (STANLEY; LOWY; FRAZER, 2006; HILDESHEIM et al., 2007; KUDENCHUK et al., 2007); (ii) demandam elevados custos de fabricação e distribuição por empregarem sistemas eucariotos de expressão e uma cadeia de refrigeração para conservação, respectivamente, o que encarece seu preço final (\$150/dose, sendo necessários três doses para proteção completa) (HAKIM; DINH, 2009; CAMPO; RODEN, 2010; HANSON et al., 2015; SCHILLER; MÜLLER, 2015).

Na tentativa de contornar essas limitações, a Merck teve uma vacina nonavalente recentemente licenciada para proteção contra os HPV31, HPV33, HPV45, HPV52 e HPV58, além dos demais genótipos já contemplados na vacina quadrivalente. Os ensaios clínicos demonstraram os mesmos níveis de eficácia e segurança das atuais vacinas (CANCER DISCOVERY, 2014). Apesar do aumento no espectro de proteção, a nova vacina emprega o mesmo protocolo de obtenção das VLPs em leveduras recombinantes e, portanto, é muito provável que possua a mesma limitação relativa ao preço.

Em conjunto, essas considerações tornam urgente o desenvolvimento de novas estratégias de vacinação contra o HPV com dois principais objetivos: aumento do espectro de proteção (seja contemplando proteção contra genótipos adicionais ou proteção terapêutica) e barateamento dos custos. Tais abordagens são referidas por alguns autores como vacinas de

segunda geração (STANLEY; GISSMANN; NARDELLI-HAEFLIGER, 2008; SCHILLER; MÜLLER, 2015).

2.2.5 Vacinas de segunda geração contra o HPV

Uma segunda geração de vacinas contra o HPV tem sido extensivamente investigada e revisada na literatura (NICHOLLS; STANLEY, 2000; SCHILLER; LOWY, 2000; STANLEY; GISSMANN; NARDELLI-HAEFLIGER, 2008; CAMPO; RODEN, 2010; PADMANABHAN et al., 2010; SU et al., 2010; DE FREITAS et al., 2012b; SCHILLER; MÜLLER, 2015). Os trabalhos envolvem esforços tanto do setor acadêmico quanto da indústria farmacêutica, concentrados, sobretudo, nos países em desenvolvimento. Tais estratégias podem ser subdivididas em quatro categorias: (i) vacinas baseadas em proteínas ou subunidades (ii) vacinas baseadas em peptídeos purificados; (iii) vacinas baseadas em vetores microbianos e (iv) vacinas baseadas em DNA.

2.2.6 Vacinas de segunda geração baseadas em subunidades da proteína L1

As abordagens mais atrativas nesse contexto baseiam-se no desenvolvimento de sistemas recombinantes de expressão de baixo custo para produção de VLPs, bem como no emprego de capsômeros de L1 como imunógenos. Diferentes hospedeiros vêm sendo empregados como plataformas vacinais de baixo custo para produção de VLPs, mas especial atenção tem sido investida em *E. coli* (HU et al., 2014) e na levedura metilotrófica *Pichia pastoris* (BAZAN et al., 2009; HANUMANTHA RAO et al., 2011), tanto a partir de ensaios pré-clínicos quanto clínicos (SCHILLER; MÜLLER, 2015).

Em comparação com as VLPs, todavia, os capsômeros de L1 são termoestáveis e têm o potencial de descartar a necessidade de refrigeração das vacinas (STANLEY; GISSMANN; NARDELLI-HAEFLIGER, 2008), diminuindo sensivelmente os custos de fabricação e distribuição. Uma importante preocupação, contudo, é que a resposta imune induzida por capsômeros é de menor duração quando comparada às VLPs (THÖNES et al., 2008). Embora isso tenha desestimulado a realização de ensaios clínicos por algum tempo, inovadoras e

interessantes perspectivas foram recentemente desenvolvidas a partir da produção de capsômeros de HPV16 conjugados à adjuvantes biológicos (subunidade beta da enterotoxina termo estável de *E. coli*) em plantas recombinantes (*Nicotiana tabacum*), direcionando a produção para os cloroplastos (WAHEED et al., 2011). Tal abordagem será avaliada por um consórcio europeu através de ensaios clínicos aprovados recentemente (EUROSTARS, 2015).

2.2.7 Vacinas de segunda geração baseadas na proteína L2

Abordagens vacinais baseadas na proteína capsidial L2 foram detalhadamente revisadas por Stanley; Gissmann; Nardelli-Haeffliger (2008), Campo & Roden (2010) e Schiller & Müller (2015). Embora epitopos neutralizantes presentes em L2 não sejam expostos no vírion livre (DAY et al., 2010), Pastrana et al. (2005) demonstraram, a partir de observações prévias (JARRETT et al., 1991; RODEN et al., 2000), que imunógenos baseados em L2 são capazes de induzir a produção de anticorpos neutralizantes de resposta cruzada contra PVs homólogos e heterólogos. Como a resposta imune não é dependente de estrutura terciária (e sim de epitopos lineares) (RODEN et al., 2000), esse cenário abre perspectiva para o estabelecimento de uma plataforma vacinal a partir de sistemas recombinantes procariotos, visando uma vacina profilática de largo espectro e baixo custo, contra diferentes HPV's genitais e cutâneos.

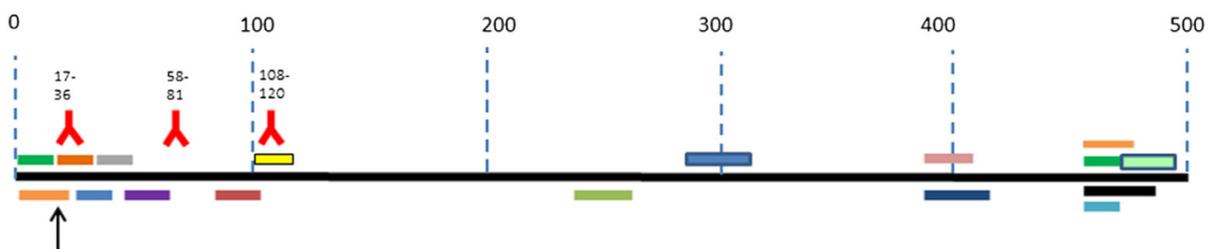


Figura 10. Diagrama ilustrativo da proteína L2 do PV. A proteína L2 apresenta pouco menos de 500 aminoácidos, tendo uma porção N-terminal (resíduos 1-120) altamente conservada entre os diferentes tipos de PV. É justamente nessa porção onde encontram-se os epitopos neutralizantes de resposta cruzada, marcados pelas ilustrações de anticorpos em vermelho. Outras regiões também estão caracterizadas no diagrama, como o domínio de ligação ao DNA viral (retângulo em bege, porção N-terminal) e o domínio de ligação a L1 (retângulo em azul escuro, C-terminal), importantes para formação do vírions nativo, e o sítio de clivagem por furina (seta preta), fundamental para as etapas iniciais de interação com receptores celulares e infecção. Fonte: adaptado de Wang; Roden, 2013.

Dois programas para desenvolvimento de vacinas empregando peptídeos de L2 (HPV) multimerizados, produzidos em *E. coli*, foram desenvolvidos por institutos indiano (Shantha Biotechnics, Hyderabad) e norte-americano (Acambis, Boston) e demonstraram proteção tipo específica e cruzada a partir de desafios realizados em camundongos (JAGU et al., 2013). No entanto, ambos os programas foram interrompidos, muito provavelmente pelos baixos títulos de anticorpos neutralizantes induzidos por L2 quando comparados com VLPs de L1 (RODEN et al., 2000; PASTRANA et al., 2005; JAGU et al., 2013). Assim como ocorre para os capsômeros, portanto, o principal questionamento acerca das vacinas baseadas em L2 diz respeito à duração da resposta induzida.

Na tentativa de contornar a baixa imunogenicidade de L2, VLPs quiméricas – nas quais epitopos de resposta cruzada de L2 são expostos na superfície da proteína L1 de HPV e de proteínas capsidiais de outros vírus (por exemplo, Adenovírus) - vem sendo documentado com sucesso na geração de proteção humoral cruzada a partir do desafio cérvico vaginal em camundongos (NIETO et al., 2012; PINEO; HITZEROTH; RYBICKI, 2013; SCHELLENBACHER et al., 2013). Destaque recente vem sendo dado aos trabalhos de Tumban et al. (2012, 2013, 2015) empregando com sucesso uma vacina baseada em VLPs quiméricas de bacteriófagos em ensaios pré-clínicos. Alternativamente, o emprego de vetores microbianos é atrativo por potencializar a resposta imune contra L2 e fornecer diferentes rotas de entrega dos imunógenos, como a administração oral de *Lactobacillus casei* recombinantes expressando uma porção N-terminal de L2 (YOON et al., 2012).

2.2.8 Vacinas de segunda geração com propriedades profiláticas e terapêuticas

Não há vacinas terapêuticas licenciadas contra o HPV, assim como não há em fases de teste para licenciamento a curto e médio prazo. Apesar de alguma eficácia documentada em ensaio clínico (KENTER et al., 2009), nenhuma abordagem vacinal terapêutica demonstrou eficácia em ensaios clínicos de fase 3 randomizados. Os estudos envolvendo estratégias vacinais terapêuticas têm focado na geração de resposta imune mediada por células, sobretudo linfócitos T CD8, contra as proteínas virais expressas ao longo do epitélio, particularmente as Oncoproteínas E5, E6 e E7. O detalhamento das principais estratégias terapêuticas exploradas contra o HPV foi revisado por Schiller & Lowy (2000), Stanley; Gissmann; Nardelli-

Haefliger (2008) e, mais recentemente, por Su et al. (2010) e Venuti et al. (2011). De acordo com Schiller & Müller (2015), as justificativas para o insucesso no estabelecimento de uma vacina terapêutica contra o HPV incluem limitações nos modelos animais utilizados, geração de moderada resposta imune celular nos ensaios clínicos e direcionamento das vacinas para lesões cervicais de alto grau e cânceres que já desenvolveram mecanismos de evasão imunológica.

Diante do exposto, as abordagens melhor caracterizadas consistem na geração de proteínas quiméricas com propriedades profilático-terapêuticas. Um conjunto de trabalhos revisado por Schiller; Lowy (2000) incorporaram epitopos de E6 e E7 fusionados a L1 e L2 para geração de VLPs quiméricas capazes de induzir altos títulos de anticorpos neutralizantes e regressão de lesões estabelecidas mediante ativação de linfócitos T CD4 e CD8. Infelizmente, tais VLPs quiméricas demonstraram baixa imunogenicidade para as doses de reforço (*boosting*), de maneira que os ensaios clínicos obtidos não foram suficientemente encorajadores para a companhia Medigene (Alemanha) continuar o seu programa de desenvolvimento. Outros estudos exploraram a fusão de L2 com E7 e de L2 com E6 e E7, em vacinas denominadas TA-GW e TA-CIN, respectivamente, sendo ambos os imunógenos produzidos em *E. coli* (SU et al., 2010; SCHILLER; MÜLLER, 2015). Ambas as abordagens foram avaliadas com relativo sucesso na indução de resposta celular (LACEY et al., 1999; DAAYANA et al., 2010), mas não existem relatos sobre novos ensaios clínicos a partir de tais vacinas.

2.2.9 Vacinas contra o BPV

Não há vacina licenciada contra o BPV atualmente, apesar do seu emprego como modelo animal nos pioneiros estudos de vacinação contra o PV. Como previamente mencionado, diferentes abordagens vacinais contra o BPV, tanto profiláticas quanto terapêuticas, já demonstraram níveis de sucesso similares às aquelas relacionadas ao HPV (CAMPO, 2002, 2006; BORZACCHIELLO; ROPERTO, 2008; BOCANETI et al., 2016), de maneira que o principal impeditivo para a comercialização de uma vacina contra a papilomatose animal parece estar relacionado a restrições de mercado.

Como a maioria das infecções pelo BPV não resulta em tumores e cânceres, e considerando um contexto de extensas criações de gado, especula-se que os criadores estariam mais propensos a investir em vacinas terapêuticas para combate à papilomatose bovina e equina, isto é, ao tratamento das lesões e não ao vírus. Nesse sentido, uma vacina profilático-terapêutica baseada em VLPs quiméricas do BPV1 foi avaliada contra o sarcóide equino, tanto em ensaios pré-clínicos (ASHRAFI et al., 2008) quanto clínicos de fase I (MATTL-FRITZ et al., 2008). O principal gargalo dessa estratégia, no entanto, é que a resposta terapêutica induzida contra a proteína E7 é fraca, muito provavelmente por não se tratar da principal oncoproteína viral para o BPV (ASHRAFI et al., 2008) – a vacina foi desenvolvida com base em VLPs quiméricas do HPV.

2.3 SISTEMAS DE EXPRESSÃO HETERÓLOGA PARA PRODUÇÃO DE IMUNÓGENOS DO PAPILOMAVÍRUS

O domínio da propriedade intelectual relacionada à tecnologia das atuais vacinas anti-HPV, exclusivamente licenciado a Merck e GSK nos países desenvolvidos e em desenvolvimento de renda média, restringe o desenvolvimento de vacinas similares (isto é, baseadas em VLPs de L1 dos genótipos contemplados, obtidas a partir das mesmas plataformas vacinais) por outras companhias. Isso tem estimulado, todavia, o desenvolvimento de novas plataformas vacinais ou a comercialização de versões genéricas das vacinas anti-HPV, sobretudo nos países em desenvolvimento (PADMANABHAN et al., 2010; SCHILLER; MÜLLER, 2015).

Não há um sistema de expressão heteróloga universalmente aplicável para produção de proteínas recombinantes. Apesar de *E. coli* ter sido largamente utilizada para este propósito nas últimas 4 décadas, a produção de VLPs de HPV a partir deste hospedeiro é limitada e de baixo (EDWARDS et al., 2000). Adicionalmente, a expressão heteróloga em células de mamíferos e plantas é demasiadamente cara e lenta para fins de alto rendimento.

Uma extensa lista de sistemas heterólogos de expressão, empregados com fins vacinais contra a papilomatose humana, bovina e equina, já foi comentada no tópico 2.2. Cada sistema recombinante referido apresenta potencialidades específicas no que tange as estratégias de

obtenção e de administração vacinal. O desafio atual nesse ínterim é estabelecimento de uma plataforma vacinal baseado em um sistema recombinante capaz de produzir, a baixos custos, imunógenos geradores de uma proteção de espectro ampliado contra o HPV e BPV.

2.3.1 Sistemas baseados em *Pichia pastoris*

Em comparação com os demais hospedeiros eucarióticos, como células de mamíferos, de inseto e plantas, as leveduras constituem os hospedeiros mais explorados e caracterizados como sistemas heterólogos de expressão. Estes organismos atingem altas densidades celulares sob crescimento em meios ou condições de cultura simples, representando a melhor relação custo-benefício quando se necessita de versões recombinantes de proteínas produzidas em larga escala (miligramas a gramas) e devidamente modificadas por vias pós traducionais eucarióticas (MACAULEY-PATRICK et al., 2005).

À exemplo dos sistemas procariotos, a manipulação de *P. pastoris* dispõe de ferramentas genéticas e protocolos bem estabelecidos (como genoma sequenciado, diferentes vetores de expressão e transformação por DNA sob elevada taxa de eficiência, por exemplo), aliado a capacidade de crescimento em meio mínimo sob elevadíssima densidade celular (>100 gL⁻¹ de peso seco) (MACAULEY-PATRICK et al., 2005). Adicionalmente, as linhagens de *P. pastoris* empregadas para expressão recombinante apresentam marcantes estabilidade genética para elementos recombinantes e habilidade para realizar modificações proteicas tipicamente observadas em eucariotos superiores (SUNGA; TOLSTORUKOV; CREGG, 2008).

As leveduras do gênero *Pichia*, em conjunto com espécies do gênero *Hansenula*, *Candida*, e *Torulopsis*, são organismos metilotróficos, isto é, capazes de crescer utilizando metanol como única fonte de carbono e energia (GELLISSEN et al., 2005). Essa característica tem sido explorada para produção de proteínas recombinantes, visto que a via de metabolização do metanol em *P. pastoris* é rigidamente regulada por um promotor induzível altamente produtivo, derivado do gene da enzima álcool oxidase (*alcohol oxidase I, AOX1*) (SUNGA; TOLSTORUKOV; CREGG, 2008). O emprego de *P. pastoris* como sistema de expressão heteróloga foi detalhadamente revisado por Daly; Hearn, (2005), Macauley-Patrick et al. (2005) e Ahmad; Hirz; Pichler, (2014). O emprego do sistema/plataforma baseado na via

metanólica de *Pichia* para expressão heteróloga, no entanto, está licenciado a companhia *Research Corporation Technologies (RCT), Inc.*, Tucson, Arizona, o que limita suas aplicações para fins industriais e, em paralelo, tem estimulado o desenvolvimento de plataformas de expressão alternativas (MACAULEY-PATRICK et al., 2005). Dois trabalhos baseados nesta plataforma, já mencionados anteriormente, demonstraram que VLPs de HPV produzidas em *P. pastoris* apresentem adequadamente epitopos conformacionais neutralizantes (BAZAN et al., 2009), sendo capazes de eficientemente imunizar camundongos contra desafios contra pseudovírus relacionados (HANUMANTHA RAO et al., 2011).

Em 2005, de Almeida; de Moraes; Torres isolaram o gene da 3-fosfoglicerato quinase (*phosphoglycerate kinase I, PGK1*) de *P. pastoris* e caracterizaram seu promotor constitutivo. Os autores demonstraram pioneiramente a funcionalidade deste promotor (P_{PGK1}) na expressão recombinante da α -amilase de *Bacillus subtilis* quando as leveduras foram cultivadas na presença de glicose, glicerol e metanol. Recentemente, o emprego do P_{PGK1} também foi avaliado para expressão extracelular da proteína L1 de HPV16 (MARIZ, 2012), sugerindo o potencial desse sistema para estabelecimento de uma plataforma vacinal para produção de VLPs.

2.3.2 Sistemas baseados em *Leishmania tarentolae*

Tripanossomatídeos (membros da família *Trypanosomatidae*) são protozoários unicelulares e uniflagelados representantes de um grupo de eucariontes denominados Kinetoplastídeos (Ordem Kinetoplastida). Tais organismos são caracterizados pela presença de kinetoplasto, uma região rica em DNA extranuclear contida numa única e grande mitocôndria. Membros desse grupo incluem parasitas capazes de colonizar plantas, humanos e animais, sendo de particular interesse a relação desses parasitas com doenças humanas: o *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* e *Leishmania spp.* são, respectivamente os agentes causais da doença de Chagas, doença do sono e leishmanioses cutâneas e viscerais (STUART et al., 2008; WHO, 2010).

O interesse no emprego de Tripanossomatídeos para expressão heteróloga fundamenta-se na ideia de que os baixos níveis de expressão observados em sistemas eucariotos (em comparação aos obtidos nos sistemas procariotos) estão relacionados

principalmente a dois mecanismos: um processo de transcrição lento e finamente regulado pela RNA polimerase II (Pol II) e a acoplagem dessa lenta transcrição com as etapas de processamento do RNA mensageiro (mRNA) (CIRSTEA, 2007). Isso promoveria, em última análise, baixas concentrações de mRNA heterólogo nos sistemas eucarióticos, tanto pela baixa produção quanto pela alta taxa de degradação desses transcritos.

As particularidades inerentes aos mecanismos de regulação da expressão gênica em Tripanossomatídeos oferecem oportunidades para contornar esses gargalos. Particularmente para as espécies de *Leishmania*, diversos estudos sugerem que os cromossomos desses microrganismos são principalmente diploides, embora a aneuploidia também seja relatada (GALINDO; RAMÍREZ OCHOA, 1989). A distribuição de genes não tende a obedecer a clusterização típica de procaríotos, de maneira que é possível observar regiões ricas em agrupamentos de genes sem nenhuma relação funcional (TEIXEIRA, 1998). Outras particularidades se referem à elevada plasticidade cromossômica devido a recorrentes eventos de recombinação nas regiões teloméricas e subteloméricas (WINCKER et al., 1996), e presença de elementos nucleares extracromossomais (epissomos) (DUBESSAY et al., 2001). De suma importância para o contexto de expressão heteróloga nesse organismo é o fato de que *Leishmania* apresenta escassos promotores para a RNA polimerase I (Pol I) e, até o momento, não há relatos de promotores clássicos para a Pol II devidamente caracterizados (CLAYTON, 2002). O início da transcrição nesses organismos, portanto, assume um certo caráter randômico e menos regulado do que nos demais eucariotos, não representando um papel central na regulação da expressão gênica.

A conversão de transcritos imaturos policistrônicos (pré mRNA) em mRNA maduro monocistrônico representa a via de regulação da expressão gênica mais importante para as espécies de *Leishmania* (CLAYTON, 2002). Um conjunto de características genéticas únicas, envolvendo particularidades na edição de RNA e transcrição policistrônica seguida de *trans-splicing*, tem sido descrito para esses organismos. As vias de modificação do mRNA (processamento alternativo e a poliadenilação) alteram a estabilidade dessa molécula e esse mecanismo pode ser regulado pela presença ou conformação de sequências regulatórias não traduzidas (*Untranslated Regions*, UTRs) à jusante e à montante das sequências codificantes (HAILE; PAPADOPOULOU, 2007). Essas características asseguram a esses parasitas uma reprogramação instantânea da expressão gênica, associada existência de duas formas

evolutivas distintas (promastigota e amastigota) prontamente adaptadas às rápidas mudanças no ambiente onde vivem (insetos vetores e hospedeiros mamíferos)(CIRSTEA, 2007).

Ao contrário das Leishmanias de interesse médico, a espécie *Leishmania tarentolae* é um protozoário não patogênico capaz de infectar lagartos do gênero *Gekkonidae* (PAPADOPOULOU; ROY; OUELLETTE, 1994; AZIZI et al., 2009). Inicialmente isolada da espécie *Tarentolae mauritanica*, *L. tarentolae* foi explorada em culturas axênicas por muitos anos como modelo não patogênico para estudos de biologia molecular de Tripanossomatídeos. Recentemente, este parasita foi estabelecido como um atrativo sistema eucariótico de expressão heteróloga (KUSHNIR et al., 2005; MUREEV et al., 2007; BASILE; PETICCA, 2009; DORTAY; MUELLER-ROEBER, 2010; NIIMI, 2012), principalmente pela capacidade de realizar padrões de modificações pós traducionais similares aos encontrados em mamíferos (BREITLING et al., 2002) e pelo advento de diferentes ferramentas de engenharia genética para esse organismo (BEVERLEY; CLAYTON, 1993; CLAYTON, 1999). Em comparação com células de mamíferos e de inseto, a cultura de *L. tarentolae* é capaz de atingir taxas de crescimento mais elevadas em meios simples contendo apenas hemina como ingrediente de origem animal, sendo adaptável inclusive a tecnologias de fermentação (FRITSCHÉ et al., 2008). Considerando que esses protozoários são bem descritos como não patogênicos a mamíferos e, portanto, aprovados para uso em laboratórios de biossegurança de nível 1 (*American Type Culture Collection ATCC-30267*), diferentes trabalhos também têm investigado *L. tarentolae* como vetor vacinal contra doenças humanas (BRETON et al., 2007) e animais (SALJOUGHIAN; TAHERI; RAFATI, 2014).

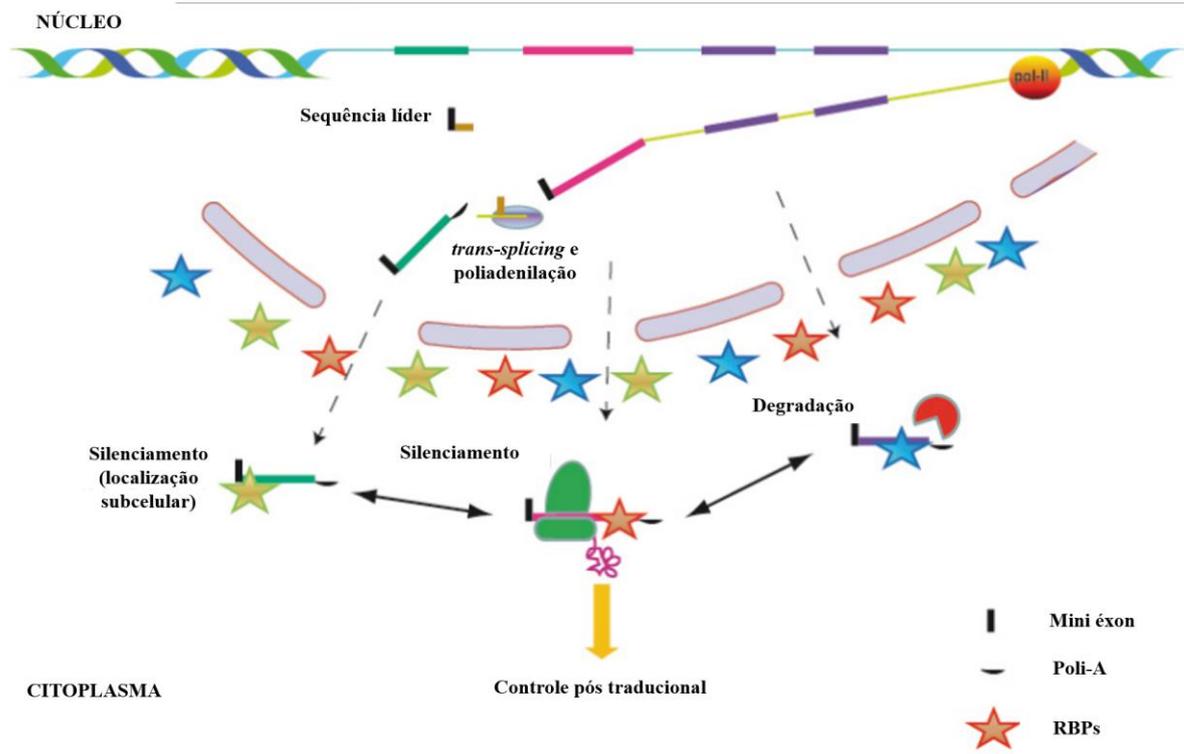


Figura 11. Regulação da expressão gênica em *Leishmania*. A transcrição é policistrônica e o mRNA monocistrônico é produzido por poliadenilação acoplada ao trans-splicing. O mRNA resultante contém um mini éxon na extremidade 5' e uma cauda poli-A 3'. Uma vez completado o processamento, o mRNA maduro é liberado do local de transcrição e exportado ao citoplasma. Neste ponto, o transcrito pode estar ainda associado a proteínas ligadoras de RNA (*RNA binding proteins*, RBPs). A depender de sua associação com proteínas diversas, o transcrito poderá ser silenciado (mediante compartimentalização em estruturas subcelulares), traduzido (nos ribossomos) ou degradado, estando cada uma dessas etapas sob rígido controle celular. Fonte: adaptado de Requena, 2011.

3. JUSTIFICATIVAS

Recentemente, duas vacinas profiláticas foram desenvolvidas para prevenção do câncer de colo uterino, a principal complicação médica associada a infecção pelo HPV. No entanto, a implementação de programas de vacinação baseados nas vacinas Gardasil[®] e Cervarix[®] representa um desafio devido aos seus elevados custos e baixo espectro de proteção, sobretudo porque as regiões mundialmente mais afetadas são representadas por países de baixa renda.

O Brasil entrou recentemente para o seleto grupo de países que disponibilizam uma vacinação anti-HPV mediante programas públicos. Trata-se, contudo, de um cenário ilustrativo dos principais gargalos associados às vacinas contra o HPV. O Ministério da Saúde investiu R\$ 1,1 bilhão na compra da vacina Gardasil[®] entre 2014-2018, mas tal vacina não protegerá os estimados 16,340 novos indivíduos que desenvolverão câncer cervical nos próximos anos porque não tem efeito sobre infecções já estabelecidas. Pelo acordo fechado, o valor da dose é o menor do mercado (R\$ 30) mas muito acima dos valores praticados com as demais vacinas do SUS (em torno de R\$ 1-5) (BAKER et al., 2015; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). Ademais, a baixa adesão (60%) anunciada pelo Ministério de Saúde para a segunda dose da vacina – o que já foi relatado também em países desenvolvidos - coloca o sucesso do programa de vacinação em perspectiva. Este cenário claramente demonstra a necessidade de desenvolver uma vacina anti-HPV de segunda geração.

No âmbito veterinário, a papilomatose bovina, causada pelo BPV, tem sido apontada como uma crescente preocupação econômica e à saúde animal, sem que haja protocolos de prevenção e terapias comprovadamente eficazes para seu controle. Pode-se tomar o exemplo do Brasil, novamente, para ilustrar a relevância do tema exposto, visto que o país possui o terceiro maior rebanho de gado mundial e onde a papilomatose bovina vem sendo apontada como uma doença veterinária endêmica.

O emprego de *P. pastoris* como plataforma para produção de imunógenos do HPV é relatado como uma alternativa para desenvolvimento de vacinas de baixo custo contra o câncer cervical. Enquanto os demais trabalhos têm explorado esta levedura através de um sistema genético comercial baseado no promotor induzível do gene *AOX1*, - o que implica o pagamento de royalties a Invitrogen - neste trabalho desenvolvemos um sistema próprio para produção da proteína L1 do HPV16 empregando o promotor constitutivo do gene *PGK1*. Tal

abordagem permite a produção através de um protocolo mais simples, seguro e barato, empregando glicose ao invés de metanol como fonte de carbono indutora.

O desenvolvimento de imunógenos com propriedades profilático-terapêuticas representa uma atrativa estratégia para aumentar o espectro de proteção contra o HPV. Nesse âmbito, desenvolvemos neste trabalho diferentes antígenos baseados em capsômeros e VLPs quiméricas do HPV16, a partir da fusão de epitopos das proteínas L2 e E5 em diferentes regiões da proteína L1, ou a partir da produção de VLPs baseadas nas proteínas L1 e L2 inteiras. Paralelamente, estabelecemos diferentes sistemas genéticos para produção das referidas partículas em linhagens de *L. tarentolae*, um protozoário não patogênico a humanos recentemente estabelecido para desenvolvimento de vacinas vetorizadas.

O estabelecimento de plataformas biotecnológicas para produção de vacinas contra o HPV que atenda as demandas nacionais e diminua o custo de produção, deve contribuir substancialmente para a eficácia dos programas de prevenção contra o câncer cervical no país, sobretudo diante de um cenário econômico controverso como o atual. Salientamos a ausência de qualquer abordagem vacinal dirigida contra o BPV por mero desinteresse mercadológico, visto que o conhecimento técnico científico necessário para tal constitui a base das atuais vacinas anti-HPV. Sabendo-se que a forte vulnerabilidade econômica do complexo industrial de saúde brasileiro é sua elevada dependência de importações, sobretudo no campo das tecnologias de base biotecnológica, ponderamos que a produção nacional de vacinas representa uma importante retomada de posição estratégica.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo principal o desenvolvimento e avaliação de duas plataformas biotecnológicas baseadas em *Pichia pastoris* e *Leishmania tarentolae* para produção de imunógenos de HPV-16.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Construir um vetor para expressão intracelular da proteína L1 sob regulação do promotor constitutivo P_{PGK1} de *P. pastoris*;
2. Avaliar a expressão intracelular da proteína L1 sob regulação do promotor constitutivo P_{PGK1} de *P. pastoris*;
3. Caracterizar a produção intracelular de VLPs a partir da expressão do gene L1 de HPV16 sob regulação do promotor constitutivo P_{PGK1} de *P. pastoris*;
4. Construir diferentes candidatos vacinais a partir dos genes L1, L2 e E5 de HPV16 e E5 de BPV1;
5. Construir vetores para expressão dos candidatos vacinais em *L. tarentolae*;
6. Avaliar a expressão intracelular dos referidos candidatos vacinais em *L. tarentolae*;
7. Caracterizar a produção de capsômeros e VLPs quiméricas de HPV16 em *L. tarentolae*.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 MATERIAL

5.1.1 Linhagens de microrganismos

A linhagem TOP 10 de *Escherichia coli* (Invitrogen), genótipo [F' {*proAB*, *lacIq*, *lacZ*ΔM15, Tn10 (TetR)} *mcrA*, Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*), φ80*lacZ*ΔM15, Δ*lacX74*, *deoR*, *recA1*, λ-*araD139*, Δ(*ara-leu*)7697, *galU*, *galK*, *rpsL*(StrR), *endA1*, *nupG*] foi rotineiramente empregada para propagação e amplificação de DNAs plasmidiais e construções moleculares realizadas ao longo do trabalho. As linhagens *Pichia pastoris* X-33, possuindo genótipo selvagem e fenótipo Mut⁺ e His⁺, e *Leishmania tarentolae* Parrot-TarII foram utilizadas para expressão dos antígenos de HPV16 e BPV1 explorados neste trabalho.

5.1.2 Plasmídeos

O plasmídeo pPGKΔ3α-L1H16, desenvolvido como descrito por Mariz (2012), contém o sinal α-*mating factor* e o gene L1 de HPV16, ambos com códons otimizados para *P. pastoris*. Além disso, estão presentes no referido plasmídeo o promotor P_{PGK1} e o gene *Sh ble* de resistência a ZeocinaTM (Invitrogen®). A referida construção foi utilizada para transformação de bactérias *E. coli* TOP10 e manipulado geneticamente para permitir a expressão intracelular do gene L1 em *P. pastoris*.

O plasmídeo pGEM-T Easy (Promega®) foi utilizado para clonagem e sequenciamento das construções obtidas para expressão em *L. tarentolae*. Quatro séries de vetores foram desenvolvidos para expressão no referido protozoário, todos possuindo como arcabouço o plasmídeo pSP72 (Promega). No vetor pSP-BT1.YNEOα (PADMANABHAN et al., 2012), a ORF BT1 de *L. tarentolae* (FADILI et al., 2004) apresenta um cassete de expressão denominado YNEOα, onde NEO é o gene da neomicina fosfotransferase de resistência ao antibiótico Geneticina (G418) e está flanqueado por um trato de polipirimidina referido por Y (PAPADOPOULOU; ROY; OUELLETTE, 1994) e uma região intergênica do gene da alfa tubulina de *L. enriettii* referida por α (MCNICOLL et al., 2005). No vetor pSP-αNEO, o

cassete de expressão denominado α NEO foi diretamente clonado no vetor pSP72 e está disposto de forma a permitir o flanqueamento do inserto por duas regiões α , seguida pelo gene NEO. O vetor pSP-YHYG α apresenta um cassete de expressão denominado YHYG α , onde HYG é o gene da higromicina fosfotransferase de resistência à Higromicina B (Sigma[®]) flanqueado pelos fragmentos Y e α . No último vetor empregado, o pSP-rRNAP- α Neo, o cassete de expressão foi diretamente clonado no vetor pSP72 e emprega o promotor do gene de RNA ribossomal (rRNA) 18S (YAN et al., 1999) seguido do fragmento α NEO.

Os plasmídeos pCI-E5otH16 e pCI-E5multi (CORDEIRO et al., 2015), bem como o pCI-E5BPV (LIRA, 2010), foram utilizados para obtenção e expressão dos respectivos candidatos vacinais E5otH16, E5multi e E5BPV1 em *L. tarentolae*.

5.1.3 Tampões, soluções e meios de cultura

Todos os tampões e soluções utilizados rotineiramente para realização das técnicas de clonagem molecular e de análise da expressão proteica foram desenvolvidas como descrito por Sambrook; Russel (2001).

As linhagens bacterianas desenvolvidas foram cultivadas em meio Luria-Bertani (LB: triptona 1%, extrato de levedura 0.5% e NaCl 1%) na presença de ampicilina (100 μ g/ml), por 16 horas. Para meio sólido, foram acrescentados 15g/L de ágar. Para cultivo de *P. pastoris* em meio líquido, uma colônia de levedura foi pré-inoculada em meio YPD (extrato de levedura 1%, peptona 2% e glicose 2%) ou YPDS (extrato de levedura 1%, peptona 2%, glicose 2%, sorbitol 1M, 20g/L ágar) suplementado com Zeocina[™] (100 μ g/ml) (Invitrogen[®]). Para cultivo de *L. tarentolae*, as linhagens foram propagadas em meio SDM-79 (BRUN; SCHONENBERGER, 1979) suplementado com 5 μ g/ml de hemina e 10% de soro fetal bovino (SFB).

5.1.4 Enzimas, kits e anticorpos

As enzimas de restrição empregadas foram adquiridas da New England Biolabs (NEB) e usadas de acordo com as recomendações do fabricante. Para as reações de PCR

convencionais, foi empregada a *Taq DNA polymerase* (Invitrogen), enquanto as PCRs de fusão foram desenvolvidas com a enzima *Phusion[®] High-Fidelity DNA polymerase* (NEB). Para as clonagens rotineiras em construções baseadas no vetor pSP72, foi utilizada a enzima T4 DNA ligase da NEB. O marcador de peso molecular *1 Kb DNA Plus Ladder* (Promega) foi utilizado rotineiramente para as análises de DNA. Eventualmente, outros marcadores foram empregados e estão discriminados quando conveniente durante a descrição dos resultados.

Para as análises proteicas, foram utilizados os marcadores de peso molecular *PageRuler[™] Prestained Protein Ladder Color Burst* (Fermentas Inc.) e *LMW* (GE Healthcare). As reações de imunodeteção desenvolvidas no trabalho empregaram os seguintes anticorpos monoclonais de camundongo: anti-L1 de HPV16 CamVir-1 (Chemicon Inc.), anti-L2 de HPV16 2JGmab#8 (Santa Cruz Biotechnology, SCB), anti-6xHis (Sigma-Aldrich) e anti-HA (ABM, Inc.), anti- α -tubulina de *Trypanosoma brucei* TAT-1 (Sigma-Aldrich), anti-neomicina-fosfotransferase 2 (ABM, Inc.); e o anticorpo policlonal anti-TcSUMO de *T. cruzi* gerado em coelho (cedido gentilmente pela Dra. Vanina E. Alvarez (IIB-INTECH). Como anticorpo secundário, foram utilizados o anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase alcalina e o Alexia 488, ambos produzidos em cabra. As reações de quimioluminescência foram reveladas com o kit *ECL Prime Western blotting* (Amersham) e detectadas mediante uso de filmes radiográficos *Hyperfilm[™] ECL* (Amersham).

5.2 MÉTODOS

5.2.1 Desenho de primers, genes e sequenciamento

As sequências utilizadas para desenvolvimento dos trabalhos estão disponíveis no NCBI (*National Cancer for Biotechnology Information*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e no TriTrypDB *Kinetoplastid Genomics Resource* (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>), estando descritas também no **Apêndice** deste trabalho. As análises de sequências e alinhamentos de DNA foram conduzidas pelo *ClustalW Multiple Alignment Tool*, disponível no programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* (versão 7.0.5.3) (HALL, 1999, <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). Para inspeção de sequências proteicas, o alinhamento local das mesmas foi realizado mediante emprego do PSI-BLASTp (ALTSCHUL, 1997, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). O desenho de *primers* (Tabelas 1 e 2), genes de interesse e estratégias de clonagem foram conduzidos no ApE Plasmid Editor (versão 2.0.47, <http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>) e, quando conveniente, a investigação do uso preferencial de códon (*codon usage*) foi realizada a partir do *Graphical Codon Usage Analyser* (<http://gcu.schoedl.de/>). As reações de sequenciamento de DNA foram realizadas em sequenciador automático ABI PRISM 3100 *Genetic Analyser* (Applied Biosystems) do NPT-CPqAM/FIOCRUZ.

Tabela 1. Sequências dos *primers* utilizados para as análises envolvendo os sistemas genéticos baseados no promotor P_{PGK1} de *P. pastoris*.

Genes	Sequências 5'-3'	Região	Produto
L1otH16	Direto: CTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCT	1-24 nt	1568 pb
	Reverso: GCGGCCGCTTAATGATGATGATGATG ATG	1440-1568 nt	
L1otH16 interno	Direto: GGTCAACCTTTAGGAGTTGG	352-371 nt	443 pb
	Reverso: GACGAACATTTGTTCCCTTC	776-795 nt	
Cassete PGK1	PGK1: TCATAGTTCATCCCTCTCTCC	319-339 nt (no promotor PGK1)	2064 pb (pPGKΔ3α-L1H16)
	AOXTT: GCAATGGCATTCTGACATCC	1159-1179 nt (na região AOXTT)	1817 pb (pPGKΔ3-L1H16)

Tabela 2. Sequências dos *primers* utilizados para amplificação dos candidatos vacinais explorados em *L. tarentolae*.

Genes	Sequências 5'-3'	Região	Produto
L1wt	Direto: GGGATATCTTAGAGCCATGTCTCTTTGGTCCTAGTGAGGCCA	4-29 nt	1544 pb
	Reverso: CCCAAGCTTTTACAGCTTACGTTTTTTGGGTTTA	1494-1518 nt	
L2wt	Direto: CGGGATCCGCCATGGGCCACCACCACCACCACCACCACAAACGTTCTGCAAAAACGCA	4-29 nt	1422 pb
	Reverso: CCCAAGCTTGGCAGCCAAAGAGACATCTGAAAAA	1395-1419 nt	
L1-L2	P1: CAGGGGATGTAGCCCGTGGCGCCCGCGTGGCGGTGCCGATGCCAGGCCCGCCTGTGCCTCCTGGGGGAGGTTGTAGA	1232-1256 nt	1316 pb
	P2: CGGCCGACGGGCTACATCCCGCTGCCCTTAAAAAATACACTTTTTGGG	1317-1341 nt	
L1-E5multi.h4	P1: CAGGGGATGTACACGAAGATGATGTAGTAGCCCGCGCAGCAGCGGGGGATCAGCAGGCACACGTAGCCCGTGTGCCTCCTGGGGGAGGTTGTAGA	1232-1256 nt	1328 pb
	P2: CATCATCTCGTGTACATCCCGCTGCCCTTAAAAAATACACTTTTTGGG	1317-1341 nt	
L1-E5multi.34	Reverso: CCCAAGCTTTTACAGCGGGATGTACACGAAGATGATGTAGTAGCCCGCGCAGCAGCGGGGGATCAGCAGGCACACGTAGCCCGTGTGCCTCCTGGGGGAGGTTGTAGA	1406-1430 nt	1514 pb
	Direto: GGCGATCCGCCATGGGCCACACGTACCCGCTACATCGGGGGCCCCAACCTGTGGTTCCTCCTGTTC	27-52 nt	
AUI_E5B1	Reverso: GAGGATCCGAAAAGCAGGCCGGTGCAGCT	169-189 nt	176 pb
	Direto: GGGATCCGCCATGGGCCACACGTACCCGCTACATCGGGGGCCCCAACCTGTGGTTCCTCCTGTTC	27-52 nt	
AUI_E5otH16	Direto: GGGATCCGCCATGGGCCACACGTACCCGCTACATCGGGGGCCCCAACCTGTGGTTCCTCCTGTTC	34-58 nt	281 pb
	Reverso: GAAAGCTTGTGTGATCAGGAATCTTGCA	249-267 nt	
E5multiH16	Direto: GGGATCCGCCATGGGCCACACGTACCCGCTACATCGGGGGCCCCAACCTGTGGTTCCTCCTGTTC	34-58 nt	273 pb
	Reverso: GAAAGCTTGGTATGGATCAGAAAACAGTGG	241-261 nt	

GATAATCTTAGA: EcoRV/XbaI, AAGCTT: HindIII, GGAATCC: BamHI, GCCATG: códon de iniciação da tradução, TTA: códon de parada da tradução. As tags de polihistidina (8xhis) e AUI estão salientadas em negrito nos respectivos primers diretos do gene L2 e dos genes AUI_E5.

A predição de estrutura tridimensional das proteínas investigadas foi conduzida no I-TASSER (*Iterative Threading Assembly Refinement*) (YANG et al., 2015), e SWISS-Model (BORDOLI et al., 2008), utilizando como modelo a estrutura cristalográfica de pentâmeros da proteína L1 de HPV16 obtidos por Chen et al. (2000) por difração de raio X (1DZL, 3.5 Å). Após criação, os modelos gerados foram refinados empregando o ModRefiner (XU; ZHANG, 2011). Para alinhamento e avaliação das estruturas preditas, foram empregados os programas TM-align (ZHANG, 2005) e MolProbity (CHEN et al., 2010), respectivamente. Para predição de modificações pós-traducionais, foi empregado o programa GPS (Group-based Prediction System) versão 2.0 (XUE et al., 2005). Todos os programas estão disponíveis abertamente para uso *online*.

5.2.2 Cultivo de microrganismos

Para transformação de bactérias *E. coli* com as construções baseadas no plasmídeo pGEMT-Easy (Promega), foram seguidas as recomendações do fabricante. As bactérias recombinantes para as construções baseadas no vetor pSP72 (Promega) foram rotineiramente propagadas em placas ou meio líquido LB contendo 100 µg/ml. Para transformação de bactérias *E. coli* com o cassete de expressão pPGKΔ-L1H16, foi utilizado o meio LB *Low Salt* acrescido de 25 µg/ml de ZeocinaTM. As células foram rotineiramente cultivadas a 37°C, em agitador orbital (100 rpm) quando conveniente.

Para cultivo de *P. pastoris* em meio líquido, uma colônia de levedura foi pré-inoculada em meio YPD e incubada por 2-3 dias para reinóculo em volume apropriado. A preparação de leveduras eletrocompetentes, geração de transformantes e obtenção de clones com múltiplas cópias do sistema genético foram desenvolvidos como descrito por Sunga; Tolstorukov; Cregg (2008). Para seleção de leveduras transformantes, foram empregadas placas YPDS suplementadas com ZeocinaTM (Invitrogen) e incubação por 2-3 dias ou até observação das colônias. Circunstancialmente, clones de *P. pastoris* foram cultivados em placa *deep-well* contendo 1ml/poço de meio YPD e ZeocinaTM e devidamente selada. A rotina de cultivo desses microrganismos empregou incubação a 30°C e, quando necessário, agitação vigorosa (300 rpm).

Para cultivo de *L. tarentolae*, as linhagens foram continuamente mantidas em suspensão com diluições regulares de 1:10 até 1:50 em meio SDM-79 suplementado, em garrafas de 25cm² sem agitação a 26°C. Quando conveniente, células promastigotas em fase estacionária foram diluídas para 10⁶ células/ml e propagadas por 4-7 dias para transfecção ou obtenção de sedimento celular. Esses protozoários foram transfectados com 10-15 µg de DNA e selecionados em antibiótico apropriado (40 µg/ml de G-418 e 100 µg/ml de Higromicina, Sigma), de acordo com protocolo estabelecido por Papadopoulos; Roy; Ouellette (1992).

5.2.3 Manipulação de ácidos nucleicos e proteínas

As técnicas de clonagem molecular foram desenvolvidas como descrito por Sambrook; Russel (2001). As reações de PCR convencionais empregaram a seguinte ciclagem padrão: desnaturação inicial a 98°C por 2'; 30 ciclos de desnaturação a 98°C por 1', anelamento a 58°C por 30'' e extensão a 72°C por 1'; extensão final a 72°C por 3'. Para desenvolvimento de alguns candidatos vacinais, foi empregada uma estratégia baseada em PCR de fusão (DERBISE et al., 2003). O DNA genômico e o RNA total foram isolados das linhagens de *L. tarentolae* através do emprego de DNAzolTM e TRIzolTM (Invitrogen), respectivamente, segundo recomendações do fabricante.

A preparação de extratos proteicos de *P. pastoris* para análise da expressão foi conduzida com tampão de lise apropriado e pérolas de vidro como descrito em Cregg et al. (2009). Para as análises de expressão em *L. tarentolae*, 10⁸ células em fase logarítmica de crescimento foram centrifugadas, ressuspensas diretamente em tampão Laemmli e fervidas por 5'.

5.2.4 Imunodeteccões e Northern blotting

Nas imunodeteccões por *Western blotting*, o extrato proteico total das linhagens recombinantes foram inicialmente extratificados em SDS-PAGE, transferidos para membranas de fluoreto de polivinilidina (PVDF, Millipore) em sistema semi seco e submetidos ao *blotting* segundo Sambrook; Russel (2001). Quando conveniente, as membranas foram coradas por

Ponceau-S Red 0.4% para visualização das proteínas aderidas. Especificamente para os ensaios envolvendo extratos proteicos de protozoários recombinantes, o controle do carregamento de proteínas no gel foi avaliado mediante hibridização com anticorpo anti-tubulina (SCB) quando conveniente e segundo recomendações do fabricante. Nos ensaios de imunodeteção por *Dot blotting*, o extrato proteico das leveduras recombinantes foi diretamente transferido para membranas de PVDF com o auxílio de um suporte de hibridização (*blotter*). As reações foram reveladas seguindo instruções do kit *ECL Prime Western blotting*.

Para os ensaios de *Northern blotting*, as amostras de RNA total foram inicialmente incubadas com DNase I por 20' a 37°C. Posteriormente, o RNA total foi resolvido em gel de agarose 1% desnaturante, transferido para membranas de nylon (Roche), hibridizados e lavadas como descrito em Sambrook; Russel (2001). Sondas marcadas radioativamente com [α -³²P]dCTP foram utilizadas para hibridização.

5.2.5 Ensaios de imunolocalização

Para os estudos de imunolocalização em *L. tarentolae*, 10⁷ células promastigotas em fase logarítmica foram centrifugadas, lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído a 3%. A permeabilização dos parasitas foi conduzida com NP-40 a 0,1% para subsequente marcação com os anticorpos primários. Uma segunda hibridização com Alexia-488 foi desenvolvida para subsequente marcação do DNA celular com DAPI (4', 6'-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride, Molecular Probes). A visualização das células foi realizada com o microscópio confocal Leica SPII-AOBS do Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM), FIOCRUZ-PE.

5.2.6 Ultracentrifugação em gradiente de sacarose

Aproximadamente 2 x 10⁹ células promastigotas em fase logarítmica de crescimento foram centrifugadas, lavadas e ressuspensas em tampão PBS-NaCl 0,5M (pH 7,2 acrescido de polissorbato 80) acrescido de coquetel inibidor de proteases (Roche). A lise das células foi

realizada mediante 10 ciclos de resfriamento em nitrogênio líquido e aquecimento a 37°C, seguido de centrifugação por 15' a 13.000 rpm, 4°C. O clarificado final foi, então, depositado no topo de um gradiente de sacarose 10-60% preparado em HEPES-NaCl. O gradiente foi centrifugado a 35.000 rpm por 90' usando um rotor SW40Ti rotor (Beckman) a 4°C. Um total de 12 frações foram coletadas a partir do topo do tubo de centrifugação e posteriormente avaliadas por Western blotting empregando o anticorpo CamVir-1.

5.2.7 Purificação com resina de heparina-sepharose

As purificações de proteínas empregando a resina heparina-sepharose foram baseadas no protocolo descrito por Kim et al. (2010) com modificações. Extratos proteicos clarificados, obtidos como descrito no item anterior, foram submetidos a precipitação com sulfato de amônia a 45% por 4 horas, a 4°C e subsequente centrifugação a 13.000 rpm durante 10', a 4°C. Após ressuspensão do precipitado proteico em 2 ml de tampão PBS-NaCl 0,5M, procedeu-se o protocolo de diálise contra tampão de desmontagem (PBS-NaCl 0,1M, DTT 2mM, pH 8,2) e remontagem (PBS-NaCl 0,5M, pH 6) de VLPs, ambos os tampões contendo polissorbato 80 a 0,01%.

A seguir, o precipitado proteico dialisado foi aplicado à resina de heparina-sepharose pré-equilibrada com PBS-NaCl 0,5M e incubado por 30' a 4°C. Após lavagem com o mesmo tampão, as eluições foram coletadas em frações contendo PBS-NaCl 1-1,5M e submetidas a *Western blotting* empregando anticorpo CamVir-1.

5.2.8 Microscopia eletrônica de transmissão e imunocitoquímica

As amostras de proteínas purificadas com a resina de heparina-sepharose foram adsorvidas a grades de cobre cobertas com carbono, secadas e negativamente coradas com ácido fosfotúngstico a 2%.

Linhagens recombinantes expressando os candidatos vacinais também foram submetidas à preparação para posterior análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Para as leveduras, o protocolo de preparação seguiu as recomendações descritas por

(FALCÓN et al., 1999). No caso dos protozoários, células promastigotas em fase estacionária foram fixadas por 1 hora a 4°C em tampão cacodilato a 0,1M, pH 7,2, contendo glutaraldeído a 2% e paraformaldeído a 4%; pós-fixadas no mesmo tampão, agora contendo tetróxido de ósmio (OsO₄) a 1%, cloreto de cálcio (CaCl₂) a 5mM e ferrocianeto de potássio 0,8%; desidratadas em soluções de acetona em concentrações seriadas de 50-100%; embebidas por 72 horas a 60°C em resina PolyBed 812 (PolyScience). Cortes ultrafinos desse material foram posteriormente corados com acetato de uranila e citrato de chumbo a 5%.

Alternativamente, as linhagens de *L. tarentolae* também foram processadas para ensaios de imunomarcção e posterior visualização ao MET. Neste caso, formas promastigotas foram fixadas em tampão cacodilato contendo glutaraldeído a 0,2% e ácido pícrico a 0,8%. A seguir, procedeu-se uma etapa de incubação em cloreto de amônia a 50mM para sequestro de grupamentos aldeídicos livres, desidratação em soluções de etanol 30-100% e imersão em resina Lowicryl K4M (Sigma) a 32°C. Cortes ultrafinos desse material foram coletados em grades de níquel e apropriadamente corados como descrito, imediatamente após os procedimentos de marcação com anticorpo CamVir-1 e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a partículas de ouro de 10 nm. Ambos os anticorpos foram diluídos em solução tampão contendo PBS 1x e BSA 3%.

Todas as imagens foram capturadas e analisadas no MET Zeiss EM109 do NPT do CPqAM.

6. RESULTADOS

6.1 CONSTRUÇÃO DOS CANDIDATOS VACINAIS PARA EXPRESSÃO EM *L. tarentolae*

Com o intuito de explorar imunógenos capazes de promover um largo espectro de proteção, três candidatos vacinais quiméricos foram desenvolvidos para expressão em *L. tarentolae*. Em todos os casos, os genes quiméricos estão baseados na proteína L1 de HPV16 segundo modificações ilustradas na figura 12 e descritas a seguir (sequência completa dos genes disponível no **Apêndice**). A região correspondente a α -hélice h4 de L1 foi substituída por um epítipo de reação cruzada presente na proteína L2 de HPV16 (PINEO; HITZEROTH; RYBICKI, 2013) ou por uma sequência multiepitopo de potencial terapêutico baseada na proteína E5 de HPV16 (E5multi) (CORDEIRO et al., 2015) contendo um espaçador alanina-alanina-tirosina (AAY) (VELDERS et al., 2001), dando origem às respectivas quimeras L1-L2 e L1-E5multi.h4. A sequência E5multi também foi inserida na região C-terminal de L1 (últimos 34 aminoácidos), gerando a terceira quimera L1-E5multi.34. Adicionalmente, os genes selvagens L1 e L2 (referidos a partir daqui como L1wt e L2wt) também foram amplificados para expressão em *L. tarentolae*. A construção das quimeras L1-L2 e L1-E5multi.h4 se deu por PCR de fusão (figura 12B), enquanto a quimera L1-E5multi.34, bem como os genes L1 e L2, foram obtidos por PCR convencional. Todas as reações empregaram o genoma de HPV16 como molde, obtido por restrição enzimática e recircularização a partir do plasmídeo pBR322 (KARLEN; BEARD, 1993). A Tabela 2 (5.2.1) descreve os *primers* empregados nas ampliações e construções dos candidatos vacinais mencionados, tomando-se como sequência de referência os isolados GI:27752860 e GI:333031. Também estão descritos os sítios de restrição enzimática, códons de parada da tradução e tags. Todos os primers diretos apresentam GCC como trinca pré-ATG.

Após amplificação e montagem dos candidatos vacinais por PCR, todos os genes foram clonados em vetor pGEMT-Easy e utilizados para transformação de bactérias competentes. O perfil de restrição enzimática obtido a partir dos plasmídeos recombinantes confirmou a clonagem de todos os candidatos vacinais. Posteriormente, a correta amplificação

dos genes L1wt e L2wt, bem como a fusão das quimeras, foi confirmada por sequenciamento de DNA empregando os primers M13.

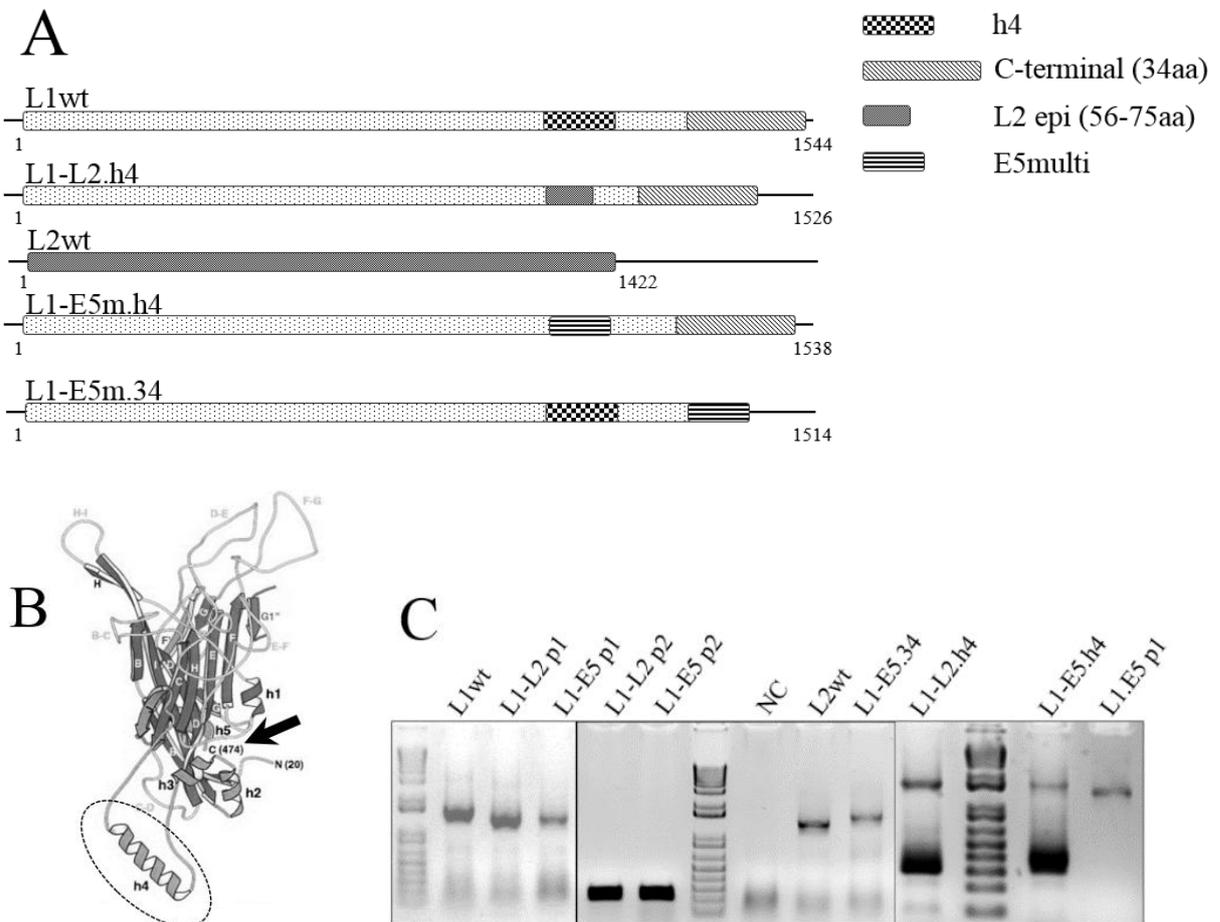


Figura 12. Amplificação e construção dos candidatos vacinais baseados em L1 e L2 de HPV16. (A) Ilustração esquemática dos genes recombinantes projetados neste trabalho: a alça h4 da proteína L1 foi substituída por um epítipo de reação cruzada da proteína L2 ou pela construção E5multi nas quimeras L1-L2 (1526 pb) e L1-E5multi.h4 (1538 pb), respectivamente; a porção terminal da proteína L1 foi trocada pela construção E5multi na quimera L1-E5multi.34 (1514 pb). Similarmente, L1wt e L2wt foram amplificados para clonagem e expressão. (B) O modelo do monômero da proteína L1 para ilustrar a disposição da região h4 (círculo pontilhado) na qual os epítipos exógenos de HPV foram inseridos. Apesar do modelo não incluir os últimos 34 aminoácidos da proteína L1, a porção C-terminal proteica está salientada (seta preta) para enfatizar a diferente disposição em comparação com h4. (C) Eletroforese em gel de agarose demonstrando a construção dos candidatos vacinais. Os genes L1-E5multi.34, L1wt e L2wt foram obtidos por PCR convencional, enquanto as quimeras L1-L2 e L1-E5multi.h4 foram construídas por PCR de fusão em duas etapas: os genes quiméricos foram amplificados em duas porções separadas (denominadas p1 e p2, apresentando aproximadamente 1250 pb e 270 pb, respectivamente) em uma primeira etapa para, então, fusão em um único fragmento para substituição da porção h4 de L1.

Considerando os demais candidatos vacinais baseados nas ORFs E5, três genes alvos foram obtidos por PCR a partir de suas respectivas construções originais em pCI (figura 13): os genes E5otH16 e E5multi (CORDEIRO et al., 2015), ambos otimizados para expressão em células de mamíferos, consistindo de uma versão do gene E5 de HPV16 inteira e uma versão contendo múltiplos epitopos da proteína E5 de HPV16, respectivamente; o gene E5BPV (LIRA, 2010), consistindo na sequência inteira da proteína E5 de BPV1 na qual a glutamina 17 foi substituída por glicina para abolir sua dimerização e consequente interações com alvos celulares relacionadas a seu efeito transformante (SPARKOWSKI; ANDERS; SCHLEGEL, 1994). O epitopo AU1 encontra-se fusionado à extremidade 5' dos referidos genes. Os primers utilizados para as construções baseadas em E5 também estão descritos na Tabela 2. Análises por restrição enzimática e sequenciamento de DNA confirmaram a clonagem dos referidos candidatos vacinais em vetor pGEMT-Easy.

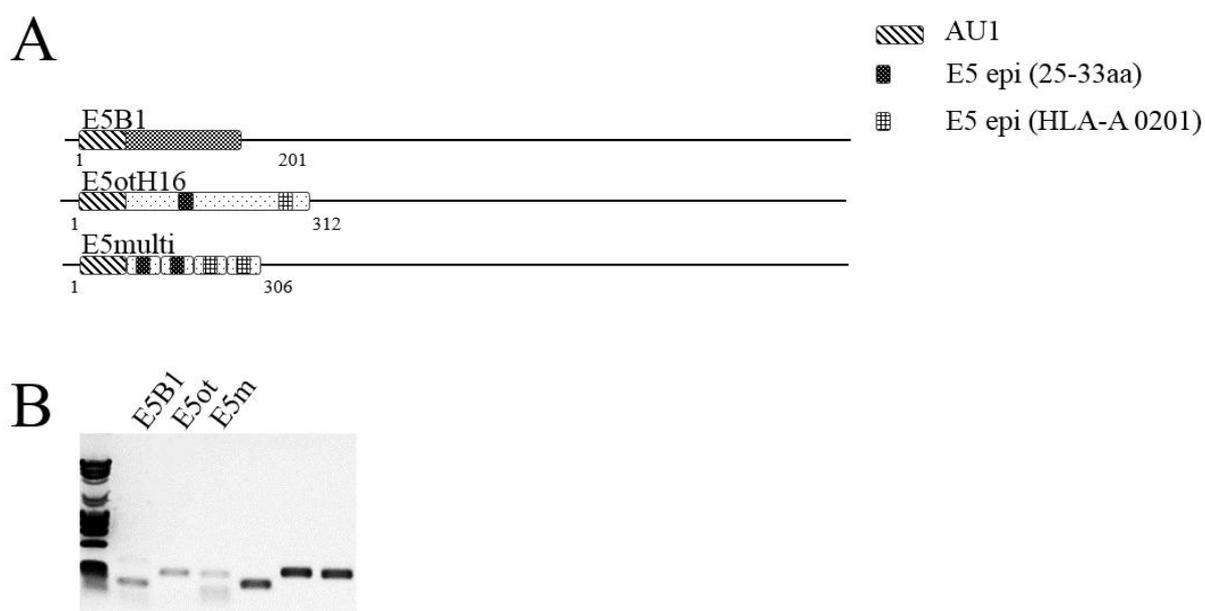


Figura 13. Amplificação dos candidatos vacinais baseados na ORF E5. (A) Ilustração esquemática dos genes recombinantes: os fragmentos E5B1 e E5otH16 consistem nas sequências completas dos genes E5 de BPV1 e HPV16, respectivamente; a construção E5multi é formado a partir do agrupamento em repetição dos epitopos 25-33aa e HLA-A 0201 da proteína E5 de HPV16. Todos os genes apresentam o epitopo AU1 na porção N-terminal. (B) Os genes E5B1 (176 pb), E5otH16 (281 pb) e E5multi (273 pb) foram amplificados por PCR convencional a partir de construções prévias em vetor pCI.

Os dados obtidos a partir da modelagem estrutural revelaram que as quimeras adquirem uma conformação tridimensional semelhante à estrutura cristalográfica da proteína L1 nativa (figura 14). Os dados relativos à validação global dos modelos após refinamento quanto a critérios de geometria proteica e de torsões de ângulos para as ligações peptídicas estão demonstrados no **Apêndice** deste trabalho. De especial interesse para as quimeras L1-L2 e L1-E5multi.h4 é a manutenção dos epitopos 56-75 de L2 e E5multi em uma disposição semelhante às regiões originais.

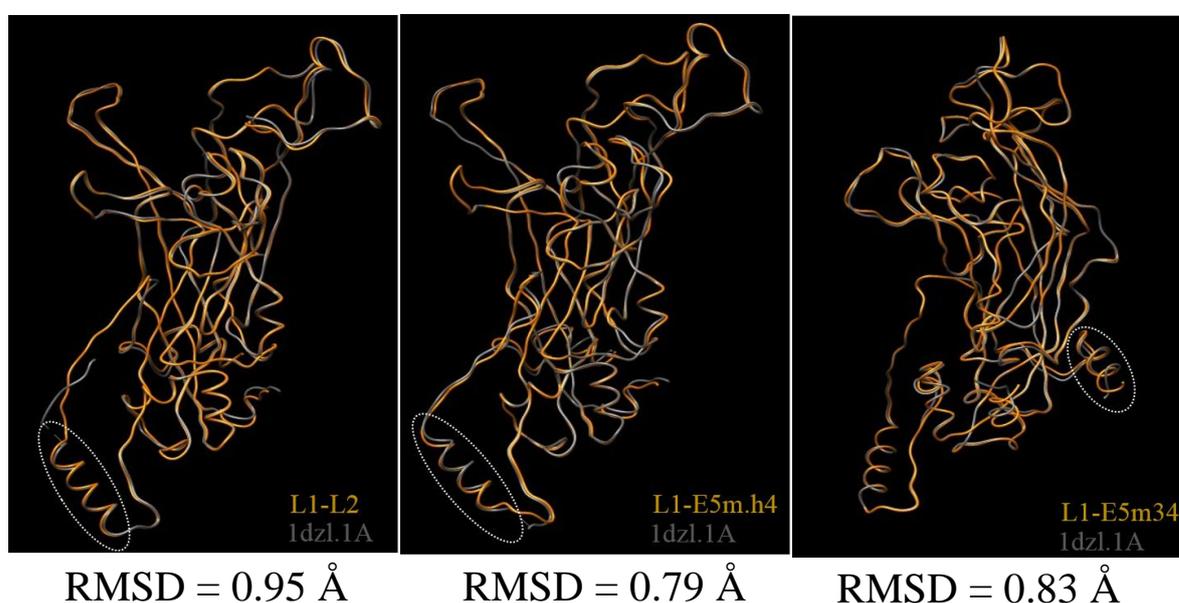
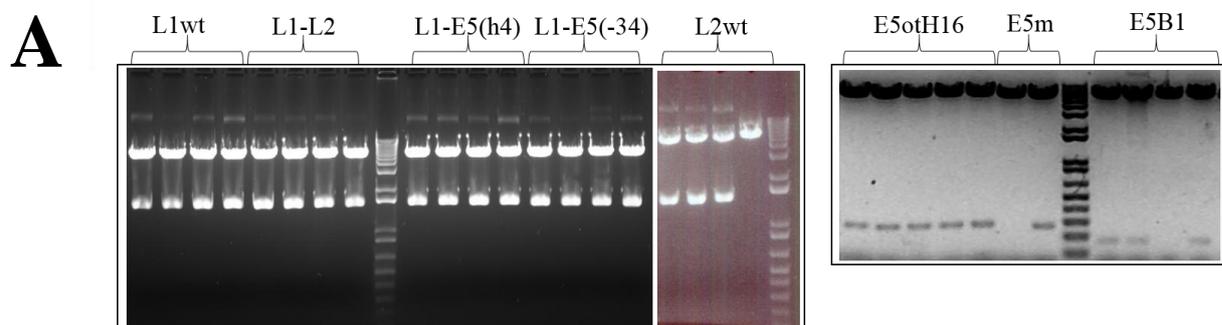


Figura 14. Estrutura tridimensional das quimeras L1-L2, L1-E5multi.h4 e L1-E5multi.34. Quando os modelos gerados para as quimeras são sobrepostos à estrutura cristalográfica da proteína L1 nativa (1dzl.1A), nota-se que os epitopos 56-75 e E5multi (salientados com círculos pontilhados em branco) ficam dispostos de maneira semelhante a configuração original das regiões h4 e C-terminal (painel de imagens à esquerda). Os valores de RMSD obtidos a partir dos alinhamentos estão descritos abaixo das imagens.

6.2 CONSTRUÇÃO DOS CASSETES DE EXPRESSÃO E OBTENÇÃO DE LINHAGENS RECOMBINANTES DE *L. tarentolae*

A construção dos cassetes de expressão foi obtida através da subclonagem dos candidatos vacinais nos respectivos vetores de expressão explorados neste trabalho, de acordo com os sítios de restrição inseridos pelos *primers*. Embora quatro diferentes sistemas genéticos tenham sido empregados para expressão em *L. tarentolae*, eventualmente apenas alguns dos genes foram clonados em todos os diferentes sistemas, considerando estratégias específicas de avaliação.

As análises por restrição enzimática demonstraram a clonagem de todos os genes nos vetores pSP-BT1.YNEO α (figura 15A). O referido vetor apresenta o cassete YNEO α , composto pelo trato de polipirimidina Y (~0.1 kb), o gene NEO (~0.8 kb) e a região intergênica α (~0.8 kb), e inserido na ORF BT1 (~1.8 kb) (figura 15B). A clonagem neste vetor permite o fusionamento da tag HA à extremidade C-terminal das proteínas a serem expressas, com exceção daquelas baseadas em L1 (visto a existência do códon de parada da tradução nos respectivos genes). O fragmento BT1.YNEO α foi inserido no arcabouço plasmidial do pSP72 (~2.4 kb)



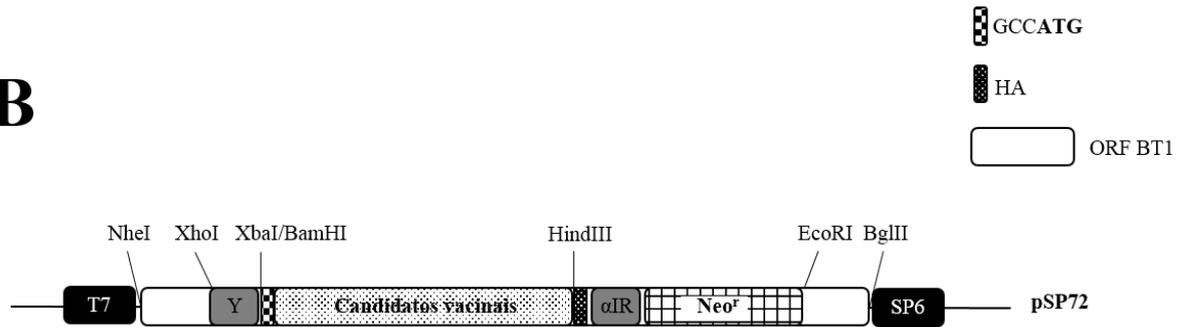
B

Figura 15. Clonagem dos candidatos vacinais em vetor de expressão pSP-BT1.YNEO α . **(A)** Uma vez realizada a subclonagem no referido vetor, as construções plasmidiais foram extraídas de bactérias recombinantes e submetidas à análise por restrição enzimática com XbaI-HindIII (para os genes baseados em L1) ou BamHI-HindIII (para o gene L2wt e os genes baseados em E5). As análises demonstram a liberação dos genes baseados em L1 (~1.5 kb) e do gene L2wt (~1.4 kb) no painel esquerdo, enquanto os genes baseados em E5 (E5otH16 e E5m têm ~0.3 kb, o gene E5B1 tem ~0.2 kb) estão dispostos no painel direito. Em todas as amostras nota-se a presença do vetor pSP-BT1.YNEO α (~6 kb). **(B)** Ilustração esquemática do mapa referente às construções genéticas desenvolvidas para expressão em *L. tarentolae* utilizando o cassete pSP-BT1.YNEO α . Em destaque estão: o cassete YNEO α e as sequências de iniciação da tradução (GCCATG) e da tag HA flanqueando os insertos.

No vetor pSP- α NEO, foram clonados todos os genes baseados em L1, bem como os genes E5otH16 e E5m (figura 16A). O referido vetor apresenta uma organização ligeiramente diferente do anterior (figura 16B). O cassete α NEO está diretamente inserido em plasmídeo pSP72 e dispõe de duas regiões α de maneira a flanquear os insertos a serem clonados. Para clonagem nesse vetor, todos os candidatos vacinais empregados foram obtidos a partir das construções em pSP-BT1.YNEO α mediante PCR convencional com a enzima *Phusion*[®] *High-Fidelity DNA polymerase*. Após amplificação, os fragmentos foram tratados para posterior clonagem nos sítios XbaI/BamHI-SmaI do vetor pSP- α NEO. Uma versão similar a este sistema genético, denominada pSP-YHYG α , foi utilizado para clonagem apenas do gene L2wt (figura 16D). Neste caso, além das regiões Y e α , o cassete de expressão apresenta a sequência HYG (~1.1 kb), tendo o vetor completo um tamanho de aproximadamente 4.4 kb. Para clonagem, o gene L2wt também foi obtido da construção prévia em pSP-BT1.YNEO α , mas mediante digestão enzimática com BamHI-NotI. Isso permitiu tanto uma clonagem direta quanto a manutenção da tag HA no fragmento L2wt. O perfil de digestão enzimática observado a partir das construções plasmidiais obtidas das bactérias transformantes, bem como o posterior sequenciamento dos fragmentos, confirmam a geração dos cassetes recombinantes de interesse (figura 16B).

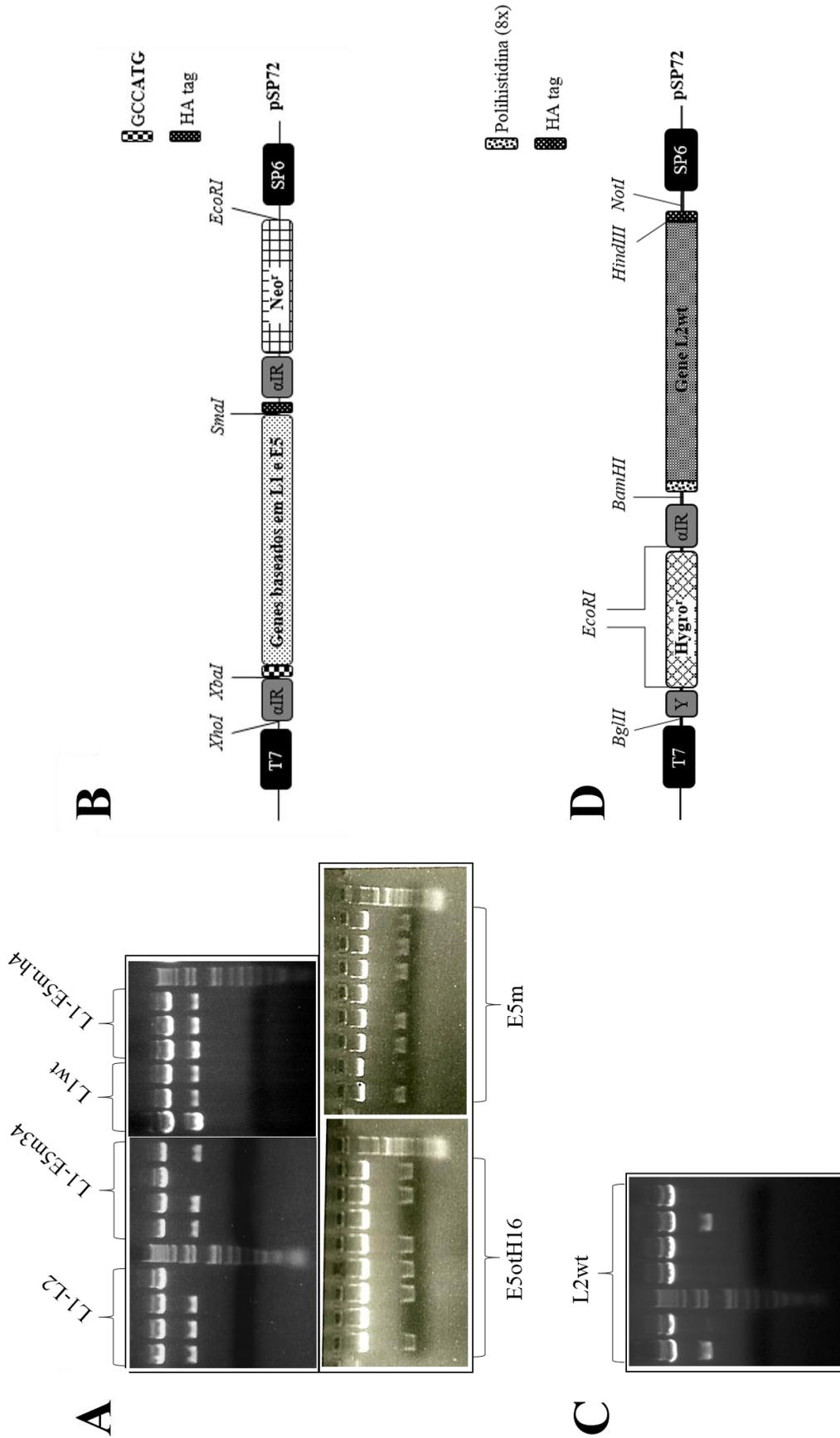


Figura 16. Clonagem dos candidatos vacinais nos vetores de expressão pSP- $\alpha\alpha$ NEO e pSP-YHYG α . (A e C) As construções plasmidiais obtidas a partir das bactérias transformantes foram analisadas por restrição enzimática, confirmando a clonagem dos genes baseados em L1 (~ 1.5 kb) e dos genes E5mH16 e E5m (~ 0.3 kb) em vetor pSP- $\alpha\alpha$ NEO (~ 4.8 kb), bem como do gene L2wt (~ 1.4 kb) em vetor pSP-YHYG α (~ 4.4 kb). (B e D) Ilustração esquemática dos mapas referentes às construções genéticas desenvolvidas para expressão em *L. tarentolae* utilizando, respectivamente, os cassetes pSP- $\alpha\alpha$ NEO e pSP-YHYG α .

O quarto sistema genético desenvolvido para expressão em *L. tarentolae*, denominado pSP-rRNAP- α Neo, foi utilizado para clonagem do gene L1wt e da quimera L1-L2 (figura 17). No referido sistema, o promotor do gene de RNA ribossomal (rRNA) 18S (~ 1.2 kb) foi inserido à extremidade 5' do cassete α NEO (figura 17B). A estratégia de clonagem empregada é idêntica à descrita para o vetor pSP- α Neo, visando a inserção dos genes nos sítios XbaI-SmaI presentes no vetor de expressão. A confirmação das construções no sistema genético pSP-rRNAP- α Neo foi inicialmente realizada por restrição enzimática e, subsequentemente, análises de sequenciamento confirmaram a correta fase de leitura de todas as clonagens obtidas (figura 17A).

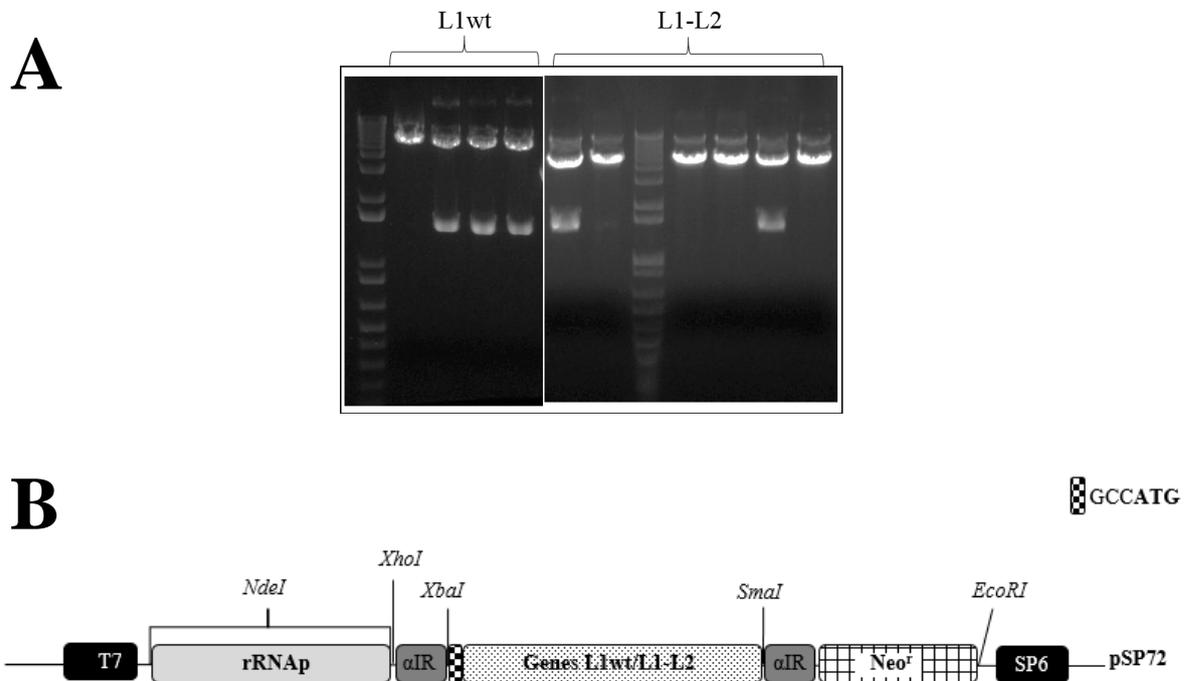


Figura 17. Clonagem dos candidatos vacinais em vetor de expressão pSP-rRNAP- α Neo. **(A)** As construções geradas foram extraídas dos transformantes e submetidas à análise por restrição enzimática com XbaI-SmaI. As análises demonstram a liberação dos genes L1wt e L1-L2 (~ 1.5 kb), bem como o vetor pSP-rRNAP- α Neo (~ 6 kb), confirmando a clonagem e construção dos sistemas genéticos para expressão em *L. tarentolae*. **(B)** Ilustração esquemática do mapa referente à construção genética desenvolvidas para expressão em *L. tarentolae* utilizando o cassete pSP-rRNAP- α Neo. Destaca-se a presença da região promotora rRNAP inserida no cassete α Neo e a sequência de iniciação da tradução (GGCATG).

Células promastigotas de *L. tarentolae* foram transfectadas com as construções genéticas geradas, como descrito na sessão 5.2.2. Uma linhagem recombinante, em particular,

foi obtida a partir da co-transfecção com as construções pSP-BT1.YNEO α -L1wt e pSP-YHYG α -L2wt. Após etapa de seleção dos transfectantes, todas as linhagens recombinantes foram submetidas à análise da expressão heteróloga.

6.3 CONSTRUÇÃO DO VETOR PARA EXPRESSÃO DE L1 EM *P. pastoris* E OBTENÇÃO DE LEVEDURAS RECOMBINANTES

Com a finalidade de produzir L1 mediante emprego da via intracelular de expressão, o cassete pPGK Δ 3 α -L1H16 (MARIZ et al., 2015) foi tratado com as enzimas BstBI e XhoI para liberação da sequência referente ao peptídeo sinal α -*mating fator* (figura 18A). Após a observação desta excisão por eletroforese (figura 18B), o plasmídeo resultante, denominado pPGK Δ 3-L1H16, foi purificado do gel de agarose e empregado em reação com a enzima T4 DNA polimerase (NEB) para tornar as extremidades dos fragmentos cegas, no intuito de promover, posteriormente, a recircularização dos mesmos com o emprego da enzima T4 DNA ligase.

Alíquotas da reação com a T4 DNA ligase foram empregadas para transformação de bactérias e o DNA extraído dos transformantes foi analisado por restrição enzimática. O padrão de migração observado em eletroforese para o vetor pPGK Δ 3 liberado do inserto L1 esteve de acordo com o esperado para a excisão do fator- α (figura 16C). Subsequentemente, as reações de PCR com os *primers* descritos na Tabela 1, bem como os dados obtidos pelo sequenciamento do referido plasmídeo, confirmaram a obtenção do cassete pPGK Δ 3-L1H16.

Uma vez confirmada a obtenção do cassete, prosseguiu-se com a digestão do mesmo utilizando a enzima SacI para linearização do vetor. Entre 30-40 colônias recombinantes de *P. pastoris* foram obtidas mediante eletroporação de leveduras com alíquotas do vetor linearizado, seguida da seleção dos transformantes em placa contendo ZeocinaTM como descrito na sessão 5.2.2.

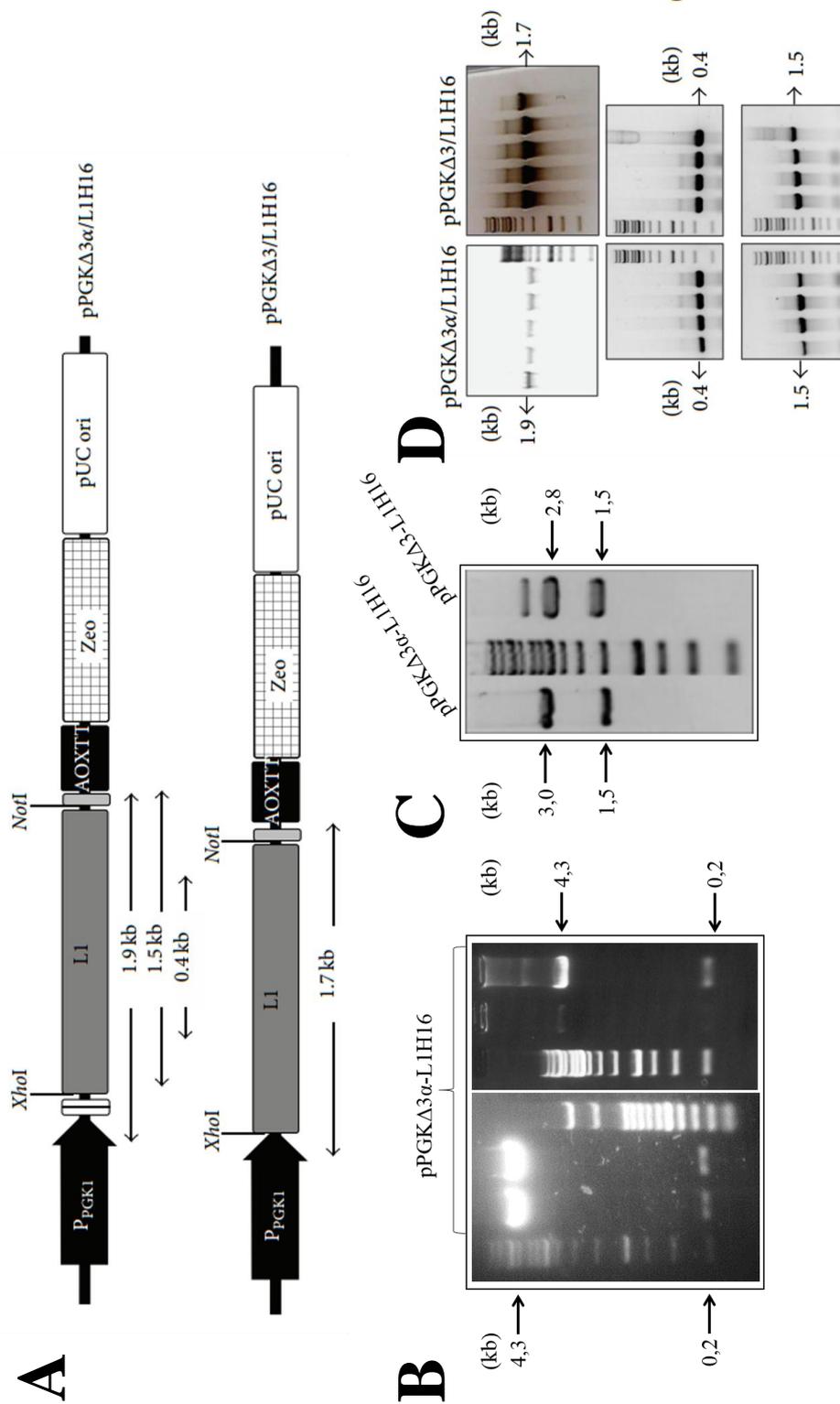


Figura 18. Construção do cassette pPGKΔ3-L1H16 para expressão intracelular de L1 sob regulação do promotor P_{PGK1}. (A) Ilustração esquemática do cassette original contendo o fator-α para secreção e seu derivado obtido neste trabalho, no qual o fator foi excisado. No esquema estão salientadas as regiões empregadas nas análises de confirmação: primers flanqueando parte do promotor P_{PGK1} e o gene L1 inteiro amplificam um fragmento de 1,9 kb do cassette pPGKΔ3α-L1H16 e de 1,7 kb do cassette pPGKΔ3-L1H16; primers flanqueando o gene L1 inteiro (1,5 kb) a partir de ambos os cassetes; primers internos à região L1 amplificam um fragmento de 0,4 kb a partir de ambos os cassetes. O esquema é meramente ilustrativo e não existe correlação entre o tamanho das regiões demonstradas. (B) Excisão do fator-α (250 pb) a partir do cassette pPGKΔ3α-L1H16, dando origem ao cassette pPGKΔ3-L1H16, dando origem ao cassette pPGKΔ3-L1H16 (4,3 kb). Bactérias recombinantes foram obtidas com o novo vetor e sujeitas à extração plasmidial para as análises de confirmação por restrição enzimática em C, onde observou-se a liberação de um fragmento de 2,8 kb correspondente ao vetor pPGKΔ3 sem o fator-α. As análises por PCR em D demonstram a presença de todos os fragmentos preditos em A, confirmando a obtenção do cassette pPGKΔ3-L1H16.

6.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS CANDIDATOS VACINAIS EM *L. tarentolae*

A expressão dos candidatos vacinais baseados em L1 empregou inicialmente os protozoários transfectados com as construções genéticas baseadas no sistema pSP- α NEO. Neste primeiro momento, as análises se basearam em ensaios por *western blotting* com os extratos proteicos dos transfectantes cultivados e devidamente estratificados em gel SDS-PAGE 12,5%. Os resultados demonstram a detecção dos candidatos vacinais mediante emprego do anticorpo anti-L1 em todas as linhagens avaliadas (figura 19A). O perfil de migração das proteínas recombinantes demonstra que as quimeras baseadas em L1 apresentaram um padrão diferente daquele observado para a proteína selvagem L1.

A obtenção de uma linhagem envolveu, particularmente, a transfecção de células promastigotas de *L. tarentolae* simultaneamente com as construções genéticas pSP-YHYG α -L2wt e pSP- α NEO-L1wt para coexpressão das proteínas capsidiais do HPV. Os ensaios por *immunoblotting* empregando o anticorpo monoclonal anti-HA confirmou a presença de uma proteína com tamanho correspondente a ~70 kDa como predito para a proteína L2 no extrato desses transfectantes, mas também uma isoforma proteica com ~97 kDa (figura 19B). A inespecificidade deste reconhecimento foi descartada com o emprego de outros dois anticorpos anti-His e anti-L2, os quais confirmaram a detecção da isoforma com 97 kDa apenas nas linhagens recombinantes teste (figura 19C). Adicionalmente, a hibridização com o anticorpo anti-tubulina assegurou o controle no carregamento dos géis em relação ao extrato proteico utilizado. Em paralelo, o extrato proteico dos referidos transfectantes foi submetido à *western blotting* empregando o anticorpo anti-L1, demonstrando-se a coexpressão da proteína L1wt (56 kDa) (figura 19B).

Paralelamente, também avaliamos a expressão dos candidatos vacinais baseados no gene E5 de BPV e HPV em *L. tarentolae*. Neste caso, os ensaios de *immunoblotting* empregando protozoários transfectados com as construções baseadas no sistema pSP-BT1.YNEO α demonstraram a detecção apenas da proteína E5B1 (~10 kDa) mediante utilização de anticorpo anti-HA, não sendo observado nenhum sinal de detecção para as proteínas E5otH16 e E5multi (dados não demonstrados). As análises prosseguiram, portanto, para investigação da expressão destes candidatos vacinais no sistema pSP- α NEO. Todavia, os novos ensaios desenvolvidos com o extrato proteico total dos transfectantes repetiram os resultados previamente obtidos, não sendo detectadas as proteínas E5otH16 e E5multi (dados

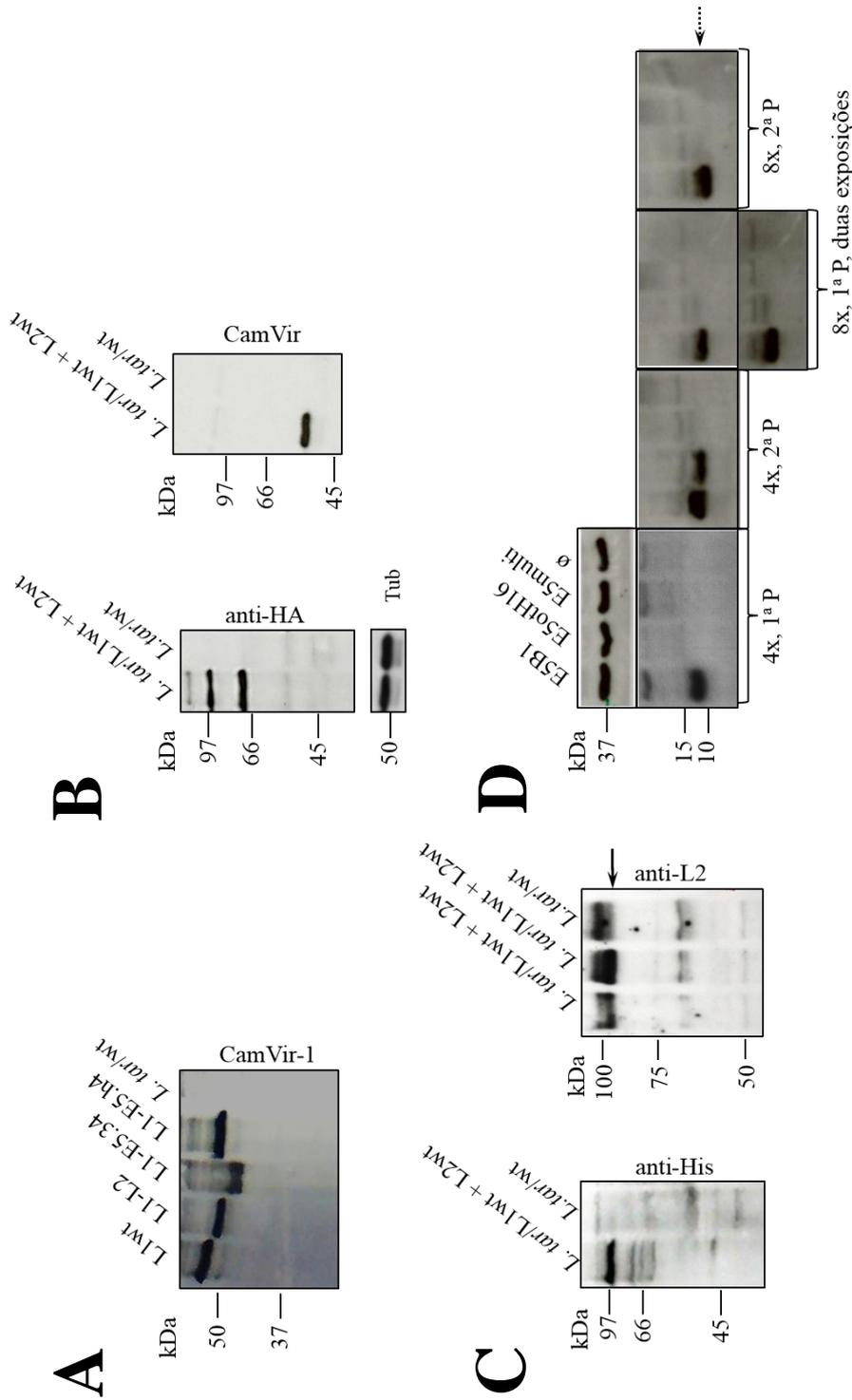


Figura 19. Análise da expressão dos candidatos vacinais em *L. tarentolae*. (A) A expressão das proteínas baseadas em L1 demonstram um padrão de migração diferencial (variando de 50-56 kDa) durante os ensaios por *western blotting* empregando o anticorpo monoclonal CamVir-1. (B) A coexpressão das proteínas L2wt (~70 kDa) e L1wt (~56 kDa) em *L. tarentolae* foi confirmada com anticorpos anti-HA e CamVir-1. A detecção da proteína α -tubulina foi utilizada para demonstrar a normalização no carregamento de proteínas totais no gel. Inesperadamente, os ensaios também demonstraram a presença de uma isoforma de L2wt com ~97 kDa, o que foi posteriormente confirmado em novas análises empregando anticorpos anti-His e anti-L2 em C. (D) Embora a detecção da proteína E5B1 (~10 kDa) tenha sido determinada no extrato dos protozoários transfectados com o sistema pSP-BT1.YNEO α -E5B1, a detecção da proteína E50tH16 (~10 kDa) somente foi possível mediante emprego do sistema pSP- α NEO e após cultivo dos transfectantes em concentrações elevadas de Neomicina, ainda que de maneira transitória. Para a proteína E5multi, todavia, não foi possível detectá-la em nenhum dos ensaios desenvolvidos. A detecção da proteína neomicina-fosfotransferase (~37 kDa) assegurou o carregamento adequado dos géis com as proteínas totais e confirmou a presença do cassette de expressão nos protozoários investigados

não demonstrados). No sentido de contornar a situação, uma última tentativa foi explorada para produção das referidas proteínas de HPV em *L. tarentolae*. Neste caso, avaliamos a expressão dos genes E5otH16 e E5multi no sistema genético pSP- α NEO mediante cultivo das linhagens recombinantes em concentrações crescentes de Neomicina (360 e 640 μ g/ml) e a partir de duas passagens. Para este último experimento, os resultados demonstraram a detecção da proteína E5otH16 transitoriamente por *western blotting*, mas a proteína E5multi permaneceu indetectável (figura D). Como controle da especificidade da reação, foi empregada uma linhagem de *L. tarentolae* transfectadas com os sistemas genéticos sem inserto. Adicionalmente, também confirmamos por *immunoblotting* a expressão da neomicina-fosfotransferase (37 kDa) com anticorpo anti-Neo como indicador da presença das construções genéticas nas linhagens recombinantes investigadas.

6.5 AVALIAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO DOS CANDIDATOS VACINAIS BASEADOS EM E5 NAS LINHAGENS DE *L. tarentolae*

Em virtude da ausência de detecção das proteínas E5otH16 e E5multi a partir dos ensaios por *western blotting*, submetemos os protozoários recombinantes à extração de DNA e RNA total tanto para identificação dos genes recombinantes quanto para acessar a transcrição dos mesmos.

Os resultados obtidos por PCR empregando os primers específicos para E5otH16 e E5multi confirmaram a presença dos genes recombinantes na amostra de DNA total obtida dos protozoários transfectados com os sistemas genéticos baseados na construção pSP- α NEO (figura 20). A ausência de amplificação a partir da linhagem controle transfectada com o vetor pSP- α NEO vazio assegurou a especificidade dos ensaios. Em paralelo, a transcrição dos referidos candidatos vacinais foi avaliada mediante *northern blotting* empregando amostras de RNA total dos protozoários transfectados com uma outra construção genética (pSP-BT1.YNEO α ou em pSP- α NEO). Os resultados confirmaram a presença dos transcritos para ambos os candidatos vacinais E5otH16 e E5multi nas amostras de RNA total obtidas (figura 20). A especificidade da hibridização estabelecida no ensaio de northern ficou demonstrada pela ausência de qualquer sinal nas alíquotas provenientes dos protozoários

transfectados com as construções genéticas vazias. Adicionalmente, linhagens de *L. tarentolae* expressando a proteína E5B1 foi empregada como controle positivo no ensaio.

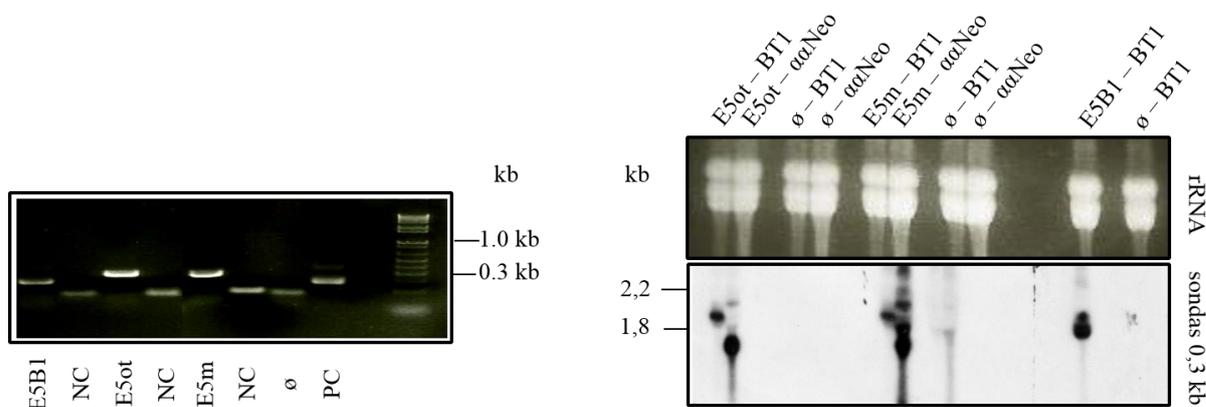


Figura 20. Detecção dos candidatos vacinais E5otH16 e E5multi e análise da transcrição dos referidos genes nas linhagens recombinantes de *L. tarentolae*. Os resultados obtidos pela PCR estão demonstrados no painel à esquerda, onde nota-se a amplificação dos genes E5otH16 e E5multi (~0,3 kb) a partir das alíquotas de DNA total obtidas dos protozoários transfectados com os sistemas genéticos baseados em pSP- α NEO. A amplificação do gene E5B1 (~0,2 kb) foi observada tanto a partir de protozoários expressando a proteína E5B1 quanto a partir de uma alíquota de extração plasmidial, amostras estas empregadas como controle positivo. Outras amostras empregadas como controles adicionais correspondem ao DNA total de protozoários transfectados com a construção pSP- α NEO vazia e um mix da reação de PCR sem DNA *template*, nas quais não se observou amplificação dos genes investigados. No painel à direita, sondas marcadas radioativamente (~0,3 kb) foram empregadas para hibridização dos RNAs de interesse por *northern blotting*. Os genes E5otH16 e E5multi clonados nos vetores pSP-BT1.YNEO α e pSP- α NEO geraram transcritos com, respectivamente, ~2 kb e ~ 1,1 kb. Novamente utilizadas como controle, as linhagens de *L. tarentolae* expressando a proteína E5B1 possibilitaram a detecção de transcritos com ~1,9 kb, referentes ao gene E5B1 clonado no vetor pSP-BT1.YNEO α . Como controle negativo, as linhagens transfectadas com os vetores pSP-BT1.YNEO α e pSP- α NEO vazios não demonstraram a detecção de nenhum transcrito a partir das alíquotas de RNA total obtidas.

6.6 SELEÇÃO E VARREDURA DOS RECOMBINANTES DE *P. pastoris* COM MÚLTIPLAS CÓPIAS DO CASSETE DE EXPRESSÃO

Clones de leveduras com múltiplas cópias do cassete pPGK Δ 3-L1H16 foram selecionados submetendo-se os transformantes obtidos a cultivo em placas contendo concentrações crescentes de Zeocina (100 μ g/ml, 500 μ g/ml e 1mg/ml). Na figura 21A estão demonstradas as colônias resistentes à 2 mg/ml de Zeocina.

Posteriormente, os ensaios por *Dot blotting* empregando os extratos proteicos totais de clones cultivados em placa *deep-well* foram realizados para selecionar previamente clones de *P. pastoris* (múltiplas cópias) com altos níveis de expressão da proteína L1. As análises

também empregaram as linhagens controle transformadas com vetores de expressão vazios (sem inserto). Como nota-se na figura 21B, a maior parte dos clones apresentaram um sinal de detecção visualmente intenso e uniforme.

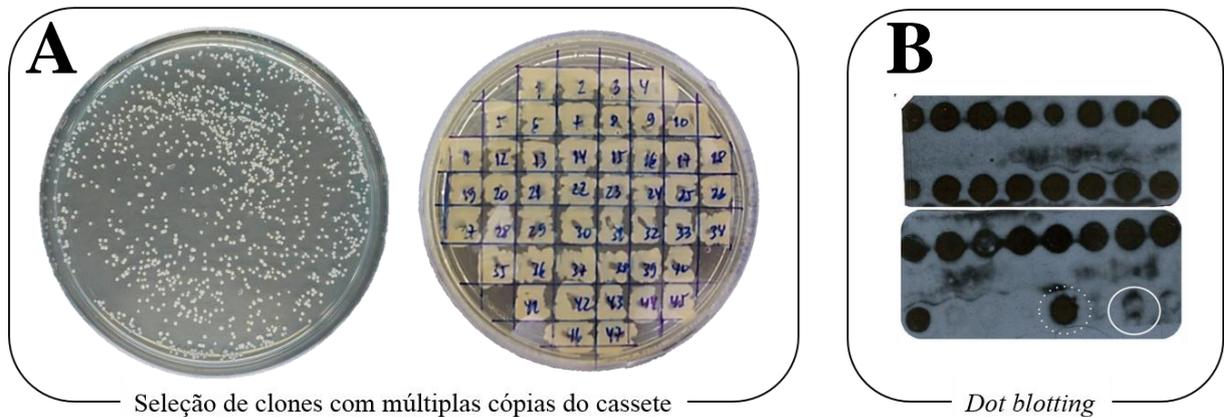


Figura 21. Seleção e varredura dos clones de *P. pastoris* com múltiplas cópias do cassete de expressão pPGKΔ3-L1H16. Os transformantes obtidos após eletroporação das leveduras (em **A**, à esquerda) foram submetidos a crescimento em placa contendo concentrações crescentes de ZeocinaTM. Aqueles resistentes a 2 mg/ml do antibiótico (em **A**, à direita) foram cultivados, posteriormente, em placa *deep-well* para varredura dos níveis de expressão da proteína L1. As análises por *dot blotting* empregando anticorpo CamVir-1 (em **B**) demonstram a detecção da proteína L1 no extrato proteico total dos clones com múltiplas cópias do cassete de expressão. Uma alíquota da proteína L1 de HPV16 produzida transientemente em *P. pastoris* foi empregada como controle positivo do experimento (círculo branco pontilhado), enquanto o extrato proteico de uma linhagem de *P. pastoris* transformada com o vetor pPGKΔ3 vazio foi utilizado como controle negativo (círculo em branco). A placa de transformantes demonstrada em **A** é meramente ilustrativa. As imagens são representativas de um conjunto de diferentes experimentos realizados.

6.7 ANÁLISE DA EXPRESSÃO INTRACELULAR DA PROTEÍNA L1 EM *P. pastoris*: CULTIVO DOS CLONES EM FRASCOS

A avaliação da expressão constitutiva e intracelular da proteína L1 em *P. pastoris* foi investigada ao longo de cultivo em frascos (50 ml). Baseando-se nos ensaios por *dot blotting*, clones com múltiplas cópias do cassete de expressão foram cultivados e submetidos a lise celular para obtenção do extrato proteico total como descrito na sessão 5.2.3. A expressão da proteína L1 (~56 kDa) foi devidamente caracterizada por *western blotting* em todos os extratos e ao longo de todo o tempo de cultivo investigados, estando de acordo com o padrão observado para o controle positivo (proteína L1 de HPV16 produzida transientemente em *P. pastoris*) (figura 22A). A especificidade do reconhecimento foi confirmada pela ausência de

qualquer sinal no controle negativo. A observação de bandas com peso molecular inferior ao monômero de L1 nos extratos indica uma eventual degradação das proteínas recombinantes, visto sua ausência no controle negativo e em concordância com relatos anteriores (KIRNBAUER et al., 1992; BAZAN et al., 2009). Em um experimento diferente, foi possível também observar que a expressão constitutiva de L1 se mostrou estável inclusive após 7 dias de cultivo dos clones (~90 gerações) na ausência de ZeocinaTM (figura 22B).

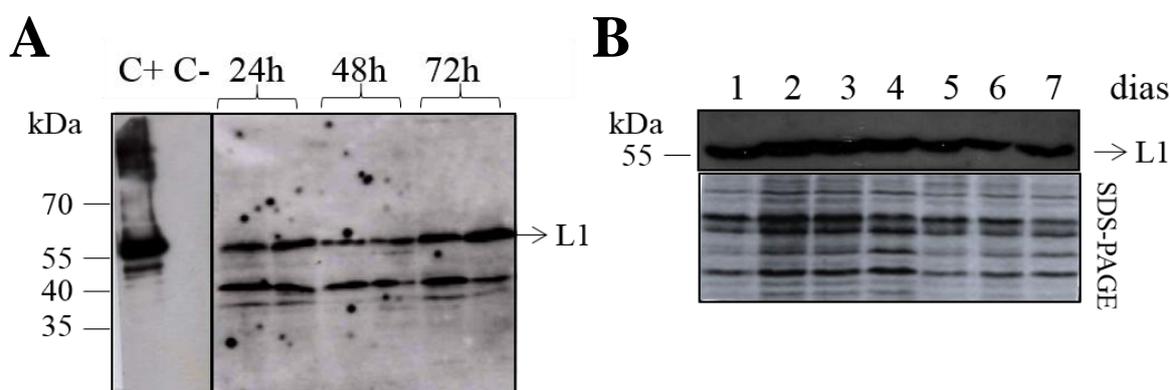


Figura 22. Western blotting dos extratos intracelulares provenientes dos clones de *P. pastoris* cultivados em frascos. (A) A proteína L1 (~56 kDa) foi detectada ao longo de todo o cultivo nos extratos intracelulares de clones com múltiplas cópias do cassete de expressão mediante emprego do anticorpo CamVir-1, de acordo com o padrão de migração observado no controle positivo (L1 produzida transientemente em *P. pastoris*). Nenhum padrão de detecção foi observado a partir da amostra controle negativo. (B) Mesmo após 7 dias de cultivo na ausência de marca de seleção, a expressão de L1 se mostrou constitutiva. O controle do carregamento no gel com os extratos proteicos preparados foi avaliado por coloração em Coomassie azul brilhante.

6.8 EVIDÊNCIAS DA MONTAGEM DE VLPS NO CITOPLASMA DOS CLONES DE *P. pastoris* EXPRESSANDO L1

Clones de *P. pastoris* expressando a proteína L1 foram empregados em ensaios de microscopia eletrônica de transmissão para investigação quanto à montagem de VLPs no citoplasma das leveduras. As análises permitiram a visualização de estruturas eletrodensas com tamanho estimado em 55 nm, como esperado para as VLPs de HPV (figura 23). Tais partículas localizaram-se próximo ao complexo de membranas do retículo endoplasmático, dentro de corpos autofágicos (de maneira livre ou aparentemente interagindo com as membranas vesiculares) ou mesmo transitando próximo a estas estruturas celulares. A presen-

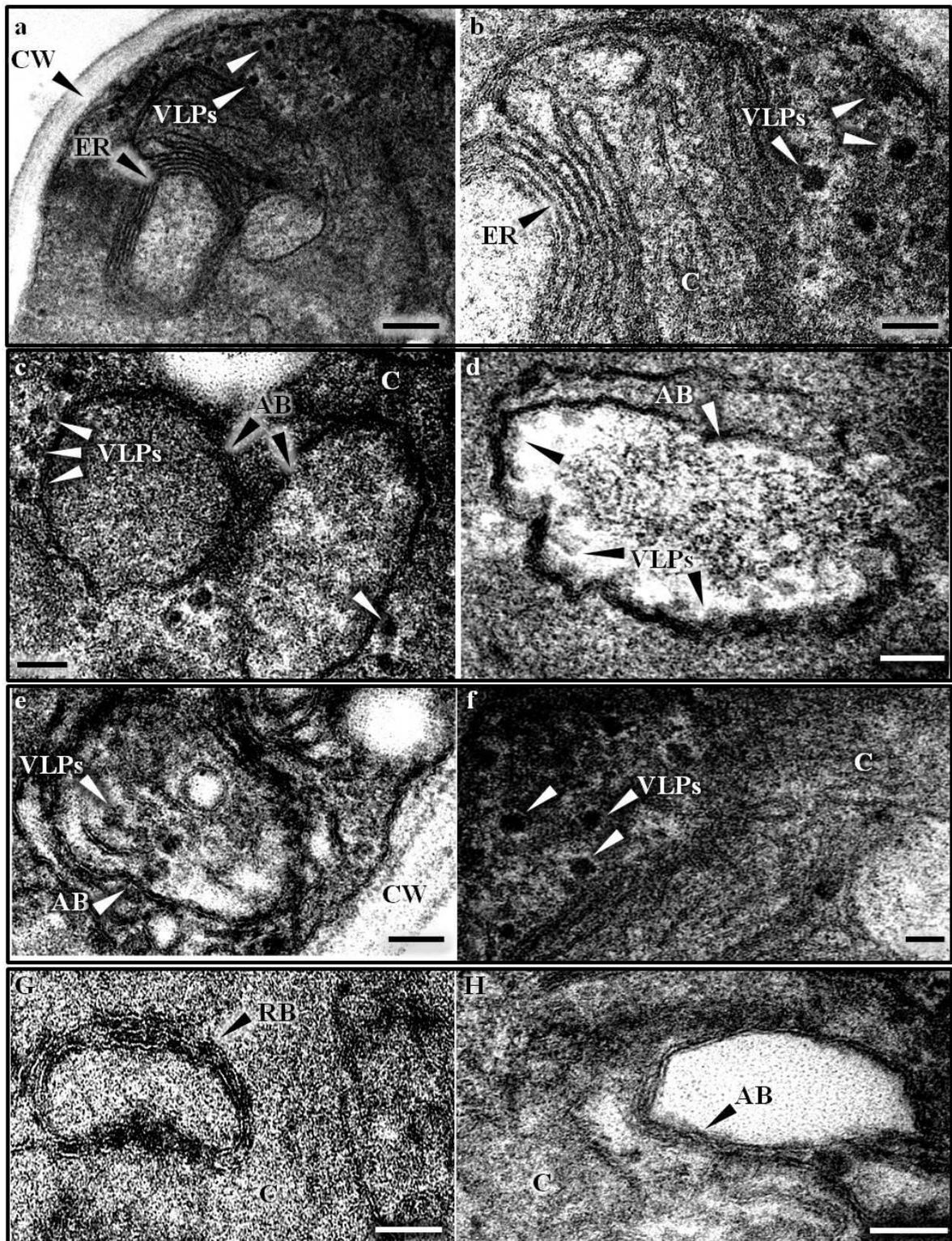


Figura 23. Evidências da montagem espontânea de VLPs no citoplasma dos clones de *P. pastoris* expressando LI sob controle do promotor constitutivo PGK1. (A e B) Estruturas eletrodensas (VLPs) com diâmetro estimado em 55 nm foram observadas próximo às membranas do retículo endoplasmático (ER) de clones analisados. (C-E). As referidas estruturas (VLPs) também foram observadas próximo ou dentro de corpos autofágicos (AB),

sejam livres ou interagindo diretamente com as membranas dessas estruturas. (F) Circunstancialmente, as VLPs também foram encontradas transitando aparentemente livres pelo citoplasma. (G) Estruturas eletrodensas com tamanho estimado em 20 nm e aglomeradas em membranas do ER foram caracterizadas como ribossomos. (H) Partículas similares com 55 nm de diâmetro não foram observadas nas leveduras controle transformadas com o vetor vazio, seja no citosol ou em AB. (Barra = 200 nm em A; 80 nm em B e D, F e H; 100 nm em E; 40 nm em G).

ça de estruturas semelhantes também foi investigada em leveduras utilizadas como controle (transformadas com vetor vazio), não sendo possível observá-las. No entanto, foi notado tanto nos clones quanto nas células controle a presença de estruturas citoplasmáticas circulares e eletrodensas. Essas estruturas foram caracterizadas como ribossomos, tanto pelo menor diâmetro estimado em ~20 nm, quanto pela disposição diferenciada com a qual se aglomeravam nas membranas do retículo endoplasmático.

Uma análise por imunocitoquímica foi conduzida em paralelo para marcação da proteína L1 com CamVir-1 nos clones de *P. pastoris* avaliados por *western blotting*. Todavia, não foi possível visualizar a marcação de partículas similares aquelas descritas na microscopia eletrônica de transmissão, mesmo após diferentes preparações estabelecidas.

6.9 INVESTIGAÇÃO DA MODIFICAÇÃO PÓS-TRADUCIONAL NA PROTEÍNA L2wt EXPRESSA EM *L. tarentolae*

Um conjunto de análises foi desenvolvido para investigação do mecanismo molecular associado à expressão de diferentes isoformas da proteína L2 em *L. tarentolae* (sessão 6.4). Devido a existência de um sítio para SUMOilação na sequência aminoacídica de L2 (lisina 45), de acordo com o preditor GPS-SUMO, investigamos a existência de maquinaria enzimática para realização de tal modificação pós-traducional no protozoário em estudo. As análises *in silico* empregando o genoma sequenciado de *L. tarentolae* (RAYMOND et al., 2012) revelaram a existência de sequências proteicas putativas para as enzimas E1 (formada pelo heterodímero E1a e E1b) e E2 envolvidas na via de SUMOilação, bem como da proteína precursora SUMO (Tabela 3). Quando alinhados contra as sequências ortólogas descritas para *T. cruzi*, as sequências E1b, E2 e SUMO de *L. tarentolae* apresentaram, respectivamente, 61%, 66% e 87% de identidade.

Tabela 3. Análise das sequências de aminoácidos preditas para os genes envolvidos na via de SUMOilação em *L. tarentolae*, de acordo com alinhamento pelo BLASTp.

Proteína (n° de acesso TritypDB)	Massa molecular predita (kDa)	Ortólogos Tripanossomatídeos (n° de acesso TritypDB)	Comparação com ortólogos de Tripanossomatídeos	
			Identidade	E-value
E1a (LtaP28.0380)	30	Tc00.1047053511691.30	38%	8 ⁻⁴⁷
		Tc00.1047053508177.100	37%	2 ⁻⁴⁶
E1b (LtaP08.0220)	114	Tc00.1047053509777.100	61%	2 ⁻⁸⁶
E2 (LtaP02.0320)	24	Tc00.1047053508741.280	66%	4 ⁻⁹⁹
		Tc00.1047053503515.14	65%	1 ⁻¹⁰⁰
SUMO (LtaP08.0450)	12	Tc00.1047053507809.70	87%	2 ⁻⁴⁴

No intuito de caracterizar a localização celular da proteína L2wt, as linhagens de *L. tarentolae* foram cultivadas e empregadas em ensaios por imunofluorescência para marcação da proteína recombinante com anticorpo anti-L2 e do DNA celular com DAPI. Em paralelo, investigamos a identificação dos resíduos de SUMO de *L. tarentolae* conjugados à proteína L2wt a partir do extrato proteico total por *western blotting*, bem como nos protozoários submetidos a imunofluorescência, através do emprego do anticorpo anti-*TcSUMO*. Os resultados obtidos pela imunofluorescência demonstram que, embora L2wt apresente uma localização predominantemente citoplasmática, é possível observá-la também no núcleo dos protozoários (figura 24A). A hibridização com o anti-*TcSUMO* evidenciou uma marcação no espaço perinuclear nos protozoários empregados na imunofluorescência (figura 24B), mas não foi possível observar uma sobreposição clara entre a localização dos resíduos SUMO e da proteína L2wt. Contudo, os dados obtidos por *western blotting* demonstraram a detecção da isoforma com ~97 kDa de L2wt a partir do emprego do anti-*TcSUMO* apenas no extrato proteico dos protozoários recombinantes, não sendo observado nenhum sinal no extrato controle dos protozoários selvagens (figura 24C). Outras proteínas também foram marcadas pelo anti-*TcSUMO* em ambos os extratos proteicos, dentre as quais se destacam aquelas com ~12 kDa, ~35 kDa e ~110 kDa por apresentarem massas moleculares próximas ao que foi predito para as proteínas putativas SUMO, E2 e E1b de *L. tarentolae*.

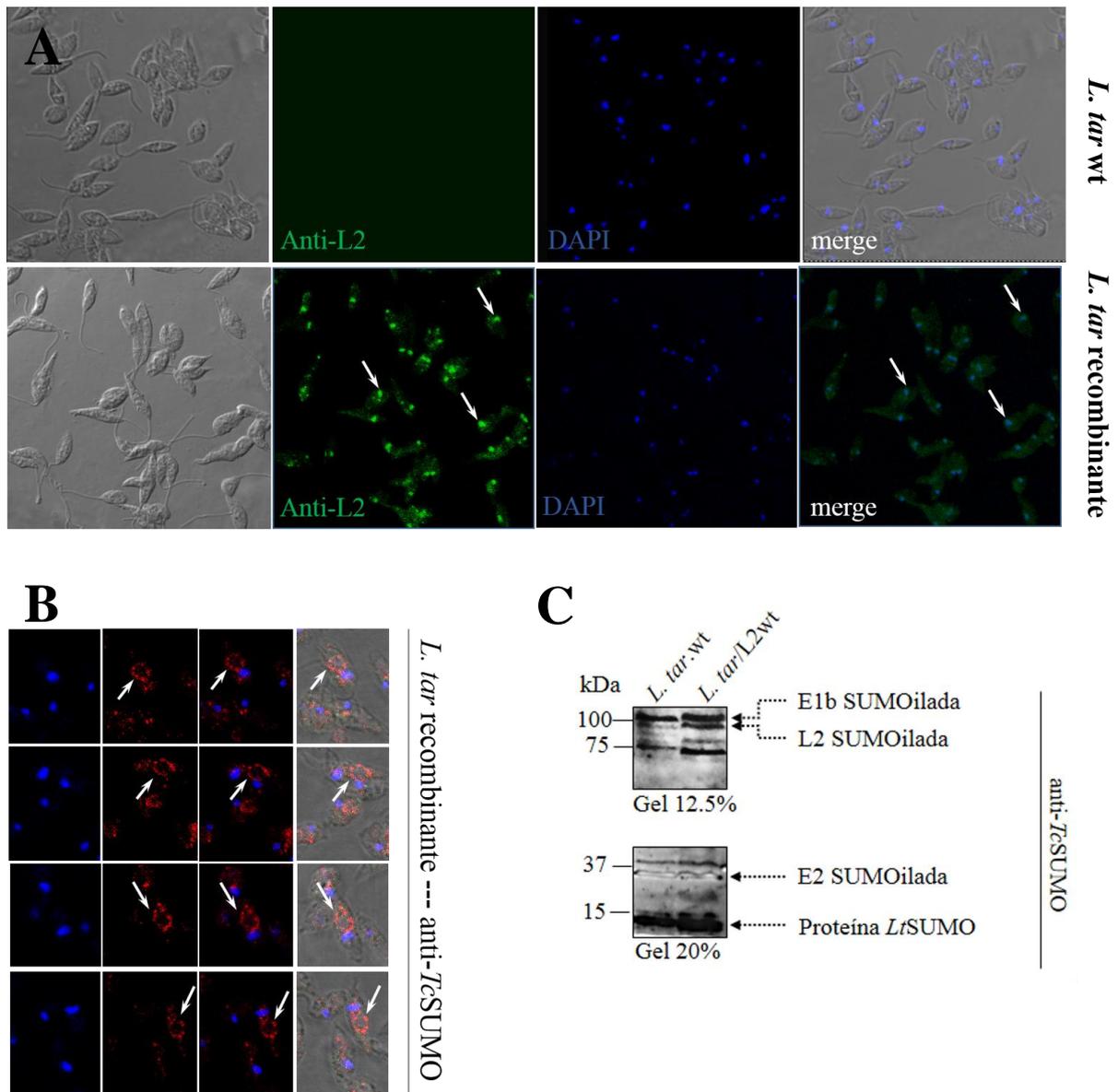


Figura 24. Imunolocalização da proteína L2wt e caracterização de sua modificação pós-traducional em *L. tarentolae*. (A) A marcação de protozoários recombinantes com anti-L2 demonstrou uma dispersão majoritariamente citoplasmática associada a uma presença nuclear para a proteína L2wt (setas brancas). Quando empregado na linhagem selvagem controle, o anti-L2 não revelou nenhuma marcação celular relevante. (B) O padrão de detecção observado a partir dos protozoários recombinantes marcados com o anti-*TcSUMO* revelou uma sinalização proveniente da região perinuclear (setas brancas). (C) O emprego do anti-*TcSUMO* no extrato proteico total dos protozoários durante os ensaios por western blotting permitiu a detecção da isoforma de ~97 kDa da proteína L2wt apenas nas linhagens recombinantes. Todavia, em ambas as linhagens recombinante e selvagens, foi possível marcar a presença de outras proteínas que apresentam massa molecular compatível com o predito para as enzimas E1b e E2 devidamente SUMOiladas, bem como para a proteína SUMO de *L. tarentolae*.

6.10 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS CAPSÔMEROS E VLPs A PARTIR DA EXPRESSÃO EM *L. tarentolae*

Uma combinação de abordagens foi utilizada no intuito de caracterizar estruturalmente a formação de capsômeros e VLPs produzidos em *L. tarentolae*. Inicialmente, o extrato proteico total dos protozoários recombinantes expressando os candidatos vacinais baseados no gene L1 foi empregado em ensaios de sedimentação por ultracentrifugação em gradiente contínuo de sacarose. As análises por *western blotting* utilizando as 12 amostras obtidas a partir do fracionamento dos gradientes evidenciaram um padrão de sedimentação variado para as diferentes proteínas estudadas (figura 25). De maneira geral, observamos a detecção das diferentes versões da proteína L1 nas frações 1-6, mas apenas as proteínas L1wt (coexpressa com L2wt ou não) e L1-E5multi.34 foram sedimentadas nas frações 7-11. O padrão de sedimentação de L2wt também foi avaliado diante de sua coexpressão com L1wt, demonstrando-se a presença da isoforma de ~97 kDa nas frações 1-11, embora de maneira majoritária nas frações 1-6.

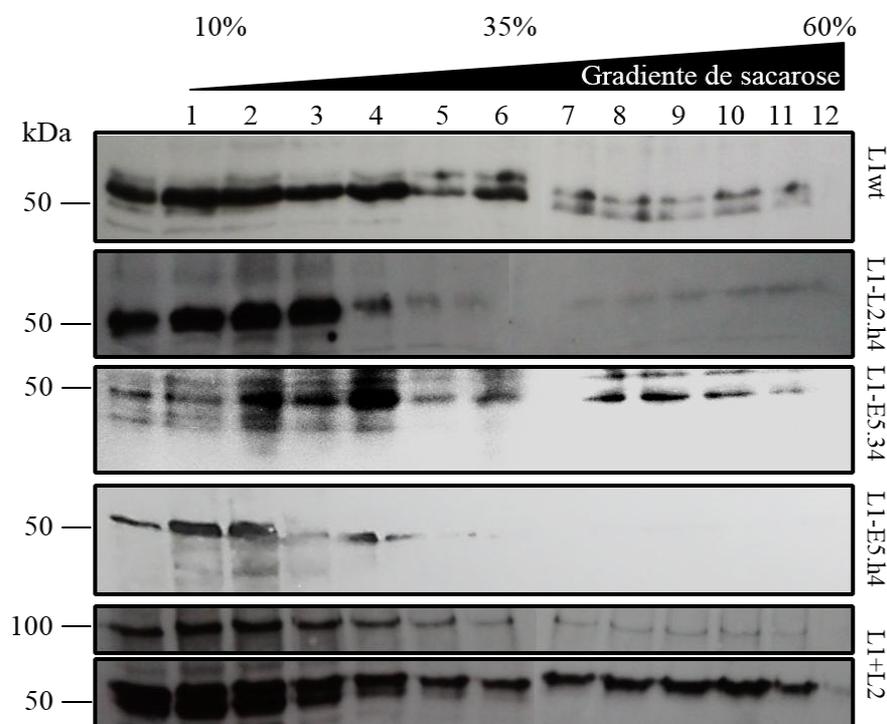


Figura 25. *Western blotting* empregando as frações do gradiente de sacarose para detecção dos candidatos vacinais baseados em L1 produzidos em *L. tarentolae*. O perfil de sedimentação apresentou-se diferenciado para

as diferentes proteínas. Quando expressa na ausência de L2wt, a proteína L1wt dispersa-se majoritariamente nas frações 1-6, ainda que seja possível observá-la também nas frações 7-11 de maneira menos pronunciada. Quando coexpressa com L2wt, observamos uma mudança nesse perfil, e a proteína L1wt apresentou-se mais intensamente nas frações 7-11 (comparativamente ao seu perfil sozinha). Enquanto o perfil de sedimentação da quimera L1-E5multi.34 assemelhou-se ao da proteína L1wt, as quimeras L1-L2 e L1-E5multi.h4 acumularam-se nas frações 1-5, sendo imperceptível suas detecções nas demais frações. A sedimentação da proteína L2wt também foi investigada na presença de L1wt, sendo possível observá-la apenas sob a isoforma de ~97 kDa ao longo das frações 1-11.

A purificação dos candidatos vacinais baseados em L1 mediante emprego de resina heparina-sepharose foi conduzida para investigação da formação de VLPs e capsômeros. Os extratos proteicos totais provenientes das linhagens expressando as proteínas L1wt e L1-L2 foram incubados com a resina e as frações coletadas após lavagem e eluição em gradiente salino foram submetidas a *western blotting* com CamVir-1. Como nota-se na figura 26, grande quantidade da proteína L1wt foi perdida nas etapas de lavagem da resina com baixas concentrações de NaCl, o que justifica sua baixa quantidade obtida nas alíquotas de eluição em gradiente salino. Relativamente à quimera L1-L2, observou-se uma pequena quantidade da proteína nas alíquotas de eluição, tendo a maior parte do material sido perdida nas lavagens.

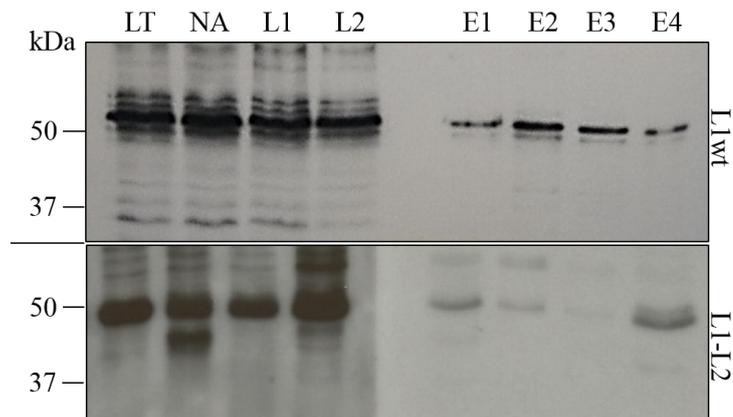


Figura 26. *Western blotting* empregando as frações obtidas a partir da purificação com a resina heparina-sepharose. Como observado no painel superior, ainda que a proteína L1wt tenha sido obtida nas frações de eluição em gradiente salino (E1-4: 0,8 M, 1,2 M, 1,6 M e 2 M de NaCl), a maior parte do material foi perdida nas frações não adsorvida (NA) e de lavagem (L1-2) em tampão contendo 0,5 M de NaCl. Para a quimera L1-L2 (painel inferior), a perda nas frações que precedem a eluição em gradiente salino foi ainda mais pronunciada.

Posteriormente, a caracterização de partículas capsoméricas e VLPs no citoplasma de *L. tarentolae* foi investigada por diferentes técnicas de microscopia. Previamente aos ensaios por microscopia eletrônica de transmissão, os protozoários recombinantes foram submetidos a imunofluorescência confocal com o anticorpo CamVir-1 para marcação dos candidatos vacinais baseados em L1. Como pôde ser observado (figura 27), as diferentes versões recombinantes de L1 expressas em *L. tarentolae* dispersam-se largamente no citoplasma das células investigadas, não havendo acúmulo observável em nenhuma região específica.

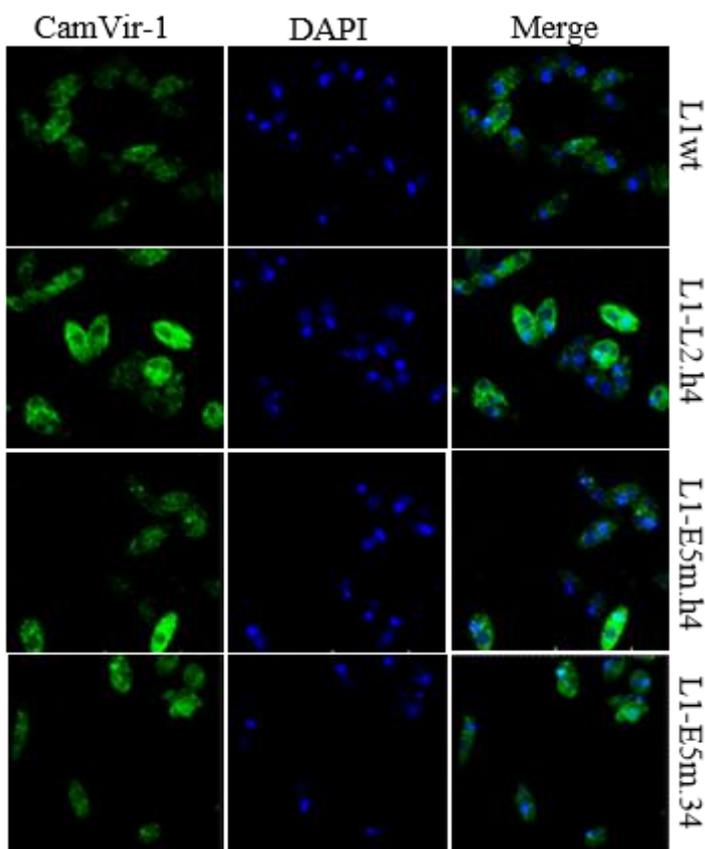
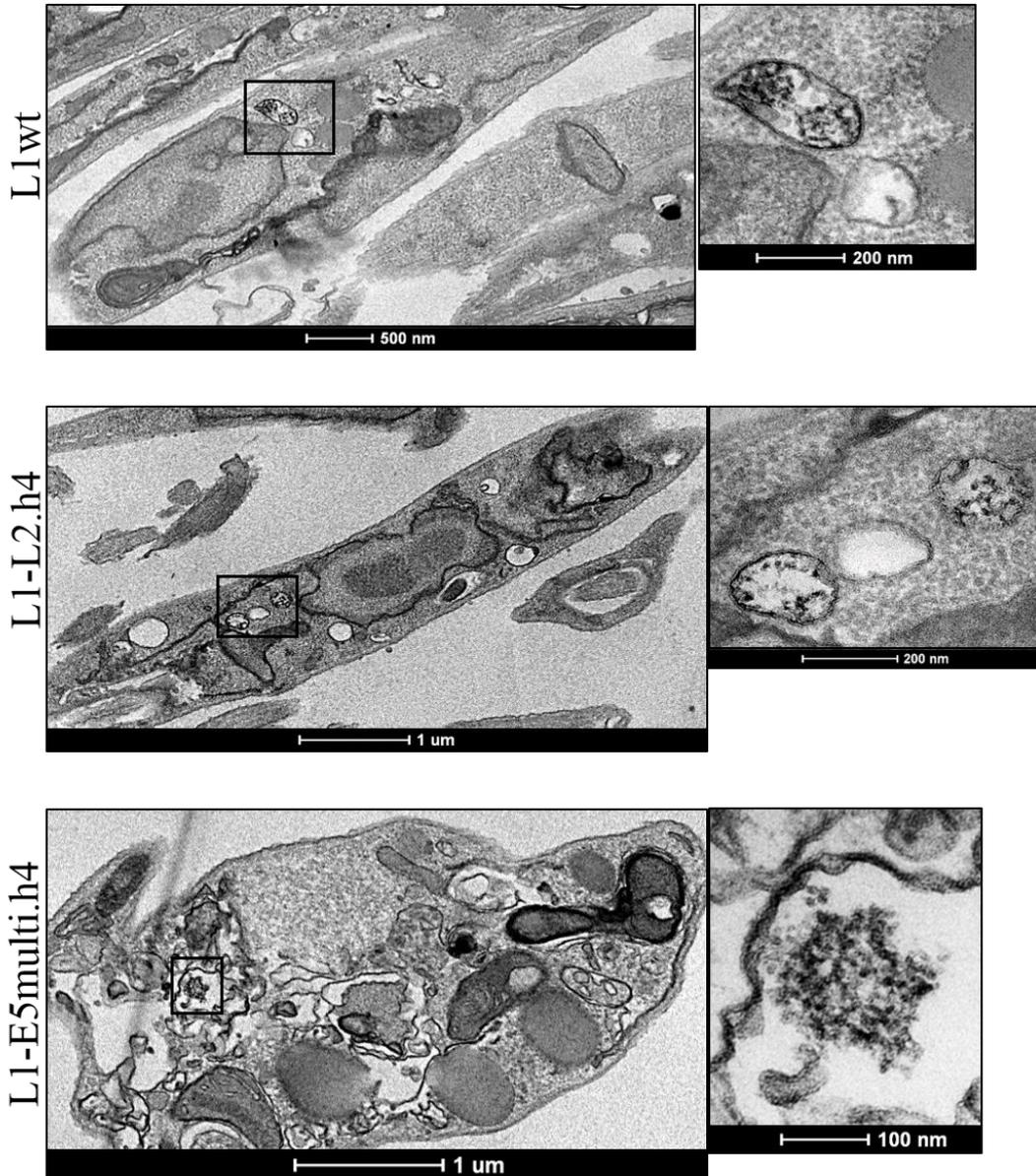


Figura 27. Microscopia de imunofluorescência dos protozoários recombinantes expressando os candidatos vacinais baseados em L1. O emprego do anticorpo CamVir-1 associado a marcação com DAPI demonstrou que a proteína L1wt e as quimeras dispersam-se no citoplasma das células de *L. tarentolae* sem haver uma concentração ou compartimentalização específica.

Paralelamente, os ensaios de microscopia eletrônica de transmissão convencional demonstram a presença de estruturas eletrodensas com tamanho extremamente heterogêneo estimados em 20-50 nm, acumuladas em vesículas citoplasmáticas (figura 28). A observação de tais estruturas limitou-se a um pequeno número de protozoários recombinantes, não estando presente na maioria das células analisadas. Estruturas similares também não foram

observadas no citoplasma de nenhum protozoário selvagem empregado como controle negativo nestas análises.



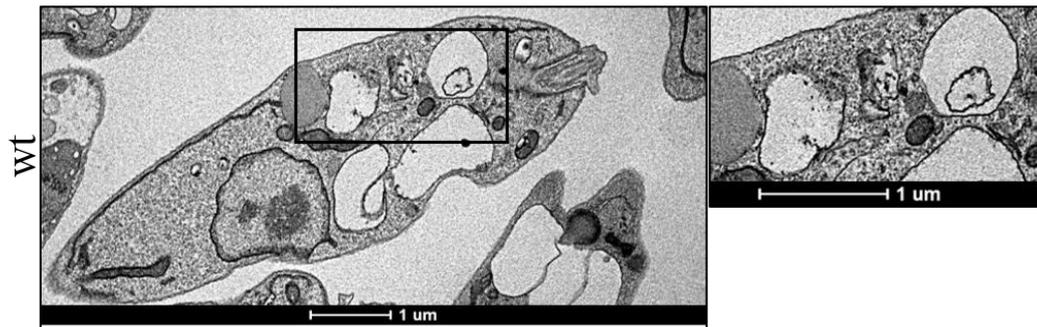


Figura 28. Microscopia eletrônica de transmissão empregando os protozoários recombinantes expressando os candidatos vacinais baseados em L1. Os ensaios demonstraram a presença de agregados eletrodensos com tamanho estimado entre 20-50 nm em algumas das células estudadas (quadrado preto). Tais estruturas acumularam-se especificamente em vesículas citoplasmáticas (ampliadas à direita do painel), não sendo observadas a partir das linhagens selvagens (wt).

Nas análises realizadas por imunocitoquímica, paralelamente, não foi possível demonstrar a formação de capsômeros ou VLPs no citoplasma dos protozoários recombinantes, embora a marcação com as partículas de ouro tenha ocorrido com sucesso (figura 29). As eletromicrografias demonstram uma marcação citoplasmática, eventualmente tendendo ao espaço perinuclear. A especificidade dessa marcação foi monitorada avaliando-se o emprego do CamVir-1 na linhagem selvagem e a complexação das partículas de ouro ao DNA genômico ou kinetoplastidial dos protozoários recombinantes.

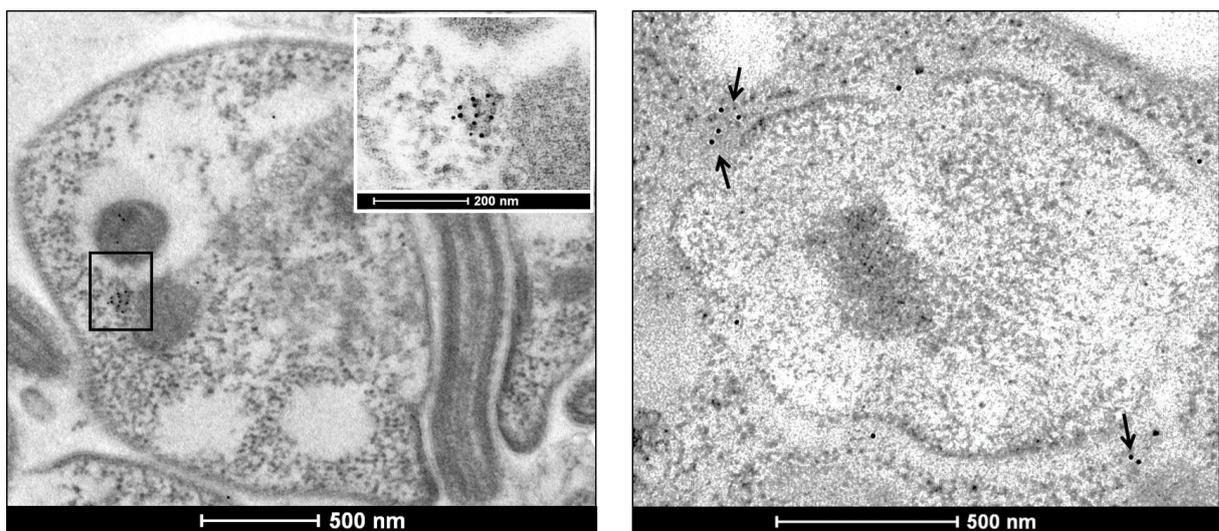


Figura 29. Imunocitoquímica com o CamVir-1 empregando as linhagens de *L. tarentolae* recombinantes. As imagens reproduzidas são representativas de diferentes experimentos. A marcação das proteínas demonstrou uma

localização citoplasmática (painel à esquerda) nas células investigadas, não sendo possível observar estruturas sugestivas de partículas montadas. Eventualmente, esta marcação também foi vista no espaço perinuclear de maneira mais pronunciada (painel à direita, setas pretas).

7. DISCUSSÃO

No presente trabalho, propomos o desenvolvimento de duas diferentes plataformas biotecnológicas para produção de antígenos vacinais do HPV e BPV, as quais baseiam-se no protozoário *L. tarentolae* e na levedura *P. pastoris*. Como base experimental para tal, desenvolvemos diferentes sistemas genéticos para expressão heteróloga nos referidos organismos. Particularmente para o sistema baseado em *L. tarentolae*, também desenvolvemos candidatos vacinais focados em distintas estratégias de imunização. Um conjunto de abordagens experimentais foi utilizado tanto para análise da expressão quanto para caracterização dos antígenos recombinantes produzidas em ambos os sistemas. Eventualmente, as estratégias de análise experimental foram redesenhadas para compreender e caracterizar achados inesperados, seja à luz do ineditismo dos mesmos ou em decorrência de trabalhos publicados no decorrer desta tese. A discussão dos nossos estudos será abordada a seguir, contextualizando os dados de cada plataforma em separado.

As leveduras metilotróficas têm sido exploradas como atrativas alternativas no estabelecimento de plataformas vacinais de baixo custo para produção de VLPs. Nosso grupo emprega *P. pastoris* não apenas para produção de candidatos vacinais contra o PV (COIMBRA et al., 2011; JESUS et al., 2012), mas também para produção de antígenos virais outros com fins diagnóstico (DE ARRUDA COUTINHO et al., 2013; SILVA et al., 2014). Apesar do sistema genético baseado no promotor P_{AOX1} de *P. pastoris* ser largamente explorado para expressão heteróloga (incluindo os trabalhos do grupo citados) em virtude de sua eficiência, optamos por explorar, em colaboração com Prof. Dr. Fernando Araripe (Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília), o estabelecimento de uma plataforma alternativa baseada no promotor constitutivo PGK1 de *P. pastoris* para produção de antígenos com fins vacinais, baseando-se em sistemas já descritos para outras espécies de leveduras (FLEMING; LITTLECHILD, 1997). O sistema genético estabelecido neste trabalho representa uma otimização daquele originalmente caracterizado por De Almeida; De Moraes; Torres (2005), sendo a sequência promotora uma variante reduzida para ~0,4 kb. Isso facilita significativamente as clonagens no vetor de expressão, considerando o fragmento previamente descrito com ~2 kb.

Tendo como ponto de partida experimental a manipulação do sistema genético previamente construído para secreção da proteína L1 no meio de cultura (COIMBRA, 2012;

MARIZ, 2012), neste trabalho retiramos o peptídeo sinal de secreção (fator- α) do sistema genético afim de avaliar a expressão intracelular da referida proteína. Apesar da recombinação com sistema pPGK Δ 3-L1H16 conferir aos clones de *P. pastoris* resistência a Zeocina, isso não assegura a expressão heteróloga sob altos níveis. Nesse sentido, submetemos os transformantes primários (selecionados em 100 ug/ml do Zeocina) a um processo para amplificação do número de cópias do sistema genético integrado ao genoma (*Posttransformational Vector Amplification*, PTVA), obtendo clones resistentes a 500, 1000 e 2000 ug/ml do antibiótico. A seleção de clones com múltiplas cópias do sistema genético integrado ao genoma representa uma estratégia para aumentar os níveis de expressão, considerando que o grau de resistência a Zeocina pode ser diretamente correlacionado o número de cópias do sistema genético integrado (SUNGA; TOLSTORUKOV; CREGG, 2008). De acordo com Sunga; Tolstorukov; Cregg, (2008), a resistência 2000 ug/ml de Zeocina resulta da integração de 4 cópias do sistema genético ao genoma das leveduras.

A varredura por *dot blotting* dos clones com múltiplas cópias demonstrou sinais de detecção da proteína L1 visualmente intensos e homogêneos a partir de praticamente todos os clones investigados, ao contrário do que se observa nas análises de expressão empregando transformantes primários (LIN-CEREGHINO; CREGG, 2000). Acreditamos ser importante salientar que esse fluxograma de análise representa uma estratégia rápida e prática para obtenção de clones com elevados níveis de expressão através de condições de cultivo sub-ótimas (com relação ao volume, agitação e aeração das culturas) como é o caso do crescimento em placas *deep-well*.

Ainda que seja um importante dado preliminar, os ensaios de varredura desenvolvidos não caracterizam a proteína L1 de acordo com sua massa molecular. A confirmação da expressão constitutiva e intracelular de L1 sob regulação do P_{PGK1} em *P. pastoris* se deu a partir de *western blotting* empregando os extratos proteicos totais de clones cultivados em frascos por 3 dias. Cabe aqui uma importante contextualização deste trabalho à luz da literatura. Bazan et al. (2009) relataram pioneiramente a expressão da proteína L1 de HPV16 em *P. pastoris* sob níveis superiores aos relatados em *S. cerevisiae*. Apesar de inovador e importante por demonstrar a viabilidade de *Pichia* na produção de VLPs de HPV, o trabalho conduzido por Bazan e colegas empregou um sistema genético episossomal baseado no P_{AOX1}. Para propósitos industriais, o emprego de sistemas episossomais não é recomendado devido à sua instabilidade genética e necessidade de contínua seleção com antibiótico para manutenção

dos sistemas (ROMANOS; SCORER; CLARE, 1992; DALY; HEARN, 2005). Posteriormente, outros trabalhos foram publicados buscando contornar esse inconveniente, todos utilizando sistemas integrativos baseados no P_{AOX1} (COIMBRA et al., 2011; HANUMANTHA RAO et al., 2011; JIANG et al., 2011).

Apesar de eficiente, o sistema AOX1 de *P. pastoris* possui importantes inconvenientes quando se vislumbra, novamente, produção em escala industrial. Segundo o modelo atualmente aceito, ao ser induzido pelo metanol, o P_{AOX1} dirige a expressão da enzima AOX, a qual catalisa a conversão do metanol em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e formaldeído. A baixa afinidade da AOX pelo oxigênio é compensada pela expressão em altos níveis desta enzima (30% do conteúdo de proteínas solúveis totais) (LIN-CEREGHINO; CREGG, 2000; CEREGHINO et al., 2002). Tem-se aqui o primeiro inconveniente. A expressão sob controle do P_{AOX1} é rigidamente regulada a nível transcricional, obedecendo dois mecanismos: (i) repressão, quando as leveduras são cultivadas em glicose e outras fontes de carbono que não o metanol e, portanto, não há transcrição a partir deste promotor; (ii) indução, no qual as leveduras são cultivadas em metanol e, assim, quase 5% do RNA poli-A⁺ provém deste promotor (CEREGHINO et al., 2002). Por isso, a produção de proteínas recombinantes por meio deste sistema depende de um esquema de cultivo em duas fases: geração de biomassa a partir de cultivo em glicose ou glicerol por 2-3 dias; indução da expressão a partir de cultivo em metanol (MACAULEY-PATRICK et al., 2005). Isso impõe um período relativamente longo de cultivo para obtenção de proteínas recombinantes de interesse. Em segundo lugar, o cultivo em metanol deve ser mantido em concentrações baixas, haja visto que a metabolização de tal composto acarreta a liberação de radicais tóxicos para a célula. Portanto, os níveis de metanol devem ser rigidamente monitorados. Por último, o metanol é um composto altamente inflamável, de maneira que seu emprego a partir de plantas de produção em larga escala é um inconveniente (VASSILEVA et al., 2001; CEREGHINO et al., 2002).

Traçando-se um paralelo com o sistema proposto neste trabalho, a expressão da proteína L1 pode ser obtida constitutivamente, através de um protocolo mais simples e menos laborioso. O esquema de cultivo é conduzido em fase contínua sem necessidade de troca de meio de cultura nem rígido controle da aeração ou concentração de glicose. Adicionalmente, trata-se de um sistema desenvolvido *in house* e, portanto, livre de pagamento de *royalties*. Por fim, ainda que alguns trabalhos tenham relatado instabilidade genética quando clones com múltiplas cópias do cassete foram induzidos com metanol, ou mesmo toxicidade quando

proteínas exógenas são expressas constitutivamente, não observamos dados similares a partir de nossos experimentos. A expressão de L1 foi detectada com sucesso por *western blotting* após aproximadamente 90 gerações, mesmo na ausência de Zeocina. Todavia, acreditamos que uma análise mais detalhada seja conveniente sobre o assunto.

A demonstração de que a proteína L1 é capaz de automontar-se em VLPs quando expressa em *P. pastoris* abre perspectiva para emprego deste organismo como vetor vacinal contra o HPV. Esta levedura tem o status GRAS (*Generally Recognized As Safe*) pelo FDA (*Food and Drug Administration*) e foi demonstrada como eficiente veículo para entrega de antígenos virais pela via intramuscular e oral (TAGHAVIAN et al., 2013). As eletromicrografias demonstradas neste trabalho provém evidências de estruturas compatíveis com VLPs de HPV no citoplasma dos clones analisados. Não tivemos êxito, no entanto, na marcação dessas estruturas por imunocitoquímica. Em relatos anteriores, Falcón et al. (1999) demonstraram dificuldade semelhante na detecção de VLPs do vírus da hepatite C (HCV) a partir do citoplasma de *P. pastoris*, mesmo através do emprego de anticorpos monoclonais ou soro reativo de humanos e apesar da visualização das partículas por eletromicroscopia convencional. Em concordância com nossa ideia de explorar *P. pastoris* como vetor vacinal contra o câncer cervical, recentemente Bolhassani et al. (2014) relataram sucesso na proteção contra o HPV16 através da imunização de camundongos com leveduras desta espécie expressando L1.

Considerados todos os achados obtidos para a plataforma baseada no P_{PGK1} de *P. pastoris*, a seguir abordaremos os estudos para desenvolvimento de candidatos vacinais a partir de *L. tarentolae*.

O emprego de *L. tarentolae* como modelo para estudos bioquímicos e de biologia molecular de Tripanossomatídeos é bem estabelecido, mas apenas nos últimos anos este protozoário passou a ser explorado extensivamente como sistema recombinante. Os trabalhos de Breton et al. (2007), Soliemani et al. (2007), Padmanabhan et al. (2012) e Baechlein et al. (2013) foram explorados como base teórica para construção dos sistemas genéticos empregados em *L. tarentolae*. Tais sistemas empregam sequências sinalizadoras para processamento do mRNA em *Leishmania*: um trato de polipirimidina (Y) responsável pela montagem do spliceossomo; e a região intergênica não traduzida do gene da α -tubulina (α), uma proteína altamente expressa nesses organismos, também importante para o processamento pós-transcricional do mRNA. O emprego dessas sequências é fundamental

para dirigir a expressão de genes sob elevados níveis em Tripanossomatídeos, visto que a regulação gênica ocorre principalmente a nível pós-transcricional nesses organismos.

Uma terceira região, a ORF BT1, também foi empregada em um dos sistemas genéticos para permitir a integração dos cassetes no genoma dos protozoários. A expressão heteróloga a partir de um sistema integrativo representa uma estratégia fundamental para desenvolvimento de uma plataforma biotecnológica para fins vacinais, visto a maior estabilidade genética proporcionada (ROMANOS; SCORER; CLARE, 1992; DALY; HEARN, 2005). Todavia, o emprego de sistemas episomais apresentam, dentre outras, duas principais vantagens: (i) simplicidade na geração das linhagens recombinantes, já que os cassetes são empregados circularizados para transfecção; rapidez nas análises de expressão, considerando que, geralmente, várias cópias do cassete são inseridas nos transfectantes e não há necessidade de fazer uma varredura por altos níveis de expressão. Compreendendo que há vantagens e desvantagens a serem consideradas para ambas as estratégias, neste trabalho optamos pelo emprego de sistemas episomais porque buscamos avaliar, inicialmente, a viabilidade de *L. tarentolae* como hospedeiro para expressão dos antígenos em estudo.

A escolha dos candidatos vacinais teve como justificativa inicial uma eventual comparação da expressão do gene L1 com o sistema paralelamente desenvolvido para *P. pastoris*. No entanto, ao longo do trabalho o Ministério da Saúde anunciou um acordo com a Merck para compra de vacinas profiláticas Gardasil e transferência de tecnologia para produção da referida vacina pelo Instituto Butantan. Tal acontecimento nos motivou a repensar o desenho dos candidatos no sentido de diversificar as análises em *L. tarentolae* e as estratégias vacinais. Portanto, exploramos o desenvolvimento de quimeras baseadas no gene L1 tendo como lastro referencial os seguintes trabalhos: Bishop; Dasgupta; Chen, (2007) e Schadlich et al. (2009), onde demonstra-se que a alça h4 de L1 pode ser empregada para produção de partículas capsoméricas e que a região C-terminal de L1 pode ser deletada sem comprometer a formação de VLPs; Liu et al. (2000) e Chen et al. (2004), que exploraram com sucesso o emprego de E5 de HPV como antígeno terapêutico; e Rubio et al. (2011), que determinaram a imunogenicidade cruzada do epitopo 56-75 de L2. Vislumbramos, assim, o desenvolvimento de capsômeros quiméricos com propriedades profiláticas de largo espectro (L1-L2) e profilático-terapêutica (L1-E5multi.h4), assim como de VLPs quiméricas com propriedades também profilático-terapêutica (L1-E5multi.34). Em paralelo, dado o relato prévio de Breton et al. (2007), cujos trabalhos empregaram pioneiramente *L. tarentolae* como

vetor vacinal contra o HIV em modelo murino, protozoários recombinantes expressando a proteína L2 inteira de HPV16 ou diferentes candidatos baseados em E5 de HPV16 e BPV1, foram desenvolvidas visando a avaliação de vetores vacinais de largo espectro e terapêuticos contra o câncer cervical e contra a papilomatose bovina. A produção de VLPs baseadas em L1 e L2 tem o objetivo de, posteriormente, viabilizar a obtenção de pseudovírus para estratégias de imunização envolvendo vacina de DNA, outra linha de pesquisa desenvolvida pelo grupo. Nenhum dos genes investigados apresenta códons otimizados para expressão em *L. tarentolae*, como relatado previamente por outros autores (BRETON et al., 2007; SOLEIMANI et al., 2007; BAECHLEIN et al., 2013).

As análises por *western blotting* demonstraram a expressão dos candidatos vacinais baseados em L1 a partir dos protozoários recombinantes, confirmando o sucesso na obtenção dos sistemas genéticos e salientando a atratividade deste hospedeiro para expressão de genes heterólogos sem a necessidade de otimização de códons. O padrão de migração diferencial observado após estratificação em SDS-PAGE está de acordo com as modificações realizadas no esqueleto proteico de L1: enquanto a proteína L1wt apresentou massa molecular de 56 kDa como esperado, as quimeras L1-L2 e L1-E5multi.h4 demonstraram uma massa molecular um pouco menor, compatível com a inserção de porções menores do que a alça h4; a proteína L1-E5multi.34 apresentou a menor massa de todas, em concordância com a substituição da porção C-terminal (34aa) de L1 pela construção E5multi (24aa).

Para os candidatos vacinais baseados em E5, no entanto, as análises sugeriram uma marcante heterogeneidade nos níveis de expressão. Enquanto a proteína E5B1 foi detectada com sucesso a partir das diferentes estratégias de cultivo empregadas, a detecção da proteína E5otH16 somente foi possível quando os protozoários recombinantes foram submetidos a cultivo em concentrações aumentadas de neomicina – estratégia explorada para induzir um aumento no número de cópias do cassete de expressão nos protozoários recombinantes. Ainda assim, os ensaios por *western* demonstram que essa detecção ocorreu de maneira transitória. Em contrapartida, a detecção da proteína E5multi não foi possível em nenhuma das análises realizadas. Diferentes abordagens demonstraram que as linhagens recombinantes possuíam os cassetes de expressão de interesse: a proteína neomicina-fosfotransferase, codificada pelos sistemas genéticos desenvolvidos, foi detectada por *western blotting*; os genes E5otH16 e E5multi foram amplificados a partir das amostras de DNA total dos protozoários cultivados; a transcrição dos referidos candidatos foi confirmada por *northern blotting*. Acreditamos que,

em conjunto, os dados sugerem duas possíveis situações: (i) os mRNAs detectados por *northern* não são traduzidos eficientemente, qualquer que seja o motivo; (ii) as proteínas em questão são instáveis e rapidamente dirigidas para degradação.

Interessantemente, a proteína L2wt apresentou diferentes isoformas quando expressa em *L. tarentolae*, as quais foram detectadas através de um conjunto de anticorpos monoclonais. Baseando-se nos trabalhos de Marusic et al. (2010) e Bund et al. (2014), os quais relatam a identificação de isoformas similares para L2 em células de mamíferos, passamos a investigar a ocorrência de uma modificação pós-traducional em L2wt denominada SUMOilação, a qual corresponde à adição de pequenos modificadores semelhantes a ubiquitina (*Small Ubiquitin-like Modifier*, SUMO). As proteínas SUMO estão conservadas e são ubiqüamente expressas em eucariotos, mas estão ausentes em procariotos e archaea (GAREAU; LIMA, 2011). A SUMOilação ocorre através de uma via de conjugação em três etapas (de maneira similar a ubiquitinação), resumidas como segue: processamento de um precursor SUMO por proteases específicas (Ulp/SENp); ativação da proteína SUMO por uma enzima denominada E1 (heterodímero E1a/E1b); conjugação da proteína SUMO ativada para uma proteína alvo (substrato) contendo motivos consenso de SUMOilação, etapa catalisada pela enzima E2. A reação final de conjugação também pode ser assistida por uma enzima denominada E3 ligase (GAREAU; LIMA, 2011; IRIBARREN et al., 2015).

A partir da investigação dos componentes da via de SUMOilação em tripanossomatídeos mediante inspeções via PSI-BLASTp, uma proteína SUMO putativa de *L. tarentolae* (*LtarSUMO*) foi identificada compartilhando 87% de similaridade com seu ortólogo em *T. cruzi* (BAYONA et al., 2011). Outras sequências putativas para a subunidade E1b e enzima E2 de *L. tarentolae* também foram identificadas compartilhando em torno de 65% de identidade com ortólogos de *T. cruzi*. Com base nessas análises, buscamos acessar a localização subcelular de L2wt quando expressa em *L. tarentolae*, visto que a maquinaria de SUMOilação em *T. cruzi* está localizada no núcleo. Por imunofluorescência, demonstramos que a proteína L2wt apresenta uma dispersão citoplasmática associada a uma marcante concentração nuclear, o que corrobora com a suposição de que esta proteína estaria sendo SUMOilada.

Baseado nesses dados, exploramos o emprego do anticorpo anti-*TcSUMO* para caracterização dos componentes da via de SUMOilação e da isoforma de L2wt nos protozoários recombinantes. Não conseguimos demonstrar a marcação da proteína L2wt por

imunofluorescência com o referido anticorpo. Especulamos que a disposição conformacional do resíduo de SUMO na proteína L2wt não favoreça seu reconhecimento pelo anti-*Tc*SUMO. Ainda assim, as análises demonstraram um padrão de marcação supostamente do envoltório nuclear nos protozoários avaliados, o que estaria de acordo com relatos referentes à localização das enzimas do ciclo de SUMOilação nos complexos de poros nucleares (*nuclear pore complexes*, NPCs) (ZHANG; SAITOH; MATUNIS, 2002; MELCHIOR; SCHERGAUT; PICHLER, 2003; PALANCADE; DOYE, 2008). Os ensaios por *western*, no entanto, permitiram a identificação de proteínas com massa molecular condizentes à *Ltar*SUMO (12 kDa) e E2 devidamente SUMOilada (35 kDa). Acreditamos que uma terceira proteína, com 114 kDa, se trata da subunidade E1b, com uma massa molecular diferente do predito mas em concordância com o descrito para seu ortólogo E1b já caracterizado em *T. brucei* (YE et al., 2015). Tão relevante quanto esses achados foi a detecção da isoforma com 97 kDa de L2wt, corroborando com todas as análises descritas anteriormente. Essas evidências, em conjunto, apontam para a expressão de uma proteína L2 SUMOilada em *L. tarentolae*, de maneira similar ao descrito em células de mamíferos.

Ao longo dos trabalhos, investigamos a formação das partículas capsoméricas e VLPs em *L. tarentolae* a partir da expressão dos candidatos vacinais baseados em L1. A caracterização das partículas mediante ultracentrifugação em gradiente de sacarose demonstrou um perfil de sedimentação diferencial para os candidatos, novamente em consonância com as modificações propostas nas quimeras. Tomando-se como base os trabalhos de Schadlich et al. (2009) e Bund et al. (2014), os resultados demonstram que a proteína L1wt é capaz de montar-se em VLPs quando expressa exclusivamente nas linhagens de *L. tarentolae* recombinantes. Porém, a maior parte das proteínas se acumulam em um estado capsomérica ou de agregados subparticulares. Mas a formação das VLPs é notadamente enriquecida quando L1wt e L2wt são coexpressas nos protozoários, muito provavelmente em decorrência da maior estabilidade proporcionada pela interação entre as proteínas capsidiais. De significativa relevância é o fato de que apenas a isoforma SUMOilada de L2wt (97 kDa) foi detectada, demonstrando que tal modificação não interfere na associação com L1wt para formação de VLPs como relatado por Bund et al. (2014). A diminuição no sinal de detecção da proteína L2wt, em comparação com aquele observado para L1wt, se deve ao menor número de cópias presentes nas VLPs montadas (relação de 1:5).

Em paralelo, o perfil de sedimentação das quimeras L1-L2 e L1-E5multi.h4 denota que tais proteínas são incapazes de automontar-se em VLPs, acumulando-se na forma de capsômeros. Tal característica é resultado direto da substituição da alça h4, região essencial para estabilização das interações intercapsoméricas na formação das VLPs (BISHOP; DASGUPTA; CHEN, 2007; SCHÄDLICH et al., 2009). No caso do epítipo 56-75 de L2, por exemplo, o fato de ser derivado de uma região de folha beta predita como envolvida em um domínio transmembranar (WANG; RODEN, 2013) deve corroborar no impedimento das ligações intercapsoméricas necessárias para formação de VLPs. A inserção dos epítipos 56-75 de L2 e E5multi na referida região busca a geração de capsômeros quiméricos capazes de diversificar a resposta imunológica e aumentar a imunogenicidade dos referidos epítipos (SCHÄDLICH et al., 2009). O perfil de sedimentação apresentado pela quimera L1-E5multi.34, por outro lado, é similar ao de L1wt e, portanto, condizente com a formação de VLPs quiméricas. Além de não interferir na formação de VLPs, a deleção dos últimos 34 resíduos C-terminais de L1 torna a proteína mais solúvel (SCHÄDLICH et al., 2009). Apesar desta porção proteica não constituir uma região naturalmente apresentadora de epítipos, acreditamos que a presença do espaçador AAY (alanina-alanina-tirosina) na construção E5multi proporcionará eficientemente a apresentação dos epítipos de E5 pela indução da degradação via proteassomo (VELDERS et al., 2001; WANG et al., 2004; DE OLIVEIRA et al., 2015).

A capacidade da proteína L1 de interagir com a heparina sob determinadas concentrações salinas foi aplicada para caracterização estrutural dos capsômeros e VLPs mediante purificação em resina heparina-sepharose. Ainda que não se saiba a natureza exata dessa interação, diferentes trabalhos indicam que a configuração conformacional de L1 é determinante para tal visto que apenas capsômeros e VLPs interagem com a heparina mas não é possível purificar monômeros livres a partir dessa abordagem (ROMMEL et al., 2005; WANG et al., 2005). Nessa linha de raciocínio, os dados obtidos neste trabalho suportam a ideia de que os capsômeros e VLPs formados a partir dos candidatos vacinais explorados em *L. tarentolae* são estruturalmente instáveis e heterogêneos, em virtude da baixa concentração de proteínas eluídas em gradiente salino. Estando a maior parte das proteínas L1wt e L1-L2 nas frações não adsorvidas e de lavagem, a ligação das partículas a heparina ficou comprometida muito provavelmente porque os resíduos de aminoácidos necessários para tal não foram adequadamente expostos na superfície das partículas. Não ficou claro se a

instabilidade dessas partículas é intrínseca às versões da proteína L1 expressas em *L. tarentolae* ou se é decorrente das preparações realizadas ao longo deste trabalho. Suportando nossa interpretação, Bolhassani et al. (2014) demonstraram que o emprego de *L. tarentolae* expressando a proteína L1 como vetor vacinal falhou em promover proteção contra infecção pelo HPV em modelo murino. A caracterização de capsômeros ou VLPs não fez parte do escopo dos autores, mas acreditamos que haja uma relação entre os resultados demonstrados em ambos os trabalhos. De qualquer forma, a recente produção de VLPs quiméricas do vírus da hepatite B (HBV) e C (HCV) em *L. tarentolae* (CZARNOTA et al., 2016) demonstra que mais análises são necessárias para conclusão dos nossos resultados, ainda que as proteínas L1 e sHBsAg (pequeno antígeno de superfície do HBV, *small Hepatitis B virus Antigen*) apresentem características bioquímicas distintas.

Ainda que as análises *in silico* por modelagem sugeriram que as modificações feitas nas quimeras de L1 não perturbem a correta montagem dos monômeros, é razoável salientar que estes resultados não são conclusivos. A validação global dos modelos aponta para a necessidade de maiores refinamentos nas estruturas obtidas, uma vez que alguns dos critérios avaliados não atingiram valores aceitáveis (**Apêndice**). É preciso ponderar o fato de que tais resultados foram obtidos por modelagem comparativa mediante emprego de uma estrutura cristalográfica de razoável resolução (3,5 Å), mesmo que esta represente a melhor escolha para tal. Métodos de modelagem proteica *de novo* (ou *ab initio*), aplicadas especificamente às regiões inseridas nas quimeras, poderiam contribuir substancialmente para o melhoramento dos modelos estruturais. Assim, infelizmente os dados de modelagem não contribuem substancialmente para a interpretação da estabilidade observada nas VLPs e capsômeros, mas são informações relevantes para a continuidade dos ensaios de imunogenicidade por sugerirem que as proteínas mantêm uma conformação estrutural próxima do seu estado nativo, o que promoveria a correta apresentação dos antígenos estudados.

A caracterização estrutural das partículas prosseguiu por meio de ensaios de microscopia eletrônica de transmissão. Baseando-se nos estudos por imunofluorescência – a partir dos quais os candidatos vacinais foram marcados ao longo do citoplasma pelo CamVir-1 - a elétron-microscopia foi conduzida na busca de partículas no citoplasma dos protozoários. Nas eletromicrografias, contudo, notamos a presença de estruturas eletrodensas compatíveis com o tamanho de VLPs e capsômeros apenas em vesículas citoplasmáticas. Enquanto a marcação por imunocitoquímica corroborou para a localização citoplasmática das proteínas

baseadas em L1, não é possível afirmar que visualizamos capsômeros ou VLPs devidamente marcadas. Eventualmente, ficou evidente a presença dos candidatos vacinais no espaço perinuclear de alguns protozoários analisados.

A interpretação desse conjunto de evidências obtidas por microscopia eletrônica é desafiadora e, na nossa compreensão, carece de mais análises. É possível que as várias passagens de cultivo realizadas ao longo dos experimentos tenham diminuído consideravelmente a expressão dos candidatos vacinais baseados em L1, visto que essa é uma importante desvantagem de sistemas episomais. Se esse for o caso, isso comprometeria consideravelmente a formação das partículas para análise via microscopia eletrônica porque a concentração da proteína L1 parece ser determinante para tal, como hipotetizado por Biemelt et al. (2003). Adicionalmente, embora Thones et al. (2008) e Kim et al. (2012) tenham empregado o CamVir-1 com sucesso para detecção de capsômeros e VLPs, este anticorpo reconhece um epitopo linear (204-210) na proteína L1 que é exposto nas partículas mas pode também ser reconhecido no monômero ainda desmontado, dado seu reconhecimento independente de conformação. É possível que esta seja a explicação para os resultados obtidos na imunocitoquímica.

Em conjunto, os dados apresentados neste trabalho demonstram o desenvolvimento de duas inovadoras plataformas biotecnológicas para produção de antígenos vacinais contra o HPV e BPV. Salientamos o ineditismo das abordagens exploradas: o emprego de um sistema genético baseado no promotor constitutivo P_{PGK1} é atrativo como plataforma de baixo custo para produção de antígenos vacinais contra o PV; a utilização de *L. tarentolae* como plataforma vacinal – seja como vetor vacinal ou através de vacinas de subunidades – permitiria o desenvolvimento de abordagens de largo espectro contra o HPV. Salientamos a falta de qualquer estratégia vacinal contra o BPV e a urgente necessidade de controlar a papilomatose animal em um país que apresenta o maior rebanho bovino do mundo e que cuja pecuária movimenta R\$ 429 bilhões anualmente (7% do PIB) (SILVA et al., 2016). Dentro de suas respectivas potencialidades, acreditamos que tanto a plataforma baseada em *P. pastoris* quanto em *L. tarentolae* podem contribuir importantemente para o desenvolvimento de estratégias vacinais voltadas aos gargalos e necessidades regionais.

8. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

No presente trabalho, os resultados apresentados demonstram o desenvolvimento e a viabilidade de duas plataformas biotecnológicas baseadas em *P. pastoris* e *L. tarentolae* para produção de candidatos vacinais do HPV e BPV. Para a plataforma baseada em *P. pastoris*, a otimização realizada no sistema pPGK Δ 3-L1H16 – retirada do peptídeo sinal para secreção – foi capaz de promover eficientemente a produção intracelular da proteína L1 do HPV16 sob controle do promotor constitutivo PGK1, com evidências sugerindo a formação de VLPs no citoplasma dos clones analisados. Em paralelo, o sucesso no desenvolvimento de uma plataforma baseada em *L. tarentolae* expressando candidatos vacinais do HPV e BPV representa uma inovadora abordagem biotecnológica, sobretudo à luz de uma estratégia de largo espectro de proteção contra o câncer cervical e pioneira contra a papilomatose animal. Adicionalmente, os dados obtidos neste trabalho demonstram que *L. tarentolae* é capaz de realizar modificações pós-traducionais semelhantes aos padrões descritos em células de mamíferos, caracterizando tal sistema como extremamente atrativo para a produção e estudo de proteínas de mamíferos.

Salientamos, no entanto, que os resultados apresentados demandam análises adicionais. Ainda que a proteína L1 constitua um modelo experimental para estudo do sistema PGK1 de *Pichia*, entendemos que a concepção de outros candidatos vacinais para o sistema é necessária. Além das quimeras desenvolvidas neste trabalho, exploraremos outros alvos baseados em fusões com a proteína L2 para esse propósito (trabalho relativo a um Mestrado em andamento). Ainda sob a perspectiva de uma produção em larga escala, o sistema genético aqui explorado emprega a marca de seleção baseada no gene de resistência à ZeocinaTM, um antibiótico extremamente caro e tóxico que inviabilizaria o estabelecimento desta plataforma. Por isso, estamos atualmente desenvolvendo linhagens de *P. pastoris* recombinantes mediante emprego de um sistema genético com as seguintes modificações: (i) emprego de uma marca de seleção auxotrófica para o gene *Leu2d*; (ii) presença de regiões NTS (*nontranscribed spacers*, regiões não transcritas) de DNA ribossomal para permitir integração de múltiplas cópias do cassete de expressão no genoma das leveduras.

Paralelamente, o fato das linhagens recombinantes de *L. tarentolae* expressarem satisfatoriamente os candidatos vacinais é promissor, mas o emprego de vetores não integrativos é inconveniente como já discutido. As futuras análises envolverão os sistemas

integrativos apresentados neste trabalho e que permitem a integração estável do cassete de expressão no *locus* BT1 ou no rRNAp de *L. tarentolae*. Em complementação às caracterizações realizadas neste trabalho, novos ensaios são necessários para definir acuradamente a formação de capsômeros e VLPs a partir de *L. tarentolae*. As estratégias para produção dos candidatos baseados em E5 de HPV16 também serão projetadas em dois sentidos: (i) avaliar a expressão de E5otH16 e E5multi mediante emprego do sistema pSP-rRNAp- α Neo; (ii) caso os problemas persistam, redesenho dos candidatos vacinais.

Por fim, iniciaremos em breve a caracterização da imunogenicidade dos candidatos vacinais e linhagens recombinantes a partir de modelo murino, estando estes ensaios já aprovados pelo Comitê de Biossegurança do CPqAM/FIOCRUZ-PE e em processo de avaliação pelo Comitê de Ética Animal da referida instituição. Salientamos, por último, a possibilidade de aplicação desses sistemas para produção de outros candidatos vacinais ou proteínas recombinantes de interesse diagnóstico diversos. Nesse ínterim, recentemente nosso grupo teve aprovação de financiamento confirmada pela FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco) para aplicação das plataformas descritas neste trabalho visando estratégias diagnósticas para o Zika vírus (ZIKV), uma emergência de saúde pública atual de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, M.; HIRZ, M.; PICHLER, H. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. p. 5301–5317, 2014.

ALTSCHUL, S. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389–3402, 1 set. 1997. Disponível em: <<http://nar.oxfordjournals.org/content/25/17/3389.full>\n<http://nar.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/nar/25.17.3389>>.

ASHRAFI, G. H.; PIUKO, K.; BURDEN, F.; YUAN, Z.; GAULT, E. A.; MU, M.; TRAWFORD, A.; REID, S. W. J.; NASIR, L.; CAMPO, M. S. Vaccination of sarcoid-bearing donkeys with chimeric virus-like particles of bovine papillomavirus type 1. **Micro**, p. 148–157, 2008.

AZIZI, H.; HASSANI, K.; TASLIMI, Y.; NAJAFABADI, H. S.; PAPADOPOULOU, B.; RAFATI, S. Searching for virulence factors in the non-pathogenic parasite to humans *Leishmania tarentolae*. **Parasitology**, v. 136, n. 7, p. 723–35, jun. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19416551>>. Acesso em: 27 nov. 2015.

BAECHLEIN, C.; MEEMKEN, D.; PEZZONI, G.; ENGEMANN, C.; GRUMMER, B. Expression of a truncated hepatitis E virus capsid protein in the protozoan organism *Leishmania tarentolae* and its application in a serological assay. **Journal of Virological Methods**, v. 193, n. 1, p. 238–43, out. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23747546>>. Acesso em: 24 set. 2013.

BAKER, M. L.; FIGUEROA-DOWNING, D.; DE, E. D.; CHIANG, O.; VILLA, L.; BAGGIO, M. L.; ELUF-NETO, J.; BEDNARCZYK, R. A.; EVANS, D. P. Paving pathways: Brazil's implementation of a national human papillomavirus immunization campaign. **Rev Panam Salud Publica Pan American Journal of Public Health**, v. 38, n. 2, p. 163–166, 2015.

BASILE, G.; PETICCA, M. Recombinant protein expression in *Leishmania tarentolae*.

Molecular biotechnology, v. 43, n. 3, p. 273–8, nov. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19779853>>. Acesso em: 24 set. 2013.

BATISTA, M. V. a; SILVA, M. a R.; PONTES, N. E.; REIS, M. C.; CORTEGGIO, A.; CASTRO, R. S.; BORZACCHIELLO, G.; BALBINO, V. Q.; FREITAS, A. C. Molecular epidemiology of bovine papillomatosis and the identification of a putative new virus type in Brazilian cattle. **Veterinary Journal**, v. 197, n. 2, p. 368–73, ago. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23489845>>. Acesso em: 11 fev. 2016.

BAYONA, J. C.; NAKAYASU, E. S.; LAVERRIÈRE, M.; AGUILAR, C.; SOBREIRA, T. J. P.; CHOI, H.; NESVIZHSKII, A. I.; ALMEIDA, I. C.; CAZZULO, J. J.; ALVAREZ, V. E. SUMOylation pathway in Trypanosoma cruzi: functional characterization and proteomic analysis of target proteins. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 10, n. 12, p. M110.007369, dez. 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3237068&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 21 dez. 2015.

BAZAN, S. B.; DE ALENCAR MUNIZ CHAVES, A.; AIRES, K. A.; CIANCIARULLO, A. M.; GARCEA, R. L.; HO, P. L. Expression and characterization of HPV-16 L1 capsid protein in Pichia pastoris. **Archives of virology**, v. 154, n. 10, p. 1609–17, jan. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19756360>>. Acesso em: 13 nov. 2011.

BENISTON, R. G.; MORGAN, I. M.; BRIEN, V. O.; CAMPO, M. S. Quercetin , E7 and p53 in papillomavirus oncogenic cell transformation alimentary canal of cattle causing benign papillomas which can progress to squamous carcinomas in cattle grazing on bracken fern (BF). We have previously shown that querce- causes ce. **Carcinogenesis**, v. 22, n. 7, p. 1069–1076, 2001.

BEVERLEY, S. M.; CLAYTON, E. Transfection of Leishmania and Trypanosoma brucei by Electroporation. **Methods in Molecular Biology**, v. 21, p. 333–348, 1993.

BIEMELT, S.; SONNEWALD, U.; GALMBACHER, P.; WILLMITZER, L.; MU, M. Production of Human Papillomavirus Type 16 Virus-Like Particles in Transgenic Plants. **Society**, v. 77, n. 17, p. 9211–9220, 2003.

BISHOP, B.; DASGUPTA, J.; CHEN, X. S. Structure-based engineering of papillomavirus major capsid L1 : controlling particle assembly. **Virology Journal**, v. 6, p. 1–6, 2007.

BOCANETI, F.; ALTAMURA, G.; CORTEGGIO, A.; VELESCU, E.; ROPERTO, F.; BORZACCHIELLO, G. Bovine Papillomavirus: New Insights into an Old Disease. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 63, n. 1, p. 14–23, fev. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24661978>>. Acesso em: 25 jan. 2016.

BOLHASSANI, A.; MULLER, M.; ROOHVAND, F.; MOTEVALLI, F.; AGI, E.; SHOKRI, M.; RAD, M. M.; HOSSEINZADEH, S. Whole recombinant *Pichia pastoris* expressing HPV16 L1 antigen is superior in inducing protection against tumor growth as compared to killed transgenic *Leishmania*. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 10, n. 12, p. 3499–3508, 2 dez. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25668661>>. Acesso em: 27 nov. 2015.

BORDOLI, L.; KIEFER, F.; ARNOLD, K.; BENKERT, P.; BATTEY, J.; SCHWEDE, T. Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. **Nature Protocols**, v. 4, n. 1, p. 1–13, dez. 2008. Disponível em: <<http://www.nature.com/nprot/journal/v4/n1/pdf/nprot.2008.197.pdf>>.

BORZACCHIELLO, G.; ROPERTO, F. Bovine papillomaviruses, papillomas and cancer in cattle. **Veterinary Research**, v. 39, n. 5, p. 45, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18479666>>. Acesso em: 15 fev. 2016.

BRAGARD, C.; GOUBAU, P.; MICHIELS, T. **Initiation à la virologie**. Disponível em: <www.virologie-uclouvain.be>. Acesso em: 1 fev. 2016.

BRAVO, I. G.; DE SANJOSÉ, S.; GOTTSCHLING, M. The clinical importance of understanding the evolution of papillomaviruses. **Trends in Microbiology**, v. 18, n. 10, p. 432–8, out. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20739182>>. Acesso em: 2 fev. 2016.

BRAVO, I. G.; FÉLEZ-SÁNCHEZ, M. Papillomaviruses: Viral evolution, cancer and evolutionary medicine. **Evolution, Medicine, and Public Health**, v. 2015, n. 1, p. 32–51, jan.

2015. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4356112&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 1 fev. 2016.

BREGMAN, C. L.; HIRTH, R. S.; SUNDBERG, J. P.; CHRISTENSEN, E. F. Cutaneous Neoplasms in Dogs Associated with Canine Oral Papillomavirus Vaccine. **Veterinary Pathology**, v. 24, p. 477–87, 1987.

BREITLING, R.; KLINGNER, S.; CALLEWAERT, N.; PIETRUCHA, R.; GEYER, A.; EHRLICH, G.; HARTUNG, R.; MÜLLER, A.; CONTRERAS, R.; BEVERLEY, S. M.; ALEXANDROV, K. Non-pathogenic trypanosomatid protozoa as a platform for protein research and production. **Protein Expression and Purification**, v. 25, n. 2, p. 209–218, jul. 2002. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046592802000013>>.

BRETON, M.; ZHAO, C.; OUELLETTE, M.; TREMBLAY, M. J.; PAPADOPOULOU, B. A recombinant non-pathogenic Leishmania vaccine expressing human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) Gag elicits cell-mediated immunity in mice and decreases HIV-1 replication in human tonsillar tissue following exposure to HIV-1 infection. **The Journal of general virology**, v. 88, n. Pt 1, p. 217–25, jan. 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17170454>>. Acesso em: 21 dez. 2015.

BRIEN, P. M. O.; CAMPO, M. S. Evasion of host immunity directed by papillomavirus-encoded proteins. **Virus Research**, v. 88, p. 103–117, 2002.

BRUN, R.; SCHONENBERGER, M. Cultivation and in vitro cloning of procyclic culture forms of Trypanosoma brucei in a semi-defined medium. **Acta Tropica**, v. 36, p. 289–92, 1979.

BRUNI, L.; BARRIONUEVO-ROSAS, L.; ALBERO, G.; ALDEA, M.; SERRANO, B.; VALENCIA, S.; BROTONS, M.; MENA, M.; COSANO, R.; MUÑOZ, J.; BOSCH, F.; DE SANJOSÉ, S.; CASTELLSAGUÉ, X. **Human Papillomavirus and Related Diseases in the WorldSummary Report 2015-04-08**. [s.l.: s.n.].

BRUNI, L.; BARRIONUEVO-ROSAS, L.; ALBERTO, G.; ALDEA, M.; SERRANO, B.;

VALENCIA, S.; BROTONS, M.; MENA, M.; COSANO, R.; MUNOZ, J.; BOSCH, F. X.; DE SANJOSÉ, S.; CASTELLSAGUÉ, X. **Human Papillomavirus and Related Diseases in Brazil**. [s.l: s.n.].

BUCK, C. B.; CHENG, N.; THOMPSON, C. D.; LOWY, D. R.; STEVEN, A. C.; SCHILLER, J. T.; TRUS, B. L. Arrangement of L2 within the papillomavirus capsid. **Journal of Virology**, v. 82, n. 11, p. 5190–7, jun. 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2395198&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 13 mar. 2016.

BUND, T.; SPODEN, G. a; KOYNOV, K.; HELLMANN, N.; BOUKHALLOUK, F.; ARNOLD, P.; HINDERBERGER, D.; FLORIN, L. An L2 SUMO interacting motif is important for PML localization and infection of human papillomavirus type 16. **Cellular microbiology**, v. 16, n. 8, p. 1179–200, ago. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24444361>>. Acesso em: 27 nov. 2015.

CAMPO, M. Bovine papillomavirus: old system, new lessons? In: GLASGOW, C. OF M. V. AND L. S. OF (Ed.). **Papillomavirus research: from natural history to vaccine and beyond**. Glasgow: Caister Academic Press, 2006. p. 34.

CAMPO, M.; GRINDLAY, G.; O'NEIL, B.; CHANDRACHUD, L.; MCGARVIE, G.; JARRETT, W. Prophylactic and therapeutic vaccination against a mucosal papillomavirus. **Journal of General Virology**, v. 74, p. 945–953, 1993.

CAMPO, M.; JARRETT, W. Papillomavirus infection in cattle : viral and chemical cofactors in naturally occurring and experimentally induced tumours. **Ciba Found Symp**, v. 120, p. 117–35, 1986.

CAMPO, M. S. Infection by bovine papillomavirus and prospects for vaccination. **Trends in Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 92–97, 1995.

CAMPO, M. S. Animal models of papillomavirus pathogenesis. **Animals**, v. 89, p. 249–261, 2002.

CAMPO, M. S.; JARRETT, W. F. H.; BARRON, R.; NEIL, B. W. O.; SMITH, K. T.

Association of Bovine Papillomavirus Type 2 and Bracken Fern with Bladder Cancer in Cattle. **Cancer Research**, v. 52, p. 6898–6904, 1992.

CAMPO, M. S.; RODEN, R. B. S. Papillomavirus prophylactic vaccines: established successes, new approaches. **Journal of Virology**, v. 84, n. 3, p. 1214–20, fev. 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2812340&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 24 jan. 2016.

CANCER DISCOVERY. HPV vaccine works against nine viral types. **Cancer Discovery**, v. 4, n. 1, p. OF2, jan. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24402954>>. Acesso em: 4 jan. 2016.

CARVALHO, C. C. R.; BATISTA, M. V. a; SILVA, M. a R.; BALBINO, V. Q.; FREITAS, a C. Detection of bovine papillomavirus types, co-infection and a putative new BPV11 subtype in cattle. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 59, n. 5, p. 441–7, out. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22225995>>. Acesso em: 11 fev. 2016.

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

CHAMBERS, G.; ELLSMORE, V. A.; BRIEN, P. M. O.; REID, S. W. J.; LOVE, S.; CAMPO, M. S.; NASIR, L. Association of bovine papillomavirus with the equine sarcoid. **Journal of General Virology**, p. 1055–1062, 2003a.

CHAMBERS, G.; ELLSMORE, V. a.; O'BRIEN, P. M.; REID, S. W. J.; LOVE, S.; CAMPO, M. S.; NASIR, L. Sequence variants of bovine papillomavirus E5 detected in equine sarcoids. **Virus Research**, v. 96, n. 1-2, p. 141–145, out. 2003b. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168170203001758>>. Acesso em: 18 fev. 2016.

CHAMBERS, V. C.; EVANS, C. A.; WEISER, R. S. Canine Oral Papillomatosis: II. Immunologic Aspects of the Disease. **Cancer Research**, v. 20, p. 1083–93, 1960.

CHEN, V. B.; ARENDALL, W. B.; HEADD, J. J.; KEEDY, D. A.; IMMORMINO, R. M.;

KAPRAL, G. J.; MURRAY, L. W.; RICHARDSON, J. S.; RICHARDSON, D. C. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. 66, n. 1, p. 12–21, 1 jan. 2010. Disponível em: <<http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?S0907444909042073>>.

CHEN, X. S.; CASINI, G.; HARRISON, S. C.; GARCEA, R. L. Papillomavirus Capsid Protein Expression in Escherichia coli: Purification and Assembly of HPV11 and HPV16 L1. **Journal of Molecular Biology**, v. 307, p. 173–182, 2001.

CHEN, X. S.; GARCEA, R. L.; GOLDBERG, I.; CASINI, G.; HARRISON, S. C. Structure of Small Virus-like Particles Assembled from the L1 Protein of Human Papillomavirus 16. **Molecular Cell**, v. 5, p. 557–567, 2000.

CHEN, Y.-F.; LIN, C.-W.; TSAO, Y.-P.; CHEN, S.-L. Cytotoxic-T-Lymphocyte Human Papillomavirus Type 16 E5 Peptide with CpG-Oligodeoxynucleotide Can Eliminate Tumor Growth in C57BL/6 Mice. **Journal of Virology**, v. 78, n. 3, p. 1333–1343, 1 fev. 2004. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.78.3.1333-1343.2004>>.

CHRISTENSEN, N. D.; KREIDER, J. W. Antibody-Mediated Neutralization In Vivo of Infectious Papillomaviruses. **Journal of Virology**, v. 64, n. 7, p. 3151–3156, 1990.

CHRISTENSEN, N. D.; REED, C. A.; CLADEL, N. M.; HAN, R.; KREIDER, J. W. Immunization with Viruslike Particles Induces Long-Term Protection of Rabbits against Challenge with Cottontail Rabbit Papillomavirus. **Journal of Virology**, v. 70, n. 2, p. 960–965, 1996.

CIRSTEA, I. C. **Development of approaches for the engineering of gene expression in the protozoa leishmania tarentolae**. 2007. Ruhr-University Bochum, 2007.

CLADEL, N. M.; HU, J.; BALOGH, K.; MEJIA, A.; CHRISTENSEN, N. D. Wounding prior to challenge substantially improves infectivity of Cottontail Rabbit Papillomavirus and allows for standardization of infection. **Journal of Virological Methods**, v. 148, n. 1-2, p. 34–39, 2008.

CLAYTON, C. . Genetic Manipulation of Kinetoplastida. **Parasitology Today**, v. 15, n. 9, p.

372–378, set. 1999. Disponível em:
<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169475899014982>>. Acesso em: 25 abr. 2016.

CLAYTON, C. E. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. **The EMBO Journal**, v. 21, n. 8, p. 1881–1888, 2002.

COIMBRA, E. C. **Desenvolvimento de estratégias vacinais contra o câncer de colo de útero baseadas em “virus-like particles ” e imunização genética**. 2012. Universidade Federal de Pernambuco, 2012.

COIMBRA, E. C.; GOMES, F. B.; CAMPOS, J. F.; D, M.; CARVALHO, J. C. Production of L1 protein from different types of HPV in *Pichia pastoris* using an integrative vector. **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**, v. 44, p. 1–6, 2011.

CONGER, K. L.; LIU, J.; KUO, S.; CHOW, L. T.; WANG, T. S. Human Papillomavirus DNA Replication. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 5, p. 2696–2705, 1999.

CONNOLLY, J. A.; MORGAN, I. M.; JACKSON, M. E.; CAMPO, M. S. The BPV-4 co-carcinogen quercetin induces cell cycle arrest and up-regulates transcription from the LCR of BPV-4. **Cell Cycle**, p. 2739–2746, 1998.

CORDEIRO, M. N.; PAOLINI, F.; MASSA, S.; CURZIO, G.; ILLIANO, E.; DUARTE SILVA, A. J.; FRANCONI, R.; BISSA, M.; MORGHEN, C. D. G.; DE FREITAS, A. C.; VENUTI, A. Anti-tumor effects of genetic vaccines against HPV major oncogenes. **Human vaccines & immunotherapeutics**, v. 11, n. 1, p. 45–52, jan. 2015. Disponível em:
<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4514265&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 7 jan. 2016.

CREGG, J. M.; TOLSTORUKOV, I.; KUSARI, A.; SUNGA, J.; MADDEN, K.; CHAPPELL, T. Expression in the yeast *Pichia pastoris*. **Methods in enzymology**, v. 463, p. 169–89, jan. 2009. Disponível em:
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687909630135>>. Acesso em: 11 maio. 2016.

CZARNOTA, A.; TYBOROWSKA, J.; PESZYŃSKA-SULARZ, G.; GROMADZKA, B.;

BIENKOWSKA-SZEWCZYK, K.; GRZYB, K. Immunogenicity of Leishmania-derived hepatitis B small surface antigen particles exposing highly conserved E2 epitope of hepatitis C virus. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, p. 62, 13 dez. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12934-016-0460-4>>.

DAAYANA, S.; ELKORD, E.; WINTERS, U.; PAWLITA, M.; RODEN, R.; STERN, P. L.; KITCHENER, H. C. Phase II trial of imiquimod and HPV therapeutic vaccination in patients with vulval intraepithelial neoplasia. **British Journal of Cancer**, v. 102, n. 7, p. 1129–36, 30 mar. 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2853099&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 14 mar. 2016.

DALY, R.; HEARN, M. T. W. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. **Journal of Molecular Recognition**, n. November 2004, p. 119–138, 2005.

DAY, P. M.; KINES, R. C.; THOMPSON, C. D.; JAGU, S.; RODEN, R. B.; LOWY, D. R.; SCHILLER, J. T. In vivo mechanisms of vaccine-induced protection against HPV infection. **Cell Host & Microbe**, v. 8, n. 3, p. 260–70, 16 set. 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2939057&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 1 mar. 2016.

DE ALMEIDA, J. R. M.; DE MORAES, L. M. P.; TORRES, F. A. G. Molecular characterization of the 3-phosphoglycerate kinase gene (PGK1) from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Yeast**, v. 22, n. 9, p. 725–37, 15 jul. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16034819>>. Acesso em: 24 mar. 2016.

DE ARRUDA COUTINHO, L. C.; DE JESUS, A. L. S.; DE PAIVA FONTES, K. F. L.; COIMBRA, E. C.; MARIZ, F. C.; DE FREITAS, A. C.; DE CÁSSIA CARVALHO MAIA, R.; DE CASTRO, R. S. Production of Equine Infectious Anemia Virus (EIAV) antigen in *Pichia pastoris*. **Journal of Virological Methods**, v. 191, n. 2, p. 95–100, 2013.

DE FREITAS, A. C.; GURGEL, A. P. A. D.; CHAGAS, B. S.; COIMBRA, E. C.; DO AMARAL, C. M. M. Susceptibility to cervical cancer: an overview. **Gynecologic Oncology**,

v. 126, n. 2, p. 304–11, ago. 2012a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22484226>>. Acesso em: 12 fev. 2016.

DE FREITAS, A. C.; MARIZ, F. C.; COIMBRA, E. C.; CORDEIRO, M. N.; DE JESUS, A. L. S. Vaccine Strategies against Human Papillomavirus: A Discussion Focused on Developing Countries. **Journal of Clinical & Cellular Immunology**, v. 01, n. S4, 2012b. Disponível em: <<http://www.omicsonline.org/2155-9899/2155-9899-S4-004.digital/2155-9899-S4-004.html>>. Acesso em: 29 fev. 2016.

DE MARTEL, C.; FERLAY, J.; FRANCESCHI, S.; VIGNAT, J.; BRAY, F.; FORMAN, D.; PLUMMER, M. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. **The Lancet Oncology**, v. 13, n. 6, p. 607–615, 2012.

DE OLIVEIRA, L. M. F.; MORALE, M. G.; CHAVES, A. a M.; CAVALHER, A. M.; LOPES, A. S.; DINIZ, M. D. O.; SCHANOSKI, A. S.; DE MELO, R. L.; FERREIRA, L. C. D. S.; DE OLIVEIRA, M. L. S.; DEMASI, M.; HO, P. L. Design, Immune Responses and Anti-Tumor Potential of an HPV16 E6E7 Multi-Epitope Vaccine. **PloS one**, v. 10, n. 9, p. e0138686, jan. 2015. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4577214&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 27 nov. 2015.

DE VILLIERS, E.-M. Relationship between steroid hormone contraceptives and HPV, cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma. **International Journal of Cancer.**, v. 103, n. 6, p. 705–8, 1 mar. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12516087>>. Acesso em: 7 jul. 2012.

DE VILLIERS, E.-M.; FAUQUET, C.; BROKER, T. R.; BERNARD, H.; ZUR HAUSEN, H. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, n. 1, p. 17–27, 20 jun. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15183049>>. Acesso em: 11 jul. 2014.

DERBISE, A.; LESIC, B.; DACHEUX, D.; GHIGO, J. M.; CARNIEL, E. A rapid and simple method for inactivating chromosomal genes in Yersinia. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 113–116, set. 2003. Disponível em: <[http://femsim.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1016/S0928-8244\(03\)00181-0](http://femsim.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1016/S0928-8244(03)00181-0)>. Acesso em: 19

dez. 2015.

DIMAIO, D.; MATTOON, D. Mechanisms of cell transformation by papillomavirus E5 proteins. **Oncogene**, v. 20, n. 54, p. 7866–73, 26 nov. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11753669>>.

DING, D.-C.; CHIANG, M.-H.; LAI, H.-C.; HSIUNG, C. A.; HSIEH, C.-Y.; CHU, T.-Y. Methylation of the long control region of HPV16 is related to the severity of cervical neoplasia. **European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology**, v. 147, n. 2, p. 215–20, dez. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19819061>>. Acesso em: 13 fev. 2016.

DOORBAR, J.; QUINT, W.; BANKS, L.; BRAVO, I. G.; STOLER, M.; BROKER, T. R.; STANLEY, M. A. The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. **Vaccine**, v. 30, p. F55–F70, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.06.083>>.

DOORSLAER, K. Van. Evolution of the Papillomaviridae. **Virology**, v. 445, n. 1-2, p. 11–20, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2013.05.012>>.

DORTAY, H.; MUELLER-ROEBER, B. A highly efficient pipeline for protein expression in *Leishmania tarentolae* using infrared fluorescence protein as marker. **Microbial Cell Factories**, v. 9, n. 29, p. 1–10, 2010. Disponível em: <<http://www.microbialcellfactories.com/content/9/1/29>>.

DUBESSAY, P.; RAVEL, C.; BASTIEN, P.; LIGNON, M.; ULLMAN, B.; PAGÈS, M.; BLAINEAU, C. Effect of large targeted deletions on the mitotic stability of an extra chromosome mediating drug resistance in *Leishmania*. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 15, p. 3231–3240, 2001.

DYSON, N.; HOWLEY, P. M.; MUNGER, K.; HARLOW, E. The Human papilloma virus-16 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. **Science**, v. 243, n. 4893, p. 934–7, 1989.

EDWARDS, A. M.; ARROWSMITH, C. H.; CHRISTENDAT, D.; DHARAMSI, A.; FRIESEN, J. D.; GREENBLATT, J. F.; VEDADI, M. Protein production: feeding the

crystallographers and NMR spectroscopists. **Nature Structural Biology**, v. 7 Suppl, n. november, p. 970–2, nov. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11104003>>. Acesso em: 4 abr. 2016.

EUROSTARS. **The Eurostars Programme: Cervi Pro**. Disponível em: <<https://www.eurostars-eureka.eu/project/id/9817>>.

FADILI, A. El; KUNDIG, C.; ROY, G.; OUELLETTE, M. Inactivation of the Leishmania tarentolae Pterin Transporter (BT1) and Reductase (PTR1) Genes Leads to Viable Parasites with Changes in Folate Metabolism and Hypersensitivity to the Antifolate Methotrexate *. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 18, p. 18575–18582, 2004.

FALCÓN, V.; GARCÍA, C.; DE LA ROSA, M. C.; MENÉNDEZ, I.; SEOANE, J.; GRILLO, J. M. Ultrastructural and immunocytochemical evidences of core-particle formation in the methylotrophic Pichia pastoris yeast when expressing HCV structural proteins (core-E1). **Tissue & Cell**, v. 31, n. 2, p. 117–125, 1999.

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM I, I.; DIKSHIT, R.; ESER, S.; MATHERS, C.; REBELO, M.; PARKIN, D. M.; FORMAN D, D.; BRAY, F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v. 386, 13 set. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25220842>>. Acesso em: 25 set. 2014.

FINLAY, M.; YUAN, Z.; BURDEN, F.; TRAWFORD, A.; MORGAN, I. M.; CAMPO, M. S.; NASIR, L. The detection of Bovine Papillomavirus type 1 DNA in flies. **Virus Research**, v. 144, n. 1-2, p. 315–7, set. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19409942>>. Acesso em: 25 nov. 2011.

FLEMING, T.; LITTLECHILD, J. Sequence and structural comparison of thermophilic phosphoglycerate kinases with a mesophilic equivalent. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 118, n. 3, p. 439–451, nov. 1997. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300962997000054>>.

FLORIN, L.; SAPP, C.; STREECK, R. E.; SAPP, M. Assembly and Translocation of

Papillomavirus Capsid Proteins. **Journal of Virology**, v. 76, n. 19, p. 10009–10014, 1 out. 2002. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.76.19.10009-10014.2002>>.

FRATTINI, M. G.; LAIMINST, L. A. Binding of the human papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer-binding protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, p. 12398–12402, 1994.

FREITAS, A. C.; MARIZ, F. C.; SILVA, M. A. R.; JESUS, A. L. S. Human papillomavirus vertical transmission: review of current data. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 56, n. 10, p. 1451–6, maio 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23392393>>. Acesso em: 2 dez. 2015.

FREITAS, A.; SILVA, M.; JESUS, A.; MARIZ, F.; CORDEIRO, M.; ALBUQUERQUE, B.; BATISTA, M. Recent insights into Bovine Papillomavirus. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 33, p. 6004–6012, 31 dez. 2011. Disponível em: <[http://www.academicjournals.org/AJMR/abstracts/abstracts/abstract 2011/December Special Review/Freitas et al.htm](http://www.academicjournals.org/AJMR/abstracts/abstracts/abstract%202011/December%20Special%20Review/Freitas%20et%20al.htm)>. Acesso em: 25 jan. 2016.

FRITSCHÉ, C.; SITZ, M.; WOLF, M.; POHL, H.-D. Development of a defined medium for heterologous expression in *Leishmania tarentolae*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 48, n. 6, p. 488–495, dez. 2008. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jobm.200700389>>. Acesso em: 6 jan. 2016.

GALINDO, I.; RAMÍREZ OCHOA, J. Study of *Leishmania mexicana* electrokaryotype by clamped homogeneous electric field electrophoresis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 34, n. 3, p. 245–52, 1989.

GARCÍA-VALLVÉ, S.; ALONSO, A.; BRAVO, I. G. Papillomaviruses: different genes have different histories. **Trends in microbiology**, v. 13, n. 11, p. 514–21, nov. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16181783>>. Acesso em: 1 fev. 2016.

GARCÍA-VALLVÉ, S.; IGLESIAS-ROZAS, J. R.; ALONSO, A.; BRAVO, I. G. Different papillomaviruses have different repertoires of transcription factor binding sites: convergence

and divergence in the upstream regulatory region. **BMC evolutionary biology**, v. 6, p. 20, jan. 2006. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1421437&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 14 dez. 2015.

GAREAU, J. R.; LIMA, C. D. The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. **Nature Review in Molecular and Cell Biology**, v. 11, n. 12, p. 861–871, 2011.

GARIGLIO, P.; GUTIÉRREZ, J.; CORTÉS, E.; VÁZQUEZ, J. The role of retinoid deficiency and estrogens as cofactors in cervical cancer. **Archives of Medical Research**, v. 40, n. 6, p. 449–65, ago. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19853185>>. Acesso em: 13 fev. 2016.

GAUKROGER, J.; BRADLEY, A.; CHANDRACHUD, L.; JARRETT, W.; CAMPO, M. Interaction between bovine papillomavirus type 4 and cocarcinogens in the production of malignant turnouts. **Journal of General Virology**, v. 74, p. 2275–2280, 1993.

GELLISSEN, G.; KUNZE, G.; GAILLARDIN, C.; CREGG, J. M.; BERARDI, E.; VEENHUIS, M.; VAN DER KLEI, I. New yeast expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* and on dimorphic *Arxula adenivorans* and *Yarrowia lipolytica* - a comparison. **FEMS yeast research**, v. 5, n. 11, p. 1079–96, nov. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16144775>>. Acesso em: 5 jan. 2016.

GHIM, S.; NEWSOME, J.; BELL, J.; SUNDBERG, J. P.; SCHLEGEL, R.; JENSON, a B. Spontaneously regressing oral papillomas induce systemic antibodies that neutralize canine oral papillomavirus. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 68, n. 3, p. 147–51, jun. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10816383>>. Acesso em: 19 fev. 2016.

GOODRICH, L.; GERBER, H.; MARTI, E.; ANTCZAK, D. Equine sarcoids. **Veterinary and Clinical North American Equine Practice**, v. 14, n. 3, p. 607–23, 1998.

GOTTSCHLING, M.; STAMATAKIS, A.; NINDL, I.; STOCKFLETH, E.; ALONSO, A.; BRAVO, I. G. Multiple evolutionary mechanisms drive papillomavirus diversification. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n. 5, p. 1242–58, maio 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17344207>>. Acesso em: 14 dez. 2015.

GRAVITT, P. E. The known unknowns of HPV natural history. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 12, p. 4593–9, dez. 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3225991&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 4 fev. 2016.

HAILE, S.; PAPADOPOULOU, B. Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. **Current Opinion in Microbiology**, v. 10, n. 6, p. 569–77, dez. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18177626>>. Acesso em: 25 abr. 2016.

HALL, T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95–98, 1999. Disponível em: <<http://jwbrown.mbio.ncsu.edu/JWB/papers/1999Hall1.pdf>>.

HANUMANTHA RAO, N.; BAJI BABU, P.; RAJENDRA, L.; SRIRAMAN, R.; PANG, Y.-Y. S.; SCHILLER, J. T.; SRINIVASAN, V. A. Expression of codon optimized major capsid protein (L1) of human papillomavirus type 16 and 18 in *Pichia pastoris*; purification and characterization of the virus-like particles. **Vaccine**, v. 29, n. 43, p. 7326–34, 6 out. 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.07.071>>. Acesso em: 29 fev. 2016.

HARPER, D. M.; FRANCO, E. L.; WHEELER, C.; FERRIS, D. G.; JENKINS, D.; SCHUIND, A.; ZAHAF, T.; INNIS, B.; NAUD, P. Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women : a randomised controlled trial. **Gene**, p. 1757–1765, 2004.

HATAMA, S. Cutaneous Papillomatosis in Cattle. **J Disaster Res**, v. 7, n. 3, p. 319–323, 2011.

HILDESHEIM, A.; WACHOLDER, S.; RODRIGUEZ, A. C.; SCHILLER, J. T.;

GONZALEZ, P.; DUBIN, G.; PORRAS, C.; JIMENEZ, S. E.; LOWY, D. R. Effect of Human Papillomavirus 16/18 L1 Viruslike Particle Vaccine Among Young Women With Preexisting Infection. **Journal of American Medical Association**, v. 298, n. 7, p. 743–753, 2007.

HU, Y.-M.; HUANG, S.-J.; CHU, K.; WU, T.; WANG, Z.-Z.; YANG, C.-L.; CAI, J.-P.; JIANG, H.-M.; WANG, Y.-J.; GUO, M.; LIU, X.-H.; HUANG, H.-J.; ZHU, F.-C.; ZHANG, J.; XIA, N.-S. Safety of an Escherichia coli-expressed bivalent human papillomavirus (types 16 and 18) L1 virus-like particle vaccine: an open-label phase I clinical trial. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 10, n. 2, p. 469–75, jan. 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4185883&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 29 fev. 2016.

HWANG, E.-S.; NOTTOLI, T.; DIMAIO, D. The HPV 16 E5 protein: expression, detection, and stable complex formation with transmembrane proteins in COS cells. **Virology**, v. 211, p. 227–233, 1995.

IARC WORKING GROUP. **Iarc monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: human papillomavirus**. [s.l.: s.n.]

INGLIS, S.; SHAW, A.; KOENIG, S. Chapter 11: HPV vaccines: commercial research & development. **Vaccine**, v. 24 Suppl 3, p. S3/99–105, 31 ago. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16950023>>. Acesso em: 25 fev. 2016.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2012: incidência de câncer no brasil**. Coordenação ed. Rio de Janeiro: Flama, 2011.

IRIBARREN, P. A.; BERAZATEGUI, M. A.; CAZZULO, J. J.; ALVAREZ, V. E. Biosynthesis of SUMOylated Proteins in Bacteria Using the Trypanosoma brucei Enzymatic System. **PloS one**, v. 10, n. 8, p. e0134950, jan. 2015. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4530879&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 27 nov. 2015.

JAGU, S.; KWAK, K.; KARANAM, B.; HUH, W. K.; DAMOTHARAN, V.; CHIVUKULA, S. V.; RODEN, R. B. S. Optimization of multimeric human papillomavirus L2 vaccines. **PloS One**, v. 8, n. 1, p. e55538, jan. 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3561222&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 1 mar. 2016.

JARRETT, W.; MURPHY, J.; O'NEIL, B.; LAIRD, H. Virus - induced papillomas of the alimentary tract of cattle. **International Journal of Cancer**, v. 22, n. 3, p. 323–8, 1978.

JARRETT, W.; O'NEIL, B.; GAUKROGER, J.; LAIRD, H.; SMITH, K.; CAMPO, M. Studies on vaccination against papillomaviruses: a comparison of purified virus , tumour extract and transformed cells in prophylactic. **Veterinary Record**, v. 126, n. 18, p. 449–52, 1990a.

JARRETT, W.; O'NEIL, B.; GAUKROGER, J.; SMITH, K.; LAIRD, H.; CAMPO, M. Studies on vaccination against papillomaviruses: the immunity after infection and vaccination with bovine papillomaviruses of different types. **Veterinary Record**, v. 126, n. 19, p. 473–5, 1990b.

JARRETT, W.; SMITH, K.; O'NEIL, B.; GAUKROGER, J.; CHANDRACHUD, L.; GRINDLAY, G.; MCGARVIE, G.; CAMPO, M. Studies on vaccination against papillomaviruses: prophylactic and therapeutic vaccination with recombinant structural proteins. **Virology**, v. 184, n. 1, p. 33–42, 1991.

JESUS, A. L.; MARIZ, F. C.; SOUZA, H. M.; CORDEIRO, M. N.; COIMBRA, E. C.; LEITÃO, M. C.; NASCIMENTO, L. M.; STOCCO, R. C.; BEÇAK, W.; FREITAS, A. C. Expression of the bovine papillomavirus type 1, 2 and 4 L1 genes in the yeast *Pichia pastoris*. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 11, n. 3, p. 2598–2607, 2012.

JIANG, Z.; TONG, G.; CAI, B.; XU, Y.; LOU, J. Purification and immunogenicity study of human papillomavirus 58 virus-like particles expressed in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 80, n. 2, p. 203–210, dez. 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2011.07.009>>.

JOHANSSON, C.; SCHWARTZ, S. Regulation of human papillomavirus gene expression by splicing and polyadenylation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 239–251, 11 mar. 2013. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrmicro2984>>. Acesso em: 5 out. 2015.

KARLEN, S.; BEARD, P. Identification and Characterization of Novel Promoters in the Genome of Human Papillomavirus Type 18. **Journal of Virology**, v. 67, n. 7, p. 4296–4306, 1993.

KENTER, G. G.; WELTERS, M. J. P.; VALENTIJN, a R. P. M.; LOWIK, M. J. G.; BERENDS-VAN DER MEER, D. M. a; VLOON, A. P. G.; ESSAHSAH, F.; FATHERS, L. M.; OFFRINGA, R.; DRIJFHOUT, J. W.; WAFELMAN, A. R.; OOSTENDORP, J.; FLEUREN, G. J.; VAN DER BURG, S. H.; MELIEF, C. J. M. Vaccination against HPV-16 oncoproteins for vulvar intraepithelial neoplasia. **The New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 19, p. 1838–1847, 2009.

KIM, H. J.; KIM, S. Y.; LIM, S. J.; KIM, J. Y.; LEE, S. J.; KIM, H.-J. One-step chromatographic purification of human papillomavirus type 16 L1 protein from *Saccharomyces cerevisiae*. **Protein Expression and Purification**, v. 70, n. 1, p. 68–74, mar. 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046592809002046>>. Acesso em: 9 jan. 2016.

KIM, H. J.; LIM, S. J.; KWAG, H.-L.; KIM, H.-J. The Choice of Resin-Bound Ligand Affects the Structure and Immunogenicity of Column-Purified Human Papillomavirus Type 16 Virus-Like Particles. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. e35893, 26 abr. 2012. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0035893>>.

KIRNBAUER, R.; BOOYT, F.; CHENGT, N.; LOWY, D. R.; SCHILLER, J. T. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. **Sciences-New York**, v. 89, n. December, p. 12180–12184, 1992.

KIRNBAUER, R.; CHANDRACHUD, L.; O'NEIL, B.; WAGNER, E.; GRINDLAY, G.; ARMSTRONG, A.; MCGARVIE, G.; SCHILLER, J.; LOWY, D.; CAMPO, M. Virus-like Particles of Bovine Papillomavirus Type 4 in Prophylactic and Therapeutic Immunization.

Virology, v. 44, n. 219, p. 37–44, 1996.

KIRNBAUER, R.; TAUB, J.; GREENSTONE, H.; RODEN, R.; DURST, M.; GISSMANN, L.; LOWY, D. R.; SCHILLER, J. T. Efficient Self-Assembly of Human Papillomavirus Type 16 L1 and L1-L2 into Virus-Like Particles. **Journal of Virology**, v. 67, n. 12, p. 6929–6936, 1993.

KLEIN, C. A.; DROLL, D.; CLAYTON, C. SUMOylation in Trypanosoma brucei. **PeerJ**, v. 1, p. e180, jan. 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3796365&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 27 nov. 2015.

KUDENCHUK, P. J.; BROWN, S. P.; DAYA, M.; REA, T.; NICHOL, G.; MORRISON, L. J.; LEROUX, B.; VAILLANCOURT, C.; WITTEWER, L.; CALLAWAY, C. W.; CHRISTENSON, J.; EGAN, D.; ORNATO, J. P.; WEISFELDT, M. L.; STIELL, I. G.; IDRIS, A. H.; AUFDERHEIDE, T. P.; DUNFORD, J. V.; COLELLA, M. R.; VILKE, G. M.; BRIENZA, A. M.; DESVIGNE-NICKENS, P.; GRAY, P. C.; GRAY, R.; SEALS, N.; STRAIGHT, R.; DORIAN, P. Quadrivalent Vaccine against Human Papillomavirus to Prevent High-Grade Cervical Lesions. **New England Journal of Medicine**, v. 356, n. 19, p. 1915–1927, 10 maio 2007. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1514204>>.

KUSHNIR, S.; GASE, K.; BREITLING, R.; ALEXANDROV, K. Development of an inducible protein expression system based on the protozoan host Leishmania tarentolae. **Protein expression and purification**, v. 42, n. 1, p. 37–46, jul. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15939291>>. Acesso em: 24 set. 2013.

LACEY, C. J.; THOMPSON, H. S.; MONTEIRO, E. F.; O'NEILL, T.; DAVIES, M. L.; HOLDING, F. P.; FALLON, R. E.; ROBERTS, J. S. Phase IIa safety and immunogenicity of a therapeutic vaccine, TA-GW, in persons with genital warts. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 179, n. 3, p. 612–8, mar. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9952367>>.

LEAL, A. M.; FERRAZ, O. P.; CARVALHO, C.; FREITAS, A. C.; BENISTON, R. G.;

BEÇAK, W.; CAMPO, M. S.; STOCCO DOS SANTOS, R. C. Quercetin induces structural chromosomal aberrations and uncommon rearrangements in bovine cells transformed by the E7 protein of bovine papillomavirus type 4. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 1, n. 1, p. 15–21, mar. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19379326>>. Acesso em: 12 fev. 2016.

LIN, Y.; BORENSTEIN, L. E. E. A.; AHMED, R.; WETTSTEIN, F. O. Cottontail Rabbit Papillomavirus L1 Protein-Based Vaccines: Protection Is Achieved Only with a Full-Length, Nondenatured Product. **Journal of General Virology**, v. 67, n. 7, p. 4154–4162, 1993.

LIN, Y.; BORENSTEIN, L.; SELVAKUMAR, R.; AHMED, R.; WETTSTEIN, F. Effective vaccination against papilloma development by immunization with L1 or L2 structural protein of cottontail rabbit papillomavirus. **Virology**, v. 187, n. 2, p. 612–9, 1992.

LIN-CEREGHINO, J.; CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 45–66, 2000. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046592805001919>\n<http://aem.asm.org/lookup/doi/10.1128/AEM.01966-15>\n<http://link.springer.com/10.1007/s00253-011-3836-8>\n<http://doi.wiley.com/10.1002/cbic.201100709>\n<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10640598>>.

LIOI, M. B.; BARBIERI, R.; BORZACCHIELLO, G.; DEZZI, S.; ROPERTO, S.; SANTORO, A.; RUSSO, V.; ROPERTO, F. Chromosome Aberrations in Cattle with Chronic Enzootic Haematuria. v. 131, n. group 2, p. 233–236, 2004.

LIRA, R. C. De. **Desenvolvimento de uma construção vacinal baseada no gene e5 de bpv usando “codon usage” a ser aplicada em imunização genética**. 2010. Universidade Federal de Pernambuco, 2010.

LIU, D.-W.; TSAO, Y.-P.; HSIEH, C.-H.; HSIEH, J.-T.; KUNG, J. T.; CHIANG, C.-L.; HUANG, S.-J.; CHEN, S.-L. Induction of CD8 T Cells by Vaccination with Recombinant Adenovirus Expressing Human Papillomavirus Type 16 E5 Gene Reduces Tumor Growth. **Journal of Virology**, v. 74, n. 19, p. 9083–9089, 1 out. 2000. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.74.19.9083-9089.2000>>.

LÓPEZ-FARFÁN, D.; BART, J.-M.; ROJAS-BARROS, D. I.; NAVARRO, M. SUMOylation by the E3 ligase TbSIZ1/PIAS1 positively regulates VSG expression in *Trypanosoma brucei*. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 12, p. e1004545, dez. 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4256477&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 23 dez. 2015.

LUCENA, R. B.; RISSI, D. R.; KOMMERS, G. D.; PIEREZAN, F.; OLIVEIRA-FILHO, J. C.; MACÊDO, J. T. S. a; FLORES, M. M.; BARROS, C. S. L. A retrospective study of 586 tumours in Brazilian cattle. **Journal of Comparative Pathology**, v. 145, n. 1, p. 20–4, jul. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21247583>>. Acesso em: 16 fev. 2016.

MACAULEY-PATRICK, S.; FAZENDA, M. L.; MCNEIL, B.; HARVEY, L. M. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast (Chichester, England)**, v. 22, n. 4, p. 249–70, mar. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15704221>>. Acesso em: 13 jun. 2011.

MAEDA, Y.; SHIBAHARA, T.; WADA, Y.; KADOTA, K.; KANNO, T.; UCHIDA, I.; HATAMA, S. An outbreak of teat papillomatosis in cattle caused by bovine papilloma virus (BPV) type 6 and unclassified BPVs. **Veterinary Microbiology**, v. 121, n. 3-4, p. 242–8, 15 abr. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17239550>>. Acesso em: 24 jan. 2016.

MAGLENNON, G. A.; MCINTOSH, P. B.; DOORBAR, J. Immunosuppression Facilitates the Reactivation of Latent. v. 88, n. 1, p. 710–716, 2014.

MAGLENNON, G. A.; MCINTOSH, P.; DOORBAR, J. Persistence of viral DNA in the epithelial basal layer suggests a model for papillomavirus latency following immune regression. **Virology**, v. 414, n. 2, p. 153–63, 5 jun. 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3101335&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 3 fev. 2016.

MAMMAS, I. N.; SOURVINOS, G.; ZARAVINOS, A.; SPANDIDOS, D. a. Vaccination against human papilloma virus (HPV): epidemiological evidence of HPV in non-genital

cancers. **Pathology Oncology Research**, v. 17, n. 1, p. 103–19, mar. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20640607>>. Acesso em: 2 fev. 2016.

MANDAL, G.; MANDAL, S.; SHARMA, M.; CHARRET, K. S.; PAPADOPOULOU, B.; BHATTACHARJEE, H.; MUKHOPADHYAY, R. Species-specific antimonial sensitivity in *Leishmania* is driven by post-transcriptional regulation of AQP1. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 2, p. e0003500, fev. 2015. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4340957&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 3 abr. 2016.

MARIZ, F. C. **Expressão do gene I1 de hpv-16 em pichia pastoris empregando promotor induzível aox1 e promotor constitutivo pgk1 visando desenvolvimento de um sistema para produção vacinal**. 2012. Universidade Federal de Pernambuco, 2012.

MARIZ, F. C.; COIMBRA, E. C.; JESUS, A. L. S.; NASCIMENTO, L. M.; TORRES, F. A. G.; FREITAS, A. C. Development of an IP-free biotechnology platform for constitutive production of hpv16 I1 capsid protein using the pichia pastoris pgk1 promoter. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

MARUSIC, M. B.; MENCIN, N.; LICEN, M.; BANKS, L.; GRM, H. S. Modification of human papillomavirus minor capsid protein L2 by sumoylation. **Journal of virology**, v. 84, n. 21, p. 11585–9, nov. 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2953202&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 21 dez. 2015.

MATTIL-FRITZ, S.; SCHARNER, D.; PIUKO, K.; THÖNES, N.; GISSMANN, L.; MÜLLER, H.; MÜLLER, M. Immunotherapy of equine sarcoid: dose-escalation trial for the use of chimeric papillomavirus-like particles. **The Journal of General Virology**, v. 89, n. Pt 1, p. 138–47, jan. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18089737>>. Acesso em: 21 mar. 2016.

MCNICOLL, F.; MÜLLER, M.; CLOUTIER, S.; BOILARD, N.; ROCHETTE, A.; DUBÉ, M.; PAPADOPOULOU, B. Distinct 3'-untranslated region elements regulate stage-specific mRNA accumulation and translation in *Leishmania*. **The Journal of Biological Chemistry**,

v. 280, n. 42, p. 35238–46, 21 out. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16115874>>. Acesso em: 3 abr. 2016.

MELCHIOR, F.; SCHERGAUT, M.; PICHLER, A. SUMO: ligases, isopeptidases and nuclear pores. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 28, n. 11, p. 612–8, nov. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14607092>>. Acesso em: 20 abr. 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SUS oferta vacina contra HPV para meninas de 9 a 11 anos. **Blog da Saúde**, 2015. Disponível em: <<http://www.blog.saude.gov.br/35256-sus-oferta-vacina-contrahpv-para-meninas-de-9-a-11-anos>>. Acesso em: 1 dez. 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE/INCA. **Estimativa 2010: incidência de câncer no brasil**. Coordenação ed. Rio de Janeiro: Gráfica Flama, 2009.

MOHR, L. I. N. J.; CLARK, R.; SUN, S.; ANDROPHY, E. J.; MACPHERSON, P.; BOTCHAN, M. R. Targeting the E1 Replication Protein to the Papillomavirus Origin of Replication by Complex Formation with the E2 Transactivator. **Science**, v. 250, n. 4988, p. 1694–9, 1990.

MOSCICKI, A.-B.; SCHIFFMAN, M.; BURCHELL, A.; ALBERO, G.; GIULIANO, A. R.; GOODMAN, M. T.; KJAER, S. K.; PALEFSKY, J. Updating the natural history of human papillomavirus and anogenital cancers. **Vaccine**, v. 30 Suppl 5, n. 0 5, p. F24–33, 20 nov. 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3700362&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 10 fev. 2016.

MUREEV, S.; KUSHNIR, S.; KOLESNIKOV, A. a; BREITLING, R.; ALEXANDROV, K. Construction and analysis of Leishmania tarentolae transgenic strains free of selection markers. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 155, n. 2, p. 71–83, out. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17658188>>. Acesso em: 24 set. 2013.

NASIR, L.; CAMPO, M. S. Bovine papillomaviruses: their role in the aetiology of cutaneous tumours of bovids and equids. **Veterinary Dermatology**, v. 19, n. 5, p. 243–254, out. 2008. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3164.2008.00683.x>>. Acesso em: 23

jan. 2016.

NASIR, L.; GAULT, E.; MORGAN, I. M.; CHAMBERS, G.; ELLSMORE, V.; CAMPO, M. S. Identification and functional analysis of sequence variants in the long control region and the E2 open reading frame of bovine papillomavirus type 1 isolated from equine sarcoids. **Virology**, v. 364, n. 2, p. 355–61, 1 ago. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17412385>>. Acesso em: 18 fev. 2016.

NETO, A. A. Epidemiological aspects of cervical cancer. **Revista de Saúde Pública**, v. 25, n. 4, p. 326–33, 1991.

NICHOLLS, P. K.; STANLEY, M. A. The immunology of animal papillomaviruses. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 73, p. 101–127, 2000.

NIETO, K.; WEGHOFER, M.; SEHR, P.; RITTER, M.; SEDLMEIER, S.; KARANAM, B.; SEITZ, H.; MÜLLER, M.; KELLNER, M.; HÖRER, M.; MICHAELIS, U.; RODEN, R. B. S.; GISSMANN, L.; KLEINSCHMIDT, J. a. Development of AAVLP(HPV16/31L2) particles as broadly protective HPV vaccine candidate. **PloS one**, v. 7, n. 6, p. e39741, jan. 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3384601&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 19 dez. 2015.

NIIMI, T. Recombinant Protein Production in the Eukaryotic Protozoan Parasite *Leishmania tarentolae*: A Review. In: LORENCE, A. (Ed.). **Recombinant Gene Expression: Reviews and Protocols**. Methods in Molecular Biology. Third Edit ed. Totowa, NJ: Springer Science Business Media, 2012. 824p. 307–315.

OBADO, S. O.; BOT, C.; ECHEVERRY, M. C.; BAYONA, J. C.; ALVAREZ, V. E.; TAYLOR, M. C.; KELLY, J. M. Centromere-associated topoisomerase activity in bloodstream form *Trypanosoma brucei*. **Nucleic acids research**, v. 39, n. 3, p. 1023–33, fev. 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3035458&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 27 nov. 2015.

OGAWA, T.; TOMITA, Y.; OKADA, M.; SHINOZAKI, K.; KUBONOYA, H.; KAIHO, I.; SHIRASAWA, H. Broad-spectrum detection of papillomaviruses in bovine teat papillomas and healthy teat skin Printed in Great Britain. **Journal of General Virology**, p. 2191–2197, 2004.

OLSON, C.; PAMUKCU, A. M.; BROBST, D. F.; SATTER, E. J.; PRICER, J. M. A Urinary Bladder Tumor Induced by a Bovine Cutaneous Papilloma Agent. **Cancer Research**, v. 19, p. 779–82, 1959.

OLSON, C.; SEGRE, D.; SKIDMORE, L. Further observations on immunity to bovine cutaneous papillomatosis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 21, p. 233–42, 1960.

OLSON, C.; SKIDMORE, L. Therapy of experimentally produced bovine cutaneous papillomatosis with vaccines and excision. **Journal of American Medical Association**, v. 135, p. 339–43, 1959.

PADMANABHAN, P. K.; DUMAS, C.; SAMANT, M.; ROCHETTE, A.; SIMARD, M. J.; PAPADOPOULOU, B. Novel features of a PIWI-like protein homolog in the parasitic protozoan *Leishmania*. **PloS One**, v. 7, n. 12, p. e52612, jan. 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3528672&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 27 abr. 2016.

PADMANABHAN, S.; AMIN, T.; SAMPAT, B.; COOK-DEEGAN, R.; CHANDRASEKHARAN, S. Intellectual property, technology transfer and manufacture of low-cost HPV vaccines in India. **Nature Biotechnology**, v. 28, n. 7, p. 671–8, jul. 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3138722&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 29 fev. 2016.

PALANCADE, B.; DOYE, V. Sumoylating and desumoylating enzymes at nuclear pores: underpinning their unexpected duties? **Trends in Cell Biology**, v. 18, n. 4, p. 174–83, abr. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18313922>>. Acesso em: 25 abr. 2016.

PAMUKCU, A.; PRICE, J.; BRYAN, G. Naturally Occurring and Bracken-Fern-Induced Bovine Urinary Bladder Tumors. **Veterinary Pathology**, v. 13, p. 110–122, 1976.

PAPADOPOULOU, B.; ROY, G.; OUELLETTE, M. A novel antifolate resistance circle of Leishmania the amplified H. **The EMBO Journal**, v. 11, n. 10, p. 3601–3608, 1992.

PAPADOPOULOU, B.; ROY, G.; OUELLETTE, M. Autonomous replication of bacterial DNA plasmid oligomers in Leishmania. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 65, p. 39–49, 1994.

PARISH, W. E. A transmissible genital papilloma of the pig resembling condyloma acuminatum of man. **The Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 81, n. 2, p. 331–345, abr. 1961. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/path.1700810205>>. Acesso em: 19 fev. 2016.

PASTRANA, D. V.; GAMBHIRA, R.; BUCK, C. B.; PANG, Y. S.; THOMPSON, C. D.; CULP, T. D.; CHRISTENSEN, N. D.; LOWY, D. R.; SCHILLER, J. T.; RODEN, R. B. S. Cross-neutralization of cutaneous and mucosal Papillomavirus types with anti-sera to the amino terminus of L2. **Virology**, v. 337, p. 365–372, 2005.

PINEO, C. B.; HITZEROTH, I. I.; RYBICKI, E. P. Immunogenic assessment of plant-produced human papillomavirus type 16 L1/L2 chimaeras. **Plant biotechnology journal**, v. 11, n. 8, p. 964–75, out. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23924054>>. Acesso em: 27 nov. 2015.

PYEON, D.; LAMBERT, P. F.; AHLQUIST, P. Production of infectious human papillomavirus independently of viral replication and epithelial cell differentiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 26, p. 9311–6, 28 jun. 2005. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1166641&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 22 fev. 2016.

RAYMOND, F.; BOISVERT, S.; ROY, G.; RITT, J.-F.; LÉGARÉ, D.; ISNARD, A.; STANKE, M.; OLIVIER, M.; TREMBLAY, M. J.; PAPADOPOULOU, B.; OUELLETTE,

M.; CORBEIL, J. Genome sequencing of the lizard parasite *Leishmania tarentolae* reveals loss of genes associated to the intracellular stage of human pathogenic species. **Nucleic acids research**, v. 40, n. 3, p. 1131–47, fev. 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3273817&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 20 set. 2013.

REITER, P. L.; BREWER, N. T.; GOTTLIEB, S. L.; MCREE, A.-L.; SMITH, J. S. How much will it hurt? HPV vaccine side effects and influence on completion of the three-dose regimen. **Vaccine**, v. 27, n. 49, p. 6840–4, 16 nov. 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4016947&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 25 fev. 2016.

REQUENA, J. M. Lights and shadows on gene organization and regulation of gene expression in *Leishmania*. **Frontiers in Bioscience**, v. 16, n. 1, p. 2069, 2011. Disponível em: <<http://www.bioscience.org/2011/v16/af/3840/list.htm>>. Acesso em: 25 abr. 2016.

RODEN, R. B.; YUTZY, W. H.; FALLON, R.; INGLIS, S.; LOWY, D. R.; SCHILLER, J. T. Minor capsid protein of human genital papillomaviruses contains subdominant, cross-neutralizing epitopes. **Virology**, v. 270, n. 2, p. 254–7, 10 maio 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10792983>>. Acesso em: 19 dez. 2015.

ROMANOS, M. a; SCORER, C. a; CLARE, J. J. Foreign gene expression in yeast: a review. **Yeast**, v. 8, n. 6, p. 423–488, jun. 1992. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/yea.320080602>>.

ROMMEL, O.; DILLNER, J.; FLIGGE, C.; BERGSDORF, C.; WANG, X.; SELINKA, H.-C.; SAPP, M. Heparan sulfate proteoglycans interact exclusively with conformationally intact HPV L1 assemblies: basis for a virus-like particle ELISA. **Journal of Medical Virology**, v. 75, n. 1, p. 114–21, jan. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15543569>>. Acesso em: 3 dez. 2015.

RUBIO, I.; SEITZ, H.; CANALI, E.; SEHR, P.; BOLCHI, A.; TOMMASINO, M.; OTTONELLO, S.; MÜLLER, M. The N-terminal region of the human papillomavirus L2 protein contains overlapping binding sites for neutralizing, cross-neutralizing and non-

neutralizing antibodies. **Virology**, v. 409, n. 2, p. 348–59, 20 jan. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21074234>>. Acesso em: 23 nov. 2015.

SALJOUGHIAN, N.; TAHERI, T.; RAFATI, S. Live vaccination tactics: possible approaches for controlling visceral leishmaniasis. **Frontiers in immunology**, v. 5, n. March, p. 134, jan. 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3978289&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 21 dez. 2015.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3rd ed ed. New York, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SCHÄDLICH, L.; SENGER, T.; GERLACH, B.; MÜCKE, N.; KLEIN, C.; BRAVO, I. G.; MÜLLER, M.; GISSMANN, L. Analysis of modified human papillomavirus type 16 L1 capsomeres: the ability to assemble into larger particles correlates with higher immunogenicity. **Journal of Virology**, v. 83, n. 15, p. 7690–705, ago. 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2708645&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 2 dez. 2015.

SCHELLENBACHER, C.; KWAK, K.; FINK, D.; SHAFTI-KERAMAT, S.; HUBER, B.; JINDRA, C.; FAUST, H.; DILLNER, J.; RODEN, R. B. S.; KIRNBAUER, R. Efficacy of RG1-VLP vaccination against infections with genital and cutaneous human papillomaviruses. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 12, p. 2706–13, dez. 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3826974&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 2 mar. 2016.

SCHILLER, J.; MÜLLER, M. Next generation prophylactic human papillomavirus vaccines. **The Lancet Oncology**, v. 16, n. 5, p. e217–25, maio 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25943066>>. Acesso em: 7 out. 2015.

SCHILLER, J. T.; CASTELLSAGUÉ, X.; VILLA, L. L.; HILDESHEIM, A. An update of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like particle vaccine clinical trial results. **Vaccine**, v. 26 Suppl 1, n. Suppl 10, p. K53–61, 19 ago. 2008. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2631230&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 25 fev. 2016.

SCHILLER, J. T.; LOWY, D. R. Papillomavirus-Like Particle Vaccines. **Journal of the National Cancer Institute Monographs**, n. 28, p. 50–54, 2000.

SCHILLER, J. T.; LOWY, D. R. Understanding and learning from the success of prophylactic human papillomavirus vaccines. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 10, p. 681–92, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2872>\n<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrmicro2872>\n<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22961341>>.

SCHMITT, M.; FIEDLER, V.; MÜLLER, M. Prevalence of BPV genotypes in a German cowshed determined by a novel multiplex BPV genotyping assay. **Journal of Virological Methods**, v. 170, n. 1-2, p. 67–72, dez. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20816698>>. Acesso em: 11 fev. 2016.

SCHMOOK, T.; NINDL, I.; ULRICH, C.; MEYER, T.; STERRY, W.; STOCKFLETH, E. Viral warts in organ transplant recipients: new aspects in therapy. **British Journal of Dermatology**, v. 149, n. s66, p. 20–24, nov. 2003. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1046/j.0366-077X.2003.05627.x>>.

SHOPE, R. E. Immunization of rabbits to infectious papillomatosis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 65, n. 2, p. 219–231, 1937.

SILVA, A.; FACHINELLO, A.; CASTRO, N.; GILIO, L.; GIACHINI, G.; BARROS, G. **Relatório PIBagro- Brasil**. [s.l: s.n.].

SILVA, J. G.; COIMBRA, E. C.; JESUS, A. L. S.; MARIZ, F. C.; SILVA, K. M. G.; LOBATO, Z. I. P.; CAMPOS, A. C.; COUTINHO, L. C. A.; CASTRO, R. S.; FREITAS, A. C. Secretory expression of Porcine Circovirus Type 2 capsid protein in *Pichia pastoris*. **Journal of Virological Methods**, v. 207, p. 226–231, 2014.

SINGH, V.; SOMVANSHI, R.; TIWARI, A. Papillomatosis in Indian cattle: occurrence and etiopathology. **Indian Journal of Veterinary Pathology**, v. 33, n. 1, p. 52–57, 2009.

SOLEIMANI, M.; MAHBOUDI, F.; DAVOUDI, N.; AMANZADEH, A.; AZIZI, M.; ADELI, A.; RASTEGAR, H.; BARKHORDARI, F.; MOHAJER-MAGHARI, B. Expression of human tissue plasminogen activator in the trypanosomatid protozoan *Leishmania tarentolae*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 48, n. 1, p. 55–61, 2007.

SPARKOWSKI, J.; ANDERS, J.; SCHLEGEL, R. Mutation of the bovine papillomavirus E5 oncoprotein at amino acid 17 generates both high- and low-transforming variants. **Journal of Virology**, v. 68, n. 9, p. 6120–3, 1994. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=237025&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

STANLEY, M.; GISSMANN, L.; NARDELLI-HAEFLIGER, D. Immunobiology of human papillomavirus infection and vaccination - implications for second generation vaccines. **Vaccine**, v. 26 Suppl 1, p. K62–7, 19 ago. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18847558>>. Acesso em: 16 fev. 2016.

STANLEY, M.; LOWY, D. R.; FRAZER, I. Chapter 12: Prophylactic HPV vaccines: Underlying mechanisms. v. 3, p. 106–113, 2006.

STERLING, J. C. Human papillomaviruses and skin cancer. **Journal of Clinical Virology**, v. 32 Suppl 1, p. S67–71, mar. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15753014>>. Acesso em: 2 fev. 2016.

STUART, K.; BRUN, R.; CROFT, S.; FAIRLAMB, A.; GÜRTLER, R. E.; MCKERROW, J.; REED, S.; TARLETON, R. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 4, p. 1301–10, abr. 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2276762&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 10 abr. 2016.

SU, J.; WU, A.; SCOTNEY, E.; MA, B.; MONIE, A.; HUNG, C.; WU, T. Immunotherapy for Cervical Cancer: Research Status and Clinical Potential. **BioDrugs**, v. 24, n. 2, p. 109–129, 2010.

SUNGA, A. J.; TOLSTORUKOV, I.; CREGG, J. M. Posttransformational vector amplification in the yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 6, p. 870–6, set. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18637138>>. Acesso em: 17 fev. 2016.

SUZICH, J. A.; GHIM, S.; PALMER-HILL, F. J.; WHITE, W. I.; TAMURA, J. K.; BELL, J. A.; NEWSOME, J. A.; JENSON, A. B.; SCHLEGEL, R. Systemic immunization with papillomavirus L1 protein completely prevents the development of viral mucosal papillomas. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, p. 11553–11557, 1995.

SYRJÄNEN, S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. **Journal of Clinical Virology**, v. 32 Suppl 1, p. S59–66, mar. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15753013>>. Acesso em: 2 fev. 2016.

SYRJÄNEN, S. Current concepts on human papillomavirus infections in children. **APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, v. 118, n. 6-7, p. 494–509, jun. 2010a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20553530>>. Acesso em: 28 mar. 2012.

SYRJÄNEN, S. Current concepts on human papillomavirus infections in children. **Acta pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, v. 118, n. 6-7, p. 494–509, jun. 2010b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20553530>>. Acesso em: 3 jan. 2016.

TAGHAVIAN, O.; SPIEGEL, H.; HAUCK, R.; HAFEZ, H. M.; FISCHER, R.; SCHILLBERG, S. Protective Oral Vaccination against Infectious bursal disease virus Using the Major Viral Antigenic Protein VP2 Produced in *Pichia pastoris*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. e83210, 20 dez. 2013. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0083210>>.

TEIXEIRA, S. Control of gene expression in Trypanosomatidae. **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**, v. 31, p. 1503–1516, 1998.

THÖNES, N.; HERREINER, A.; SCHÄDLICH, L.; PIUKO, K.; MÜLLER, M. A direct comparison of human papillomavirus type 16 L1 particles reveals a lower immunogenicity of

capsomeres than viruslike particles with respect to the induced antibody response. **Journal of Virology**, v. 82, n. 11, p. 5472–85, jun. 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2395182&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 1 dez. 2015.

TSAI, T.-C.; CHEN, S.-L. The biochemical and biological functions of human papillomavirus type 16 E5 protein. **Archives of Virology**, v. 148, n. 8, p. 1445–53, ago. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12898324>>. Acesso em: 3 fev. 2016.

TUMBAN, E.; MUTTIL, P.; ANDREA, C.; ESCOBAR, A.; PEABODY, J.; WAFULA, D.; PEABODY, D. S.; CHACKERIAN, B. Preclinical refinements of a broadly protective VLP-based HPV vaccine. **Vaccine**, p. 1–8, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.05.016>>.

TUMBAN, E.; PEABODY, J.; PEABODY, D. S.; CHACKERIAN, B. A universal virus-like particle-based vaccine for human papillomavirus: longevity of protection and role of endogenous and exogenous adjuvants. **Vaccine**, v. 31, n. 41, p. 4647–54, 23 set. 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3785330&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 2 mar. 2016.

TUMBAN, E.; PEABODY, J.; TYLER, M.; PEABODY, D. S.; CHACKERIAN, B. VLPs displaying a single L2 epitope induce broadly cross-neutralizing antibodies against human papillomavirus. **PloS one**, v. 7, n. 11, p. e49751, jan. 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3501453&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 19 dez. 2015.

VASSILEVA, A.; CHUGH, D.; SWAMINATHAN, S.; KHANNA, N. Expression of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* using the GAP promoter. **J Biotechnology**, v. 88, p. 21–35, 2001.

VELDERS, M. P.; WEIJZEN, S.; EIBEN, G. L.; ELMISHAD, a. G.; KLOETZEL, P.-M.; HIGGINS, T.; CICCARELLI, R. B.; EVANS, M.; MAN, S.; SMITH, L.; KAST, W. M. Defined Flanking Spacers and Enhanced Proteolysis Is Essential for Eradication of

Established Tumors by an Epitope String DNA Vaccine. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 9, p. 5366–5373, 1 maio 2001. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.166.9.5366>>. Acesso em: 7 jan. 2016.

VENUTI, A.; PAOLINI, F.; NASIR, L.; CORTEGGIO, A.; ROPERTO, S.; CAMPO, M. S.; BORZACCHIELLO, G. Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions. **Molecular cancer**, v. 10, n. 1, p. 140, jan. 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3248866&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 5 out. 2015.

VILLA, L. L.; COSTA, R. L. R.; PETTA, C. a; ANDRADE, R. P.; PAAVONEN, J.; IVERSEN, O.-E.; OLSSON, S.-E.; HØYE, J.; STEINWALL, M.; RIIS-JOHANNESSEN, G.; ANDERSSON-ELLSTROM, A.; ELFGREN, K.; KROGH, G. Von; LEHTINEN, M.; MALM, C.; TAMMS, G. M.; GIACOLETTI, K.; LUPINACCI, L.; RAILKAR, R.; TADDEO, F. J.; BRYAN, J.; ESSER, M. T.; SINGS, H. L.; SAAH, a J.; BARR, E. High sustained efficacy of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus types 6/11/16/18 L1 virus-like particle vaccine through 5 years of follow-up. **British Journal of Cancer**, v. 95, n. 11, p. 1459–66, 4 dez. 2006. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2360730&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 1 dez. 2015.

VOUSDEN, K. Interactions of human papillomavirus transforming proteins with the products of tumor supressor genes. **The FASEB Journal**, n. 10, p. 872–879, 1993.

WAHEED, M. T.; THÖNES, N.; MÜLLER, M.; HASSAN, S. W.; GOTTSCHAMEL, J.; LÖSSL, E.; KAUL, H.-P.; LÖSSL, A. G. Plastid expression of a double-pentameric vaccine candidate containing human papillomavirus-16 L1 antigen fused with LTB as adjuvant: transplastomic plants show pleiotropic phenotypes. **Plant Biotechnology Journal**, v. 9, n. 6, p. 651–60, ago. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21447051>>. Acesso em: 27 nov. 2015.

WANG, J. W.; RODEN, R. B. S. L2, the minor capsid protein of papillomavirus. **Virology**, v. 445, n. 1-2, p. 175–86, out. 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3770800&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

ertype=abstract>. Acesso em: 14 dez. 2015.

WANG, Q.-M.; SUN, S.-H.; HU, Z.-L.; ZHOU, F.-J.; YIN, M.; XIAO, C.-J.; ZHANG, J.-C. Epitope DNA vaccines against tuberculosis: spacers and ubiquitin modulates cellular immune responses elicited by epitope DNA vaccine. **Scandinavian journal of immunology**, v. 60, n. 3, p. 219–25, set. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15320877>>.

WANG, X.; SAPP, M.; CHRISTENSEN, N. D.; DILLNER, J. Heparin-based ELISA reduces background reactivity in virus-like particle-based papillomavirus serology. **The Journal of general virology**, v. 86, n. Pt 1, p. 65–73, jan. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15604432>>. Acesso em: 3 dez. 2015.

WERNESSE, B.; LEVINE, a.; HOWLEY, P. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. **Science**, v. 248, n. 4951, p. 76–79, 6 abr. 1990. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.2157286>>.

WHO. **First WHO report on neglected tropical diseases**. [s.l: s.n.].

WINCKER, P.; RAVEL, C.; BLAINEAU, C.; PAGES, M.; JAUFFRET, Y.; DEDET, J.; BASTIEN, P.; PARASITES, G.; PARASITOLOGIE, L. De; MÉDECINE, F. De; BROUSSONET, A. The Leishmania genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. **Nucleic Acids Research**, v. 24, n. 9, p. 1688–1694, 1996.

WOODMAN, C. B. J.; COLLINS, S. I.; YOUNG, L. S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. **Nature reviews. Cancer**, v. 7, n. 1, p. 11–22, jan. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17186016>>. Acesso em: 26 jan. 2016.

XU, D.; ZHANG, Y. Improving the Physical Realism and Structural Accuracy of Protein Models by a Two-Step Atomic-Level Energy Minimization. **Biophysical Journal**, v. 101, n. 10, p. 2525–2534, nov. 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2011.10.024>>.

XUE, Y.; ZHOU, F.; ZHU, M.; AHMED, K.; CHEN, G.; YAO, X. GPS: a comprehensive www server for phosphorylation sites prediction. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. Web Server, p. W184–W187, 1 jul. 2005. Disponível em:

<<http://nar.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/nar/gki393>>.

YAN, S.; LODES, M. J.; FOX, M.; MYLER, P. J.; STUART, K. Characterization of the Leishmania dono 6 ani ribosomal RNA promoter. v. 103, p. 197–210, 1999.

YANG, J.; YAN, R.; ROY, A.; XU, D.; POISSON, J.; ZHANG, Y. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. **Nat Meth**, v. 12, n. 1, p. 7–8, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.3213>\n10.1038/nmeth.3213\n<http://www.nature.com/nmeth/journal/v12/n1/abs/nmeth.3213.html#supplementary-information>>.

YANG, Y.; OKAYAMA, H.; HOWLEY, P. M. Bovine papillomavirus contains multiple transforming genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 82, p. 1030–1034, 1985.

YE, K.; ZHANG, X.; NI, J.; LIAO, S.; TU, X. Identification of enzymes involved in SUMOylation in Trypanosoma brucei. **Scientific reports**, v. 5, p. 10097, jan. 2015. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4426598&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 3 jan. 2016.

YOON, S.-W.; LEE, T.-Y.; KIM, S.-J.; LEE, I.-H.; SUNG, M.-H.; PARK, J.-S.; POO, H. Oral administration of HPV-16 L2 displayed on Lactobacillus casei induces systematic and mucosal cross-neutralizing effects in Balb/c mice. **Vaccine**, v. 30, n. 22, p. 3286–94, 9 maio 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22426329>>. Acesso em: 19 dez. 2015.

YUAN, H.; ESTES, P. a.; CHEN, Y.; NEWSOME, J.; OLCESE, V. a.; GARCEA, R. L.; SCHLEGEL, R. Immunization with a Pentameric L1 Fusion Protein Protects against Papillomavirus Infection. **Journal of Virology**, v. 75, n. 17, p. 7848–7853, 1 set. 2001. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.75.17.7848-7853.2001>>.

ZHANG, H.; SAITOH, H.; MATUNIS, M. J. Enzymes of the SUMO Modification Pathway Localize to Filaments of the Nuclear Pore Complex. **Molecular and Cellular Biology**, v. 22, n. 18, p. 6498–6508, 15 set. 2002. Disponível em:

<<http://mcb.asm.org/cgi/doi/10.1128/MCB.22.18.6498-6508.2002>>. Acesso em: 20 abr. 2016.

ZHANG, Y. TM-align: a protein structure alignment algorithm based on the TM-score. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 7, p. 2302–2309, 11 abr. 2005. Disponível em: <<http://nar.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/nar/gki524>>.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 5, p. 342–50, maio 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12044010>>. Acesso em: 17 jul. 2014.

APÊNDICE

Sequências de DNA

>GI:27752860 Gene L1 do Papilomavírus Humano 16

```
ATGTCTCTTTGGCTGCCTAGTGAGGCCACTGTCTACTTGCCTCCTGTCCCAGTATCTAAGGTTGTAAGCACGGAT
GAATATGTTGCACGCACAAACATATATTTATCATGCAGGGACATCCAGACTACTTGCAGTTGGACATCCCTATTTT
CCTATTAACCAACCTAACAATAACAAAATATTAGTTCCATAAGTATCAGGATTACAATACAGGGTATTTAGAATA
CATTTACCTGACCCCAATAAGTTTGGTTTTCTGACACCTCATTTTATAATCCAGATACACAGCGGCTGGTTTGG
GCCTGTGTAGGTGTTGAGGTAGGCCGTGGTCAGCCATTAGGTGTGGGCATTAGTGGCCATCCTTTATTAATAAAA
TTGGATGACACAGAAAATGCTAGTGCTTATGCAGCAAATGCAGGTGTGGATAATAGAGAATGTATATCTATGGAT
TACAAAACAAACACAATTTGTGTTAATTGGTTGCAAACCACCTATAGGGGAACACTGGGGCAAAGGATCCCCATGT
ACCAATGTTGCAGTAAATCCAGGTGATTGTCCACCATTAGAGTTAATAAACACAGTTATTCAGGATGGTGATATG
GTTGATACTGGCTTTGGTGCTATGGACTTTACTACATTACAGGCTAACAAAAGTGAAGTTCCACTGGATATTTGT
ACATCTATTTGCAAATATCCAGATTATATTAATAATGGTGTGAGAACCATATGGCGACAGCTATTTTTTTTATTTA
CGGAGGGAACAAATGTTTGTAGACATTTATTTAATAGGGCTGGTGCTGTTGGTGAATAATGTACCAGACGATTTA
TACATTAAGGCTCTGGGTCTACTGCAAATTTAGCCAGTTCAAATTTATTTTCCCTACACCTAGTGGTCTATGGTT
ACCTCTGATGCCAAATATTCATAAACCTTATTGGTTACAACGAGCACAGGGCCACAATAATGGCATTGTGGTGG
GGTAACCAACTATTTGTTACTGTTGTTGATACTACACGCAGTACAAATATGTCATTATGTGCTGCCATATCTACT
TCAGAACTACATATAAAAAATACTAACTTTAAGGAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTTATT
TTTCAACTGTGCAAAAATAACCTTAACTGCAGACGTTATGACATACATACATTCTATGAATCCACTATTTTGGAG
GACTGGAATTTTGGTCTACAACCTCCCCCAGGAGGCACACTAGAAGATACTTATAGGTTTGTAAACATCCCAGGCA
ATTGCTTGTCAAAAACATACACCTCCAGCACCTAAAGAAGATCCCCTTAAAAAATACACTTTTTGGGAAGTAAAT
TTAAAGGAAAAGTTTCTGCAGACCTAGATCAGTTTCCCTTTAGGACGCAAATTTTTTACTACAAGCAGGATTGAAG
GCCAAACCAAAAATTTACATTAGGAAAACGAAAAGCTACACCACCACCTCATCTACCTCTACAACCTGCTAAACGC
AAAAACGTAAGCTGTAA
```

> L1wt

```
GCGATATCTCTAGAGCCATGTCTCTTTGGCTGCCTAGTGAGGCCACTGTCTACTTGCCTCCTGTCCCAGTATCTA
AGGTTGTAAGCACGGATGAATATGTTGCACGCACAAACATATATTTATCATGCAGGGACATCCAGACTACTTGCAG
TTGGACATCCCTATTTTCTATTAACCAACCTAACAATAACAAAATATTAGTTCCATAAGTATCAGGATTACAAT
ACAGGGTATTTAGAATACATTTACCTGACCCCAATAAGTTTGGTTTTCTGACACCTCATTTTATAATCCAGATA
CACAGCGGCTGGTTTGGGCCGTGTGTAGGTGTTGAGGTAGGCCGTGGTCAGCCATTAGGTGTGGGCATTAGTGGCC
ATCCTTTATTAATAAATTTGGATGACACAGAAAATGCTAGTGCCTTATGCAGCAAATGCAGGTGTGGATAATAGAG
AATGTATATCTATGGATTACAAACAAACACAATTTGTGTTTAAATTGGTTGCAAACCACCTATAGGGGAACACTGGG
GCAAAGGATCCCCATGTACCAATGTTGCAGTAAATCCAGGTGATTGTCCACCATTAGAGTTAATAAACACAGTTA
TTCAGGATGGTGATATGGTTGATACTGGCTTTGGTGCTATGGACTTTACTACATTACAGGCTAACAAAAGTGAAG
TTCCACTGGATATTTGTACATCTATTTGCAAATATCCAGATTATATTAATAATGGTGTGAGAACCATATGGCGACA
GCTTATTTTTTTTATTTACGGAGGGAACAAATGTTTGTGTTAGACATTTATTTAATAGGGCTGGTGCTGTTGGTAAA
ATGTACCAGACGATTTATACATTAAGGCTCTGGGTCTACTGCAAATTTAGCCAGTTCAAATTTATTTTCCCTACAC
CTAGTGGTCTATGGTTACCTCTGATGCCAAATATTCATAAACCTTATTGGTTACAACGAGCACAGGGCCACA
ATAATGGCATTGTGGGGTAACCAACTATTTGTTACTGTTGTTGATACTACACGCAGTACAAATATGTCATTAT
GTGCTGCCATATCTACTTCAGAACTACATATAAAAAATACTAACTTTAAGGAGTACCTACGACATGGGGAGGAAT
ATGATTTACAGTTTATTTTTCAACTGTGCAAAAATAACCTTAACTGCAGACGTTATGACATACATACATTCTATGA
ATTCCACTATTTTGGAGGACTGGAATTTTGGTCTACAACCTCCCCCAGGAGGCACACTAGAAGATACTTATAGGT
TTGTAACATCCCAGGCAATTGCTTGTCAAAAACATACACCTCCAGCACCTAAAGAAGATCCCCTTAAAAAATACA
CTTTTTGGGAAGTAAATTTAAAGGAAAAGTTTTCTGCAGACCTAGATCAGTTTCCCTTTAGGACGCAAATTTTTAC
TACAAGCAGGATTGAAGGCCAAACCAAAAATTTACATTAGGAAAACGAAAAGCTACACCACCACCTCATCTACCT
CTACAACCTGCTAAACGCAAAAACGTAAGCTGTAAAAGCTTGGG
```

> L1wt (-h4) _L2 (56-75)

```
GCGATATCTCTAGAGCCATGTCTCTTTGGCTGCCTAGTGAGGCCACTGTCTACTTGCCTCCTGTCCCAGTATCTA
AGGTTGTAAGCACGGATGAATATGTTGCACGCACAAACATATATTTATCATGCAGGGACATCCAGACTACTTGCAG
TTGGACATCCCTATTTTCTATTAACCAACCTAACAATAACAAAATATTAGTTCCATAAGTATCAGGATTACAAT
ACAGGGTATTTAGAATACATTTACCTGACCCCAATAAGTTTGGTTTTCTGACACCTCATTTTATAATCCAGATA
```

CACAGCGGCTGGTTTGGGCCCTGTGTAGGTGTTGAGGTAGGCCGTGGTCAGCCATTAGGTGTGGGCATTAGTGGCC
ATCCTTTATTAAATAAAATTTGGATGACACAGAAAATGCTAGTGCTTATGCAGCAAATGCAGGTGTGGATAATAGAG
AATGTATATCTATGGATTACAAACAAACACAATTGTGTTTAAATTTGGTTGCAAACCACCTATAGGGGAACACTGGG
GCAAAGGATCCCCATGTACCAATGTTGCAGTAAATCCAGGTGATTGTCCACCATTAGAGTTAATAAACACAGTTA
TTCAGGATGGTGATATGGTTGATACTGGCTTTGGTGCTATGGACTTTACTACATTACAGGCTAACAAAAGTGAAG
TTCCACTGGATATTTGTACATCTATTTGCAAATATCCAGATTATATTTAAATGGTGTGAGAACCATATGGCGACA
GCTTATTTTTTTTATTTACGGAGGGAACAAAATGTTTGTAGACATTTATTTAATAGGGCTGGTGTCTGTTGGTAAA
ATGTACCAGACGATTTATACATTTAAAGGCTCTGGGTCTACTGCAAATTTAGCCAGTTCAAATTTATTTTCTACAC
CTAGTGGTTCTATGGTTACCTCTGATGCCCAAATATTCATAAAACCTTATTTGGTTACAACGAGCACAGGGCCACA
ATAATGGCATTGTTGGGGTAACCAACTATTTGTTACTGTTGTTGATACTACACGCAGTACAAATATGTCATTAT
GTGCTGCCATATCTACTTCAGAACTACATATAAAAAATACTAACTTTAAAGGAGTACCTACGACATGGGGAGGAAT
ATGATACAGATTTATTTTCAACTGTGCAAAAATAACCTTAACTGCAGACGTTATGACATACATACATTCTATGA
ATTCCACTATTTTGGAGGACTGGAATTTTGGTCTACAACCTCCCCAGGAGGCACAGCGGCTAGGCGCATCGGCA
CGGGCAGCGGCACGGGCGCGCACGGGCTACATCCCGCTGCCCTTAAAAATAACACTTTTTTGGGAAGTAAATTT
TAAAGGAAAAGTTTTCTGCAGACCTAGATCAGTTTCCCTTTAGGACGCAAATTTTTACTACAAGCAGGATTGAAGG
CCAAACCAAAATTTACATTAGGAAAACGAAAAGCTACACCACCACCTCATCTACCTCTACAACCTGCTAAACGCA
AAAAACGTAAGCTGTA AAAAGCTTGGG

> L1wt (-h4) _E5m

GCGATATCTCTAGAGCCATGTCTCTTTGGCTGCCTAGTGAGGCCACTGTCTACTTGCCTCCTGTCCCAGTATCTA
AGGTTGTAAGCACGGATGAATATGTTGCACGCACAAACATATATTATCATGCAGGGACATCCAGACTACTTGCAG
TTGGACATCCCTATTTTCTATTTAAAAAACCTAACAAATAACAAAATATTAGTTCCATAAGTATCAGGATTACAAT
ACAGGGTATTTAGAATACATTTACCTGACCCCAATAAGTTTGGTTTTTCCGTACACCTCATTTTATAATCCAGATA
CACAGCGGCTGGTTTGGGCCCTGTGTAGGTGTTGAGGTAGGCCGTGGTCAGCCATTAGGTGTGGGCATTAGTGGCC
ATCCTTTATTAAATAAAATTTGGATGACACAGAAAATGCTAGTGCTTATGCAGCAAATGCAGGTGTGGATAATAGAG
AATGTATATCTATGGATTACAAACAAACACAATTGTGTTTAAATTTGGTTGCAAACCACCTATAGGGGAACACTGGG
GCAAAGGATCCCCATGTACCAATGTTGCAGTAAATCCAGGTGATTGTCCACCATTAGAGTTAATAAACACAGTTA
TTCAGGATGGTGATATGGTTGATACTGGCTTTGGTGCTATGGACTTTACTACATTACAGGCTAACAAAAGTGAAG
TTCCACTGGATATTTGTACATCTATTTGCAAATATCCAGATTATATTTAAATGGTGTGAGAACCATATGGCGACA
GCTTATTTTTTTTATTTACGGAGGGAACAAAATGTTTGTAGACATTTATTTAATAGGGCTGGTGTCTGTTGGTAAA
ATGTACCAGACGATTTATACATTTAAAGGCTCTGGGTCTACTGCAAATTTAGCCAGTTCAAATTTATTTTCTACAC
CTAGTGGTTCTATGGTTACCTCTGATGCCCAAATATTCATAAAACCTTATTTGGTTACAACGAGCACAGGGCCACA
ATAATGGCATTGTTGGGGTAACCAACTATTTGTTACTGTTGTTGATACTACACGCAGTACAAATATGTCATTAT
GTGCTGCCATATCTACTTCAGAACTACATATAAAAAATACTAACTTTAAAGGAGTACCTACGACATGGGGAGGAAT
ATGATTTACAGTTTTATTTTTCAACTGTGCAAAAATAACCTTAACTGCAGACGTTATGACATACATACATTCTATGA
ATTCCACTATTTTGGAGGACTGGAATTTTGGTCTACAACCTCCCCAGGAGGCACAGCGGCGTACGTGTGCCTGC
TGATCCGCCCCTGCTGGCGGCGTACTACATCATCTTCGTGTACATCCCGCTGCCCTTAAAAATAACACTTTTT
GGGAAGTAAATTTAAAGGAAAAGTTTTCTGCAGACCTAGATCAGTTTCCCTTTAGGACGCAAATTTTTACTACAAG
CAGGATTGAAGGCCAAACCAAAATTTACATTAGGAAAACGAAAAGCTACACCACCACCTCATCTACCTCTACAA
CTGCTAAACGCAAAAAACGTAAGCTGTA AAAAGCTTGGG

> L1wt (-34) _E5m

GCGATATCTCTAGAGCCATGTCTCTTTGGCTGCCTAGTGAGGCCACTGTCTACTTGCCTCCTGTCCCAGTATCTA
AGGTTGTAAGCACGGATGAATATGTTGCACGCACAAACATATATTATCATGCAGGGACATCCAGACTACTTGCAG
TTGGACATCCCTATTTTCTATTTAAAAAACCTAACAAATAACAAAATATTAGTTCCATAAGTATCAGGATTACAAT
ACAGGGTATTTAGAATACATTTACCTGACCCCAATAAGTTTGGTTTTTCCGTACACCTCATTTTATAATCCAGATA
CACAGCGGCTGGTTTGGGCCCTGTGTAGGTGTTGAGGTAGGCCGTGGTCAGCCATTAGGTGTGGGCATTAGTGGCC
ATCCTTTATTAAATAAAATTTGGATGACACAGAAAATGCTAGTGCTTATGCAGCAAATGCAGGTGTGGATAATAGAG
AATGTATATCTATGGATTACAAACAAACACAATTGTGTTTAAATTTGGTTGCAAACCACCTATAGGGGAACACTGGG
GCAAAGGATCCCCATGTACCAATGTTGCAGTAAATCCAGGTGATTGTCCACCATTAGAGTTAATAAACACAGTTA
TTCAGGATGGTGATATGGTTGATACTGGCTTTGGTGCTATGGACTTTACTACATTACAGGCTAACAAAAGTGAAG
TTCCACTGGATATTTGTACATCTATTTGCAAATATCCAGATTATATTTAAATGGTGTGAGAACCATATGGCGACA
GCTTATTTTTTTTATTTACGGAGGGAACAAAATGTTTGTAGACATTTATTTAATAGGGCTGGTGTCTGTTGGTAAA
ATGTACCAGACGATTTATACATTTAAAGGCTCTGGGTCTACTGCAAATTTAGCCAGTTCAAATTTATTTTCTACAC
CTAGTGGTTCTATGGTTACCTCTGATGCCCAAATATTCATAAAACCTTATTTGGTTACAACGAGCACAGGGCCACA
ATAATGGCATTGTTGGGGTAACCAACTATTTGTTACTGTTGTTGATACTACACGCAGTACAAATATGTCATTAT

GTGCTGCCATATCTACTTCAGAACTACATATAAAAACTAACTTTAAGGAGTACCTACGACATGGGGAGGAAT
ATGATTTACAGTTTATTTTTCAACTGTGCAAAAATAACCTTAACTGCAGACGTTATGACATACATACATTTCTATGA
ATTCCACTATTTTGGAGGACTGGAATTTTGGTCTACAACCTCCCCAGGAGGCACACTAGAAGATACTTATAGGT
TTGTAACATCCCAGGCAATTGCTTGTCAAAAACATACACCTCCAGCACCTAAAGAAGATCCCCTTAAAAAATACA
CTTTTTGGGAAGTAAATTTAAAGGAAAAGTTTTCTGCAGACCTAGATCAGTTTTCTTTAGGACGCAAATTTTTAC
TACAAGCGGCGTACGTGTGCTGCTGATCCGCCCCTGCTGGCGGCGTACTACATCATCTTCGTGTACATCCCCG
TGTAAGGCTTGGG

>GI:333031 Gene L2 do Papilomavírus Humano 16

ATGCGACACAAAACGTTCTGCAAAAACGCACAAAACGTCATCGGCTACCCAACCTTTATAAAAACATGCAAACAGGCA
GGTACATGTCCACCTGACATTATACCTAAGGTTGAAGGCAAAACTATTGCTGAACAAATATTACAATATGGAAGT
ATGGGTGATTTTTTGGTGGGTTAGGAATTGGAACAGGGTCCGGGTACAGGCGGACGCACTGGGTATATTCATTG
GGAACAAGGCTCCACAGCTACAGATACACTTGCTCCTGTAAGACCCCTTTAACAGTAGATCCTGTGGGCCCT
TCTGATCCTTCTATAGTTTCTTTAGTGAAGAAAAGTTTTTATGATGCTGGTGCACCAACATCTGTACCTTCC
ATTCACCCAGATGATCAGGATTTAGTATTACTACTTCAACTGATACCACACCTGCATATATTAGATATTAATAAT
ACTGTTACTACTGTTACTACACATAATAATCCCACTTTCACTGACCCATCTGTATTGCAGCCTCCAACACCTGCA
GAAACTGGAGGGCATTTTACACTTTCATCATCCACTATTAGTACACATAATTATGAAGAAATTCCTATGGATACA
TTTTATTGTTAGCACAAAACCTAACACAGTAACTAGTAGCACACCCATACCAGGGTCTCGCCAGTGGCACGCCTA
GGATTATATAGTCGCACAAACACAACAGGTTAAAGTTGTAGACCCCTGCTTTTGTAAACCTCCCACTAAACTTATT
ACATATGATAATCCTGCATATGAAGGTATAGATGTGGATAATACATTATATTTTTCTAGTAATGATAATAGTATT
AATATAGCTCCAGATCCTGACTTTTTGGATATAGTTGCTTTACATAGGCCAGCATTAACTCTAGGCGTACTGGC
ATTAGGTACAGTAGAATTGGTAATAAAACAAACACTACGTACTCGTAGTGGAAAATCTATAGGTGCTAAGGTACAT
TATTATTATGATTTAAGTACTATTGATCCTGCAGAAGAAATAGAATTACAACTATAACACCTTCTACATATACT
ACCACTTCACATGCAGCCTCACCTACTTCTATTAATAATGGATTATATGATATTTATGCAGATGACTTTATTACA
GATACTTCTACAACCCCGGTACCATCTGTACCCTCTACATCTTTATCAGGTTATATTCCTGCAAATACAACAATT
CCTTTTTGGTGGTGCATACAATATTCCTTTAGTATCAGGTCCTGATATACCCATTAATATAACTGACCAAGCTCCT
TCATTAATTCCTATAGTTCCAGGGTCTCCACAATATACAATTTATGCTGATGCAGGTGACTTTTTATTACATCCT
AGTTATTACATGTTACGAAAACGACGTAACGTTTACCATATTTTTTTTTCAGATGTCTCTTTGGCTGCCTAG

>L2wt

CGGGATCCGCCATGGGCCACCACCACCACCACCACCACGGCCGACACAAAACGTTCTGCAAAAACGCACAAAAC
GTGCATCGGCTACCCAACCTTTATAAAAACATGCAAACAGGCAGGTACATGTCCACCTGACATTATACCTAAGGTTG
AAGGCAAAACTATTGCTGAACAAATATTACAATATGGAAGTATGGGTGATTTTTTGGTGGGTTAGGAATTGGAA
CAGGGTCCGGTACAGGCGGACGCACTGGGTATATTCATTGGGAACAAGGCCCTCCACAGCTACAGATACACTTG
CTCCTGTAAGACCCCTTTAACAGTAGATCCTGTGGGCCCTTCTGATCCTTCTATAGTTTCTTTAGTGGAAAGAA
CTAGTTTTATTGATGCTGGTGCACCAACATCTGTACCCTCCATTCACCCAGATGTATCAGGATTTAGTATTACTA
CTTCAACTGATACCACACCTGCTATATTAGATATTAATAACTGTTACTACTGTTACTACACATAATAATCCCA
CTTTCACTGACCCATCTGTATTGCAGCCTCCAACACCTGCAGAACTGGAGGGCATTTTACACTTTCATCATCCA
CTATTAGTACACATAATTATGAAGAAATTCCTATGGATACATTTATTGTTAGCACAAAACCTAACACAGTAACTA
GTAGCACACCCATACCAGGGTCTCGCCAGTGGCACGCCTAGGATTATATAGTCGCACAAACACAACAGGTTAAAG
TTGTAGACCCCTGCTTTTGTAAACCTCCCACTAACTTATTACATATGATAATCCTGCATATGAAGGTATAGATG
TGGATAATACATTATATTTTTCTAGTAATGATAATAGTATTAATATAGCTCCAGATCCTGACTTTTTGGATATAG
TTGCTTTACATAGGCCAGCATTAACTCTAGGCGTACTGGCATTAGGTACAGTAGAATTGGTAATAAAACAAACAC
TACGTACTCGTAGTGGAAAATCTATAGGTGCTAAGGTACATTATTTATGATTTAAGTACTATTGATCCTGCAG
AAGAAATAGAATTACAACTATAACACCTTCTACATATACTACCCTTCACATGCAGCCTCACCTACTTCTATTA
ATAATGGATTATATGATATTTATGCAGATGACTTTATTACAGATACTTCTACAACCCCGGTACCATCTGTACCCT
CTACATCTTTATCAGGTTATATTCCTGCAAATACAACAATTCCTTTTTGGTGGTGCATACAATATTCCTTTAGTAT
CAGGTCTGATATACCCATTAATATAACTGACCAAGCTCCTTCATTAATTCCTATAGTTCCAGGGTCTCCACAAT
ATACAATTTATGCTGATGCAGGTGACTTTTTATTACATCCTAGTTATTACATGTTACGAAAACGACGTAACGTT
TACCATATTTTTTTTTCAGATGTCTCTTTGGCTGCCAAGCTTGGG

>E5B1

GCGGATCCGCCATGGGCGACACGTACCGCTACATCGGGCGGCCCAACCTGTGGTTCCCTCCTGTTCCCTGGGACTCG
TCGCCGCTATGGGCCTCCTCCTCCTGCTGTTCCCTGCTGCTGTTCTTCCTGGTGTACTGGGACCACTTTGAGTGTA
GCTGCACCGGCCTGCCTTTCAAGCTT

>E5otH16

GCGGATCCGCCATGGGCGACACGTACCGCTACATCGGGCGGCTACTGCATTACACAATATAACCGGTGTCCTGTTCCG
CACTGCTCTGCGTGCTCCTCTGCGTTTGTCTGCTGATACGGCCTCCTCCTGCTGTCAGTGTCTACTTACACAAGTC
TCATTATCCTGGTGCTGCTGCTGTTGGATCACAGCAGCCTCCGCCTTTAGATGTTTTATCGTTTTATATCATTTCG
TGTATATACCACTGTTTCTGATCCATACCCATGCAAGATTCCTGATCACAAAGCTT

> E5multi

GCGGATCCGCCATGGGCGACACGTACCGCTACATCGGGCGGCTGTGTGCTGCTGTGCGTGTGTCTCCTCATTCCGCC
CCCTCCTGCTGAGTGTGTCTACTTGCCTGCTGCTGTTGTTGTTGCTGCTGATCCGCCCCCTGCTCCTGTCCGTGA
GTACACGCTGCTTCATCGTGTACATCATTTCGTTTATATCCCTCTGTTCCCTGATCCACACACGCTGTTTCATTG
TGTATATAATCTTCGTGTACATCCCACTGTTTCTGATCCATACCAAGCTT

Validação global dos modelos gerados.

Valores que atingiram os critérios ideais estão marcados em verde; próximo aos valores ideais, em amarelo; fora dos valores ideais, em vermelho.

L1-L2

	Rotâmeros desfavoráveis	Rotâmeros favoráveis	Ramachandran desfavoráveis	Ramachandran favoráveis	Desvios C β	Ligações desfavoráveis	Ângulos desfavoráveis	Prolinas não Cis
Valor (%)	1,05	97,12	0,45	97,07	0	4,9	2,5	0,2
Ideal (%)	<0,3	>98	<0,05	>98	0	0	<0,1	<0,05

L1-E5m.h4

	Rotâmeros desfavoráveis	Rotâmeros favoráveis	Ramachandran desfavoráveis	Ramachandran favoráveis	Desvios C β	Ligações desfavoráveis	Ângulos desfavoráveis	Peptídeos torcidos
Valor (%)	0,77	98,21	0,45	95,31	0	5,2	2,4	1,56
Ideal (%)	<0,3	>98	<0,05	>98	0	0	<0,1	0

L1-E5m.34

	Rotâmeros desfavoráveis	Rotâmeros favoráveis	Ramachandran desfavoráveis	Ramachandran favoráveis	Desvios C β	Ligações desfavoráveis	Ângulos desfavoráveis	Peptídeos torcidos
Valor (%)	0,51	97,22	0,88	97,57	0	4,7	2,3	1,76
Ideal (%)	<0,3	>98	<0,05	>98	0	0	<0,1	0

Manuscrito publicado como primeiro autor:

Hindawi Publishing Corporation
BioMed Research International
Article ID 594120



Research Article

Development of an IP-Free Biotechnology Platform for Constitutive Production of HPV16 L1 Capsid Protein Using the *Pichia pastoris* PGK1 Promoter

F. C. Mariz,^{1,2} E. C. Coimbra,¹ A. L. S. Jesus,¹ L. M. Nascimento,²
F. A. G. Torres,³ and A. C. Freitas¹

¹Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental, Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil

²Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, 50740-465 Recife, PE, Brazil

³Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, 70910-900 Brasília, DF, Brazil

Correspondence should be addressed to A. C. Freitas; acf_ufpe@yahoo.com.br

Received 18 September 2014; Revised 18 December 2014; Accepted 5 January 2015

Academic Editor: Juergen Mairhofer

Copyright © F. C. Mariz et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The human papillomavirus (HPV) L1 major capsid protein, which forms the basis of the currently available vaccines against cervical cancer, self-assembles into virus-like particles (VLPs) when expressed heterologously. We report the development of a biotechnology platform for HPV16 L1 protein expression based on the constitutive PGK1 promoter (P_{PGK1}) from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. The L1 gene was cloned under regulation of P_{PGK1} into pPGKΔ3 expression vector to achieve intracellular expression. In parallel, secretion of the L1 protein was obtained through the use of an alternative vector called pPGKΔ3α, in which a codon optimized α-factor signal sequence was inserted. We devised a work-flow based on the detection of the L1 protein by dot blot, colony blot, and western blot to classify the positive clones. Finally, intracellular HPV VLPs assembly was demonstrated for the first time in yeast cells. This study opens up perspectives for the establishment of an innovative platform for the production of HPV VLPs or other viral antigens for vaccination purposes, based on constitutive expression in *P. pastoris*.

1. Introduction

HPVs are a large family of dsDNA viruses that cause benign warts and malignant tumors. Persistent infection by HPV imposes a huge burden on health services worldwide owing to its links with cancer of the vagina, vulva, penis, anus, tongue, and, in particular, uterine cervix, which is the most serious outcome [1]. About 75% of sexually active people are exposed to HPV during their lifetime [2]. Some of the nearly 120 HPV genotypes reported [3] are encountered in virtually 100% of cervical tumors and can thus be classified as high-risk HPV (hr-HPV) types [4]. Nearly 1.4 million women are affected by cervical cancer all over the world while 520,000 new cases and 274,000 resulting deaths are reported annually, which leads to a mortality rate of 55% [5]. Although HPV16 and HPV18

are responsible for 70% of cervical cancer cases worldwide [5], there are other 12 hr-HPV types whose prevalence is subject to regional variations [6]. In Brazil, HPV16 is the most common genotype, but HPV31 and HPV33 are as prevalent as HPV18, at least in the Northeast and Midwest Regions [7], which illustrates the urgent need to set up vaccination programmes where HPV is prevalent. Apart from the cervical intraepithelial lesions of all grades and warts, it is estimated that 5% of all human cancers are associated with this viral infection [8].

Middle-income developing countries, where more than 80% of the related deaths are found, have failed to establish cervical screening programs in a satisfactory manner [5]. Since 2008, two protective vaccines have been licensed for prophylaxis against HPV infection. Gardasil (Merck) and

Cervarix (GlaxoSmithKline) contain HPV VLPs produced in *Saccharomyces cerevisiae* and baculovirus-infected cells, respectively. Although these vaccines are highly effective and safe [9, 10], their prohibitive costs prevent them from being widely available in developing countries [11]. However, the regional production of prophylactic HPV vaccine could overcome the problem of this price barrier by reducing the cost and also filling the current demand and supply gap [12].

Production of HPV VLPs can be achieved through the expression of recombinant major capsid protein L1 in heterologous systems [14, 15]. These particles preserve the conformational epitopes from native virions and are thus able to induce high titers of neutralizing antibodies [14]. Different expression platforms have been explored for producing HPV VLPs with varying degrees of success [14, 16–20]. Bacterial expression systems are limited to producing economically significant amounts of recombinant HPV VLPs [20, 21] and, among the eukaryotic systems, yeast cells have the greatest potential because of their high expression levels, combined with simple growth requirements and high growth rates.

The expression and characterization of HPV VLPs from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* has been described elsewhere [12, 22–24]. In these studies, the expression of HPV L1 genes was under the control of the promoter from the alcohol oxidase I gene (*AOX1*), which is tightly regulated at the transcription level. Recombinant protein expression under the control of P_{AOX1} relies on a preliminary production of yeast biomass through cultivation on glucose/glycerol, followed by induction of protein production in the presence of methanol as the sole carbon source [25]. Despite the success of the *AOX1*-based system, the use of methanol as an inducer has drawbacks such as its inflammability, toxicity, and biomass generation requirements prior to the induction phase. This means there is the need for longer time-based protocols, a rigid control of methanol levels during the induction phase, and the use of an inducer compound, which is particularly unsuitable when planning an industrial platform [25]. Furthermore, there is evidence that the culture conditions required for P_{AOX1} induction can compromise the expression levels of other VLPs and this can affect HPV L1 expression [22, 26, 27].

The isolation and molecular characterization of the 3-phosphoglyceratekinase gene (*PGK1*) from *P. pastoris* was reported by de Almeida et al. [28]. In yeast, *PGK1* encodes a glycolytic enzyme which also acts in the gluconeogenic pathway and may represent 5% of the total cellular protein [29]. Secretion of *Bacillus subtilis* α -amylase protein was carried out effectively under the control of the constitutive P_{PGK1} from *P. pastoris* cells grown in glucose, glycerol, or methanol, whereas cells grown in glucose displayed higher expression levels [28]. Unlike the P_{AOX1} -based system, biomass generation and protein production occur simultaneously in medium containing glucose or glycerol. Although a constitutive expression is not recommended when the protein of interest is toxic to the yeast cell [26, 30], this is not the case for HPV L1 protein since its expression has been efficiently achieved for approximately 144 hours [31]. These features make the P_{PGK1} an attractive system for heterologous expression in *P. pastoris*.

In this study, we explored the development of an innovative heterologous expression system for production of HPV16 L1 protein. For this purpose, the P_{PGK1} -driven constitutive expression of the L1 protein was investigated, both through intracellular and secretory pathways. In order to select well-expressing yeast clones, we combined the use of dot blot, colony blot, and western blot techniques in a workflow for the detection of the L1 protein. Additionally, evidence that HPV L1 protein self-assembles into VLPs was observed *in vivo* by transmission electron microscopy. To date, this is the first report of heterologous expression in *P. pastoris* which uses the P_{PGK1} for biopharmaceutical purposes.

2. Materials and Methods

2.1. Strains and Cell Culture Media. *Escherichia coli* DH5 α strain [F Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-, mK+) phoA supE44 λ -thi-1 gyrA96relA1] was routinely used as a host for cloning and plasmid manipulations. This strain was cultured at 37°C in LB medium (0.5% yeast extract, 1% NaCl, 1% tryptone) supplied with appropriate antibiotics.

The *P. pastoris* X-33 strain (wild-type) used in this study was purchased from Invitrogen. The yeast cells were grown at 30°C on YPD medium (1% yeast extract, 2% Bacto-peptone, 2% glucose) and YPDS (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose, 1M sorbitol) supplemented with 100 μ g/mL zeocin (Invitrogen) when necessary.

All the molecular cloning techniques were carried out as previously described [32]. Restriction enzymes used for cloning were purchased from Promega and used in accordance with manufacturer's recommendations. DNA sequencing analysis was performed on a Genetic Analyser 3500 automatic sequencer (Life Technologies).

2.2. Cloning of the HPV16 L1 and Construction of Expression Vectors. A DNA sequence encoding the HPV16 L1 protein (Gen Bank access number GI: 27752860) was designed with codons optimized for expression in *P. pastoris*. Restriction sites for *XhoI* and *NotI* were added to the flanking regions of the L1 gene so that the cloning could be directed into the expression vector. The gene was synthesized by Epoch Biosciences (TX, USA), and cloned into pBSK plasmid. The resulting construct called pBSK/L1 was amplified in *E. coli* DH5 α . L1 gene was released from pBSK after double-digestion with *XhoI* and *NotI* and employed for creating the expression vectors.

Two expression vectors were constructed with the P_{PGK1} promoter from *P. pastoris* for constitutive expression of the L1 protein. The original 2 kb P_{PGK1} sequence described by de Almeida et al. [28] was reduced to a minimal ~400 bp sequence after deletion analysis with restriction enzymes [33]. The resulting P_{PGK1} sequence was used to generate the pPGK Δ 3 expression vector for intracellular expression. Additionally, a pPGK Δ 3 α expression vector carries a codon-optimized *S. cerevisiae* α -factor signal sequence (α -MF) cloned downstream to P_{PGK1} to drive recombinant protein secretion. Both P_{PGK1} -based vectors contain the zeocin

resistance gene *Sh ble* for positive selection of *E. coli* and *P. pastoris* recombinants, as well as a C-terminal polyhistidine (6xHis) tag for detection of the fusion protein by immunoblot assays. The L1 gene previously digested with *XhoI* and *NorI* was cloned into pPGKΔ3α and pPGKΔ3 expression vectors digested with the same enzymes, and the resulting vectors were called pPGKΔ3α/L1 and pPGKΔ3/L1, respectively. The construction of the vectors was confirmed by restriction digestion, PCR and DNA sequencing with specific primers for both L1 (5' TAGGATCCATGTCATTATGGCTTCCA 3' and 5' CTGGATCCTTAATGATGATGATGATGATGCAAA 3' which flank the entire gene while 5' GGTC AACCTTAGGAGTTGG 3' and 5' GACGAACATTTGTTCCCTCA 3' amplify an internal L1 fragment of ~400 bp) and P_{PGK1} (5' TCATAGTTCATCCCTCTCTCC 3') sequences.

2.3. Electroporation of Yeasts and Selection of *P. pastoris* Recombinant Strains. Stable integration into the *PGK1* locus of *P. pastoris* was achieved after linearization of the 5 μg P_{PGK1}-based expression vectors with *SacI* [33]. *P. pastoris* electrocompetent cells were prepared and transformed, as described elsewhere [13]. In this work, yeast clones were either referred as *P. pastoris/pPGKΔ3α/L1* or *P. pastoris/pPGKΔ3/L1*, depending on the vector that was used.

After selection on agar plates containing YPD supplemented with 100 μg/mL zeocin, the transformants were subjected to a general procedure for the selection of clones containing multiple copies of the expression cassette, called Posttransformational Vector Amplification (PTVA) process [13]. For this purpose, yeast clones were later plated on higher concentrations of zeocin (100, 500, and 1000 μg/mL).

2.4. Screening of Well-Expressing *Pichia* Clones by Dot Blot and Colony Blot Assays. Multicopy clones resistant to 1000 μg/mL zeocin were subjected to a general screening for selection of recombinant strains expressing high levels of HPV L1 protein. The screening was carried out as follows: (i) *P. pastoris/pPGKΔ3α/L1* clones were cultivated in agar plates and subsequently subjected to colony blot for detection of HPV L1 protein with the CamVir anti-HPV16 L1 monoclonal antibody (Chemicon, USA); (ii) In contrast, *P. pastoris/pPGKΔ3/L1* clones were subsequently grown in deep-well plates to detect HPV L1 protein by dot blot with the anti-L1 monoclonal antibody.

In the case of colony blot, the protocol described by Goodnough et al. [34] was modified as follows. After cultivation of *P. pastoris/pPGKΔ3α/L1* multicopy clones in YPD agar plates for 3 days at 30°C, the PVDF membranes were cut as discs and left standing with the surface colonies for 3 hours at 28°C. Colonies on the master plate could be replicated by placing the PVDF discs on a fresh agar plate when desired. The PVDF discs were washed with tris-buffered saline (TBS) containing 0.05% Tween 20 (TBST) to remove adhering cells. The membranes were blocked by incubation in TBST, supplemented with 5% nonfat milk for 1 hour at room temperature, and then incubated overnight at 4°C with anti-L1 antibody properly diluted (1:1000) in the blocking solution. PVDF discs were washed three times with TBST for 10 min and then incubated for 1 hour at room

temperature with peroxidase-conjugated goat anti-mouse immunoglobulin (IgG, Sigma-Aldrich) diluted 1:3000 in the blocking solution. Chemiluminescence reaction was detected with an ECL kit (GE Healthcare).

For the dot blot assay, *P. pastoris/pPGKΔ3/L1* multicopy clones were first grown in a deep-well plate containing YPD medium for 3 days at 30°C. The plate was shaken at 300 rpm and *P. pastoris* cells were harvested by centrifugation at 3000 rpm for recovery of the pellets. Preparation of yeast extracts was performed with an "alkaline lysis" procedure as previously described [35]. Briefly, the cell pellets were resuspended in lysis buffer (0.1 M NaOH, 0.05 M EDTA, 2% SDS, 2% β-mercaptoethanol) and heated to 90°C for 10 min and the lysate was brought to neutral pH. To improve solubilization, the lysate was heated again for 10 min and mixed with loading buffer (0.25 M Tris-HCl pH 6.8, 50% glycerol). The PVDF membranes were cut in a proper way and inserted into a dot blotter apparatus. Protein transfer to the membranes was carried out with 100 μL of the lysate for 1 hour and, thereafter, the immunoblot proceeded as already described for the colony blot. The HPV16 L1 protein that was episomally expressed in *P. pastoris* [22] was used as positive control for both dot blot and western blot assays.

2.5. Protein Expression in Shake-Flask Cultures. *P. pastoris* multicopy clones were selected for baffled-flask cultivation in accordance with the highest detected level for the HPV L1 protein. *P. pastoris/pPGKΔ3α/L1* clones were first preinoculated in 5 mL of YPD to achieve the secretion of the L1 protein and grown at 28–30°C in a shaking incubator (250–300 rpm) until the cultures reached an OD₆₀₀ of ~10 (24 hours). Following this, the cells were inoculated in 20 mL of YPD for 3 days and aliquots were taken for analysis at periodic intervals. These samples were centrifuged at 12000 g for 2 min and the supernatants were stored for further analysis. For the intracellular expression of the L1 protein, *P. pastoris/pPGKΔ3/L1* clones were subjected to the same protocol but the cell pellets were stored instead of the supernatants.

2.6. Preparation of Intra- and Extracellular Protein Extracts. Aliquots of supernatants were submitted to precipitation with trichloroacetic acid (TCA) (Sigma-Aldrich) to a final concentration of 10% to allow the secretory production of the HPV L1 protein to be analyzed. After concentration, the supernatant was discarded, and the protein pellet was resuspended again in 100% acetone to remove residual TCA. A final volume of SDS-loading buffer (1 M Tris-HCl, pH 6.8, 10% SDS, 0.5% β-mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue) was then added to the washed pellet (corresponding to 100x concentration) and this mix was resolved on 15% SDS PAGE after the samples had been heated for 10 min at 75°C. Polyacrylamide gel was either stained with Coomassie brilliant blue (Pierce, IL, USA) or transferred to PVDF membranes using a V20-SDB semidry protein transfer apparatus (Scie-plas, Cambridge, UK). Immunoblot was performed as described in Section 2.4.

Preparation of cell extracts for intracellular analysis of the L1 expression was carried out with breaking buffer and acid-washed sterile glass beads (0.45 mm in diameter),

according to Cregg et al. [36]. This crude protein sample was mixed in gel loading buffer and prepared for SDS PAGE and western blot (as described above).

2.7. Electron Microscopy. At the end of the induction course, both the cells and culture supernatants were subjected to absorption into carbon-coated grids, as recommended by Falcón et al. [37]. The grids were subjected to examination with a FEI Morgani 268D transmission electron microscope, operated at 100 kV, in order to analyze the VLP formation in cytoplasm and culture medium of recombinant yeast-expressing HPV L1 protein.

3. Results and Discussion

3.1. Construction of Expression Vectors and Generation of *Pichia* Recombinant Strains. For the production of HPV16 L1 protein, we used a heterologous expression system based on the constitutive *P. pastoris* PGK1 promoter which was originally described and employed for secretion of α -amylase from *Bacillus subtilis* [28]. In this work, a variant of the PGK1 promoter sequence containing ~400 bp was used to allow integration of the expression vector via homologous recombination, as well as a codon-optimized α -factor from *S. cerevisiae* to drive the secretion of recombinant proteins (Figures 1(a) and 1(c)). Since previous studies have analyzed different protocols to optimize VLP production and purification steps in yeast [38–41], we believe that secretion of HPV L1 in the culture media could assist downstream processing. The analysis by PCR, DNA sequencing (data not shown), and restriction digestion showed the successful cloning of a codon-optimized L1 gene into P_{PGK1}-based vectors (Figure 1(b), left panel). *P. pastoris*/pPGK Δ 3 α -L1H16 and *P. pastoris*/pPGK Δ 3-L1H16 recombinant strains were obtained after electroporation of yeast cells with the linearized expression cassettes (Figure 1(b), right panel) and further selection on agar plates containing zeocin.

Although recombination with the expression cassette confers zeocin-resistance to *P. pastoris* cells, there is no way to ensure that a heterologous gene will be expressed at high levels. The selection of clones containing multiple copies of an expression cassette represents an attractive strategy for increasing expression levels [13]. Multicopy clones can be screened by transformants that are resistant to high levels of a selectable marker compound. However, this effective method is still laborious and inefficient, since 50 to 100 transformants usually need to be screened to have a reasonable chance of finding the 1-2% multicopy (>10 copies) clones [42]. Recently, an iterative process termed Posttransformational Vector Amplification (PTVA) has been investigated to generate *P. pastoris* clones containing multiple copies of the entire vector in the genome through the submission of transformants, which were initially selected on a low level of drug and only contained one or a few copies of the vector, to higher levels of zeocin [13]. Molecular details of this process are still unknown, but an analysis of PTVA-selected clones showed a three-to-five-fold increase in the vector copy number, as well as the integration of all the copies into the *P. pastoris* genome in the same locus as

the original copy. In this work, we tested the generation of multicopy clones by the PTVA process starting with 55 transformants from each cassette. After growth on agar plates with increasing zeocin levels, 50 *P. pastoris*/pPGK Δ 3-L1H16 clones and 52 *P. pastoris*/pPGK Δ 3 α -L1H16 clones showed resistance to 1000 μ g/mL zeocin. Zeocin resistance levels can be directly correlated with the copy numbers of the expression cassette integrated in the genome. The clones that only harbor one copy of the integrated expression cassette are resistant to 100 μ g/mL zeocin, while integration of 2, 3, and 4 cassette copies causes resistance of up to 500, 1000, and 2000 μ g/mL zeocin [26].

3.2. Well-Expressing *Pichia* Clones Are Rapidly Screened by Dot and Colony Blot. Compared with *E. coli*-based expression systems, the main disadvantage of *P. pastoris* is that it relies on the heterogeneous expression levels of the exogenous gene when the primary transformants are being analyzed [43]. Multicopy screening has the potential to enhance strains expressing increased levels of the heterologous gene, but only a small portion (5%) of highly drug-resistant colonies are generated as a result of an increased gene dosage. Most transformants are resistant to drugs for other (unknown) reasons [13]. Hence, we established a workflow based on the cultivation of recombinant yeasts in deep-well and agar plates and carried out a further analysis by dot and colony blot to identify well-expressing clones. Through this general approach, we were able to access the expression levels of 52 pPGK Δ 3 α /L1H16 colonies and 25 pPGK Δ 3/L1H16 colonies. The multicopy clones generated by the PTVA process displayed a uniform expression signal (Figures 2(a) and 2(b)). The lack of detection by the *P. pastoris* cells that had been transformed by the parental expression vectors (empty PGK-based vectors) together with the detection of the L1 protein expressed episomally in *P. pastoris* cytosol ensured the specificity of the reaction.

It is worth noting that this practical and rapid workflow provides a strategy to screen well-expressing clones through cultivation under nonoptimal conditions—with regard to culture volume, shaking, and aeration, as is the case for deep-well and agar plate cultures—among a considerable high number of colonies. The colony blot assay has an important feature, particularly in the case of PGK-based clones that secrete L1 protein, which is the dispensable use of liquid media. Since *P. pastoris* secretes few proteins into the medium [25, 30, 43], screening strategies based on cultivation in liquid media may be unsuitable and require protein precipitation, for example, which is not the case here.

3.3. HPV16 L1 Expression in Shake Flasks under PGK1 Regulation. Expression of the major capsid protein of HPV16 in *P. pastoris* was first reported by Bazan et al. [22]. According to these authors, the expression level achieved was higher than that obtained in *S. cerevisiae*. Despite being innovative and important means of demonstrating the feasibility of *Pichia* in producing HPV VLPs, the work carried out by Bazan and colleagues, employed a nonintegrative system. As the authors (and other studies) point out, the use of episomal plasmids is not recommended for industrial purposes, since they have

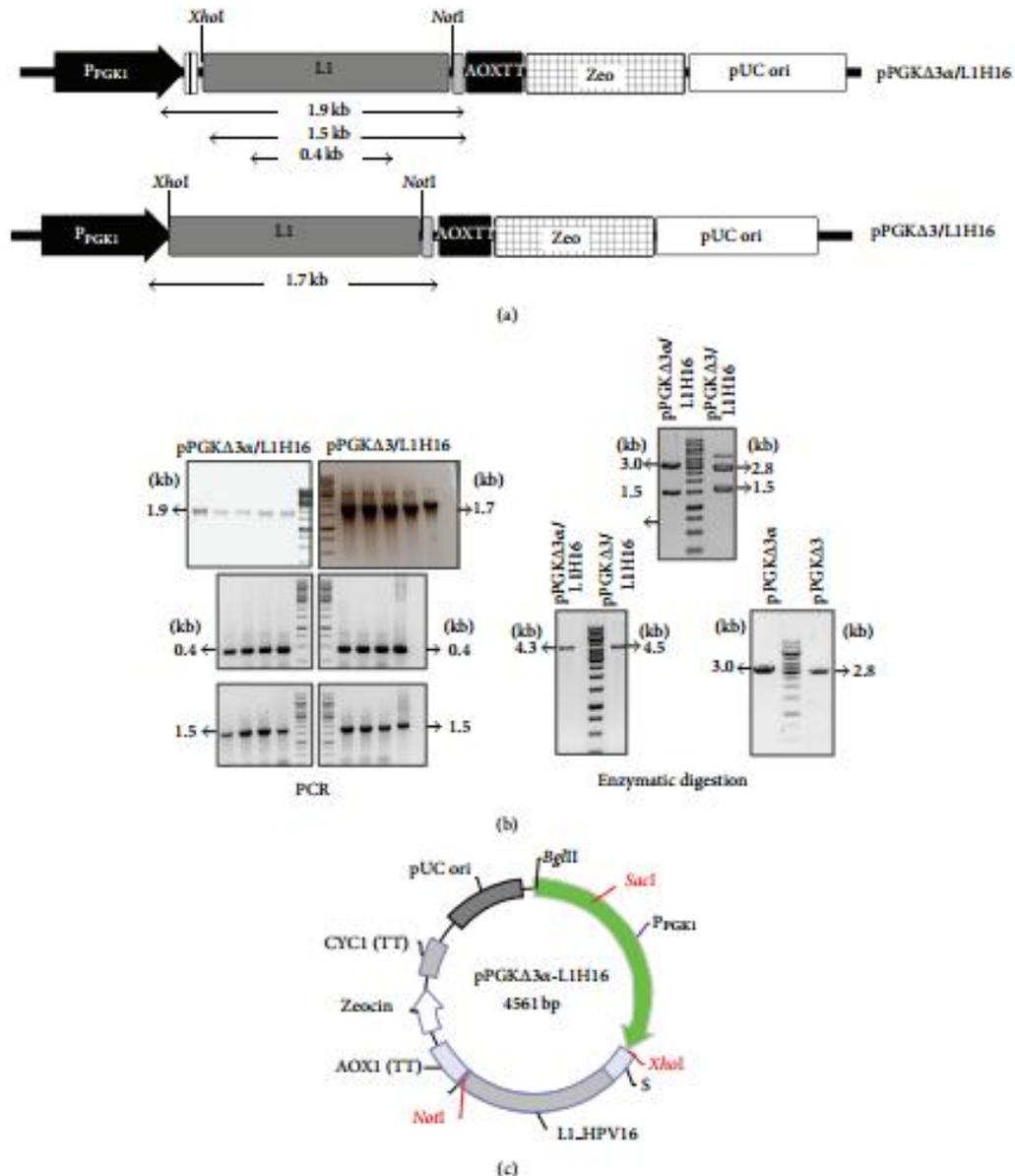


FIGURE 1: Construction of cassettes for HPV16 L1 gene expression under the control of P_{PGK1}. (a) Schematic illustration of the two expression cassettes in which fragment lengths are highlighted for the confirmation analysis: primers flanking part of the P_{PGK1} and the L1 gene render a 1.9 kb fragment from the pPGKΔ3α/L1H16 vector and a 1.7 kb fragment from the pPGKΔ3/L1H16 vector; primers flanking the L1 gene renders a 1.5 kb fragment from both vectors; internal L1 primers render a 0.4 kb fragment from both vectors. (b, left panel) Expression vectors were extracted from recombinant bacterial strains and subjected to PCR analysis: the three DNA fragments predicted in (a) were amplified from the extracted DNA plasmids. (b, right panel) Extracted DNA plasmids were further confirmed by restriction digestion with XhoI and NotI enzymes (upper line), through which the release of the L1 gene (1.5 kb) could be observed, along with the presence of pPGKΔ3α (3 kb) and pPGKΔ3 (2.8 kb) vectors. After confirmation by PCR and restriction digestion, the P_{PGK1}-based cassettes were linearized with SacI (lower line) prior to transformation of *P. pastoris*. (c) Map of pPGKΔ3α-L1H16. PGK1 promoter and AOX1 transcription terminator regions are flanking the L1 gene at its 5' and 3' ends, respectively. Besides the *E. coli* pUC origin and zeocin selection maker, this construct carries a codon-optimized *S. cerevisiae* α-MF (S) downstream from the PGK1 promoter, which is absent in the pPGKΔ3/L1H16 vector. The positions of XhoI, NotI, and SacI restriction sites are also highlighted on the map. The map is merely illustrative and there is no correlation between the sizes of the highlighted regions.

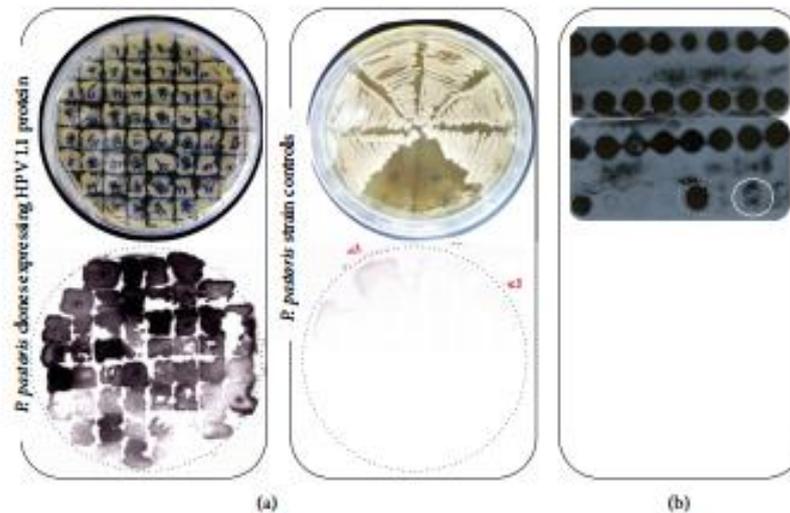


FIGURE 2: Selection of well-expressing clones. *P. pastoris* transformants were subsequently subjected to higher drug levels (100, 500, and 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ zeocin) for screening of multicopy strains. (a) Secretion of HPV L1 protein from the *P. pastoris*/pPGK Δ 3a/L1 clones resistant to 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ zeocin was detected by colony blot. Absence of detection in the *P. pastoris* strains controls (yeasts transformed with the parental vectors) ensured the reliability of the reaction. (b) Intracellular expression of HPV L1 protein was confirmed in *P. pastoris*/pPGK Δ 3/L1 clones resistant to 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ zeocin by dot blot. HPV16 L1 protein episomally expressed in *P. pastoris* was used as positive control (dotted circle in white), while *P. pastoris* strain transformed with the empty vector was used as negative control (circle in white).

been associated with the generation of recombinant strains that are genetically unstable and have two undesirable outcomes: (i) instability in the heterologous expression levels; (ii) continuous antibiotic selection which is needed to maintain the expression plasmids [25, 26, 44]. Heterologous L1 protein from other HPV genotypes was also reported in *P. pastoris* by employing AOX1-based integrative vectors [12, 23, 24].

With regard to the metabolization of methanol, *P. pastoris* strains present three distinct phenotypes: (i) the wild-type phenotype designated as methanol utilization plus (Mut^+) and characterized by the presence of a functional copy of the alcohol oxidase 1 gene (AOX1) which is responsible for 85% of the utilization of methanol by the alcohol oxidase enzyme; (ii) methanol utilization slow (Mut^s) phenotype, characterized by the absence of the AOX1 gene and presence of the AOX2 gene, which is about 97% homologous to AOX1 but much less expressed; (iii) methanol utilization minus (Mut^-) phenotype, where both AOX genes are absent. Hence, while Mut^+ strains show a poor growth on methanol medium, the Mut^s strains have a greater growth rate and Mut^- strains, in contrast, are unable to grow on methanol as the sole carbon source. Interestingly, Cregg et al. [27] showed that *P. pastoris* Mut^+ strains expressed 10-fold less HBsAg than Mut^s strains, which suggests that consumption of methanol at high levels, coupled with a rapid growth rate, may not lead to efficient HBsAg assembly [26]. In addition, HPV VLPs expressed under AOX1 regulation were described as unstable and inadequately assembled [22], although these features were reversed after the incubation of the VLPs under refolding conditions. In light of this, these findings suggest that cell requirements during P_{AOX1} induction are nonoptimal

for the production of HBV and HPV VLPs. Finally, even though recombinant protein expression in *Pichia* Mut^+ strain could circumvent the deficiencies observed for the generation of VLPs in Mut^+ strains, the slower methanol utilization phenotype requires long fermentation times to reach peak product concentrations. Once induced, the entire culture cannot be used to start a new culture [26].

In contrast with the reports employing P_{AOX1} -based system, we constitutively expressed the L1 protein through P_{PGK1} in the presence of glucose and by employing an easier cultivation/expression schedule in shake flasks, since L1 expression occurred together with the cell growth and the laborious control of the methanol/inducer levels was dispensable (Figures 3(a) and 3(b)). By using the anti-HPV16 L1 monoclonal antibody, it was demonstrated that a 56 kDa protein was present in the cellular lysate during the cultivation course (Figure 3(b), L1 secretion will be further discussed), while no detection was observed in the control extracts. A continuous culture strategy, which is a cost-effective method for large-scale production, could be achieved through the use of P_{PGK1} -driven expression and would be attractive as it allows an indefinite theoretical production of the heterologous protein [26]. Although there have been a number of different reports showing genetic instability in *P. pastoris* multicopy strains induced with methanol [45–47], we have not observed the same results with the PGK-based clones explored in our work. HPV L1 has been successively detected by western blot after approximately 90 generations, even in the absence of zeocin (Figure 3(b), lower panel). Although more investigations need to be carried out with regard to the structural stability of these clones, these preliminary data suggest there

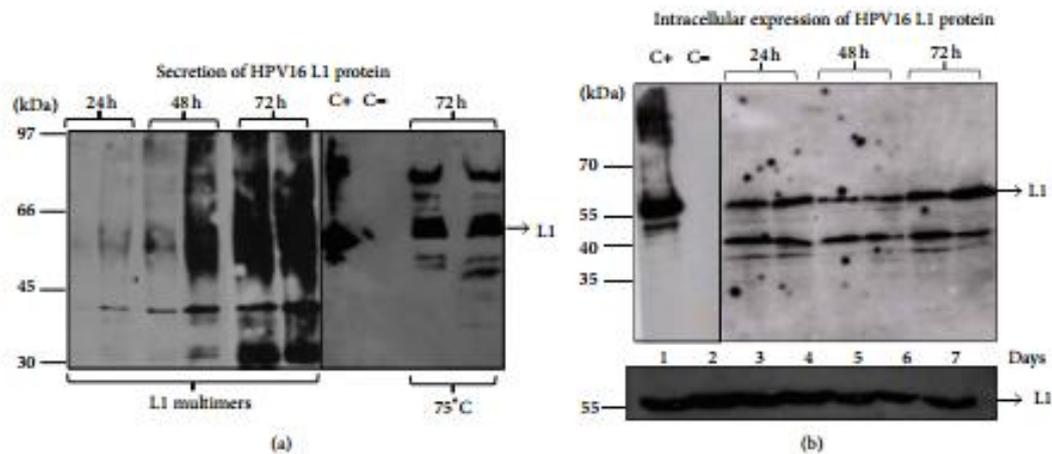


FIGURE 3: Expression of L1 protein in shake flasks. (a and b) HPV L1 protein was constitutively secreted to the culture media or intracellularly produced after cultivation of four *P. pastoris* clones (two clones for each P_{PGK1} -based vector) with glucose for 72 hours. Upon boiling, multimerization of L1 protein in the protein extract was observed as a protein smear, which was overcome after denaturation at 75°C. Aliquots of HPV16 L1 protein episomally expressed in *P. pastoris* [13] were used as a positive control (C+), while the protein extracts from *P. pastoris* strains transformed with the parental vectors were used as negative control (C-).

is another advantage related to the use of the *P. pastoris* $PGK1$ promoter.

It has been argued that creating optimum conditions for the production and purification of HPV VLPs is a strategy that can reduce the production costs of vaccines [31, 40], since it could require less time and labor in industrial production. In this regard, different procedures have been explored related to VLP purification steps, such as ultra-centrifugation, size-exclusion chromatography, and cation-exchange chromatography or even their combination [39–41], as well as the findings about how cell culture conditions can be optimized [31, 38]. We believe that secretion of HPV L1 in the culture media could improve the downstream process. Yeasts such as *S. cerevisiae* and *P. pastoris* have low specificity requirements for signal sequence recognition [25]. The well characterized *S. cerevisiae* α -MF is the most used secretion signal for *P. pastoris* and achieves similar and even higher expression levels than the *Pichia* native signal sequence [30, 48]. In attempting to obtain secretion of L1 protein at high levels in the culture medium, we employed a codon-optimized α -MF along with the $PGK1$ -based vectors. Our initial attempts to detect HPV L1 protein in supernatant of *P. pastoris*/pPGK $\Delta 3\alpha$ /L1HI16 clones showed an unexpected protein smear when the samples were boiled at 95°C, which was not visualized in the extract of negative controls (Figure 3(a)). A similar observation was reported earlier [12], probably due to multimerization of L1 protein in higher structures upon boiling. Although this feature was not pronounced when the cell lysate was analyzed, we proceeded with the protein denaturation at 75°C for all the samples before fractioning in electrophoresis, and this allowed the detection of the L1 protein in its expected molecular weight (56 kDa, Figures 3(a) and 3(b)). Lower bands observed in both media and cell lysate-derived samples are possibly

degradation products of the L1 protein, since these species were not seen in the negative controls. Similar degradation patterns were also reported previously [12, 24]. When the identical electrophoretic pattern displayed by the secreted L1 protein was compared with both its nonsecreted L1 version and the L1 episomally expressed version, it was suggested the α -MF was being processed correctly. In addition, this indicates the lack of posttranslational modification in the secreted L1 protein, although previous reports had characterized glycosylation sites in the HPV16 L1 protein [49, 50]. More detailed investigations are needed in this area.

3.4. Electron Microscopy Evidence of HPV VLP Assembling within the *P. pastoris* Cells but Not in the Culture Media. The assembly of HBV and HCV core proteins into VLPs has been previously reported in yeast [37, 51]. However, no clear evidence has so far been provided to demonstrate that the HPV VLP self-assembled inside the yeast cell. Electron microscopic characterizations of VLP formation were achieved after downstream processing and purification from the yeast cell lysate, which is also true for the VLPs employed in the current HPV vaccines. The demonstration of intracellular VLP formation in *P. pastoris* opens up perspectives for the development of a live attenuated vaccine, since this yeast has been granted the GRAS (Generally Recognized as Safe) status by the FDA (Food and Drug Administration) and has been recognized as an efficient vehicle for the delivery of viral antigens when administered by an oral and intramuscular route [52]. Furthermore, immunization of animals with live bacteria strains expressing HPV VLP has proved to be effective in the anti-L1 IgG production [20].

Electron microscopy analysis of *P. pastoris* recombinant strains described here provides evidence of electron-dense structures with estimated diameters of 55 nm, as expected

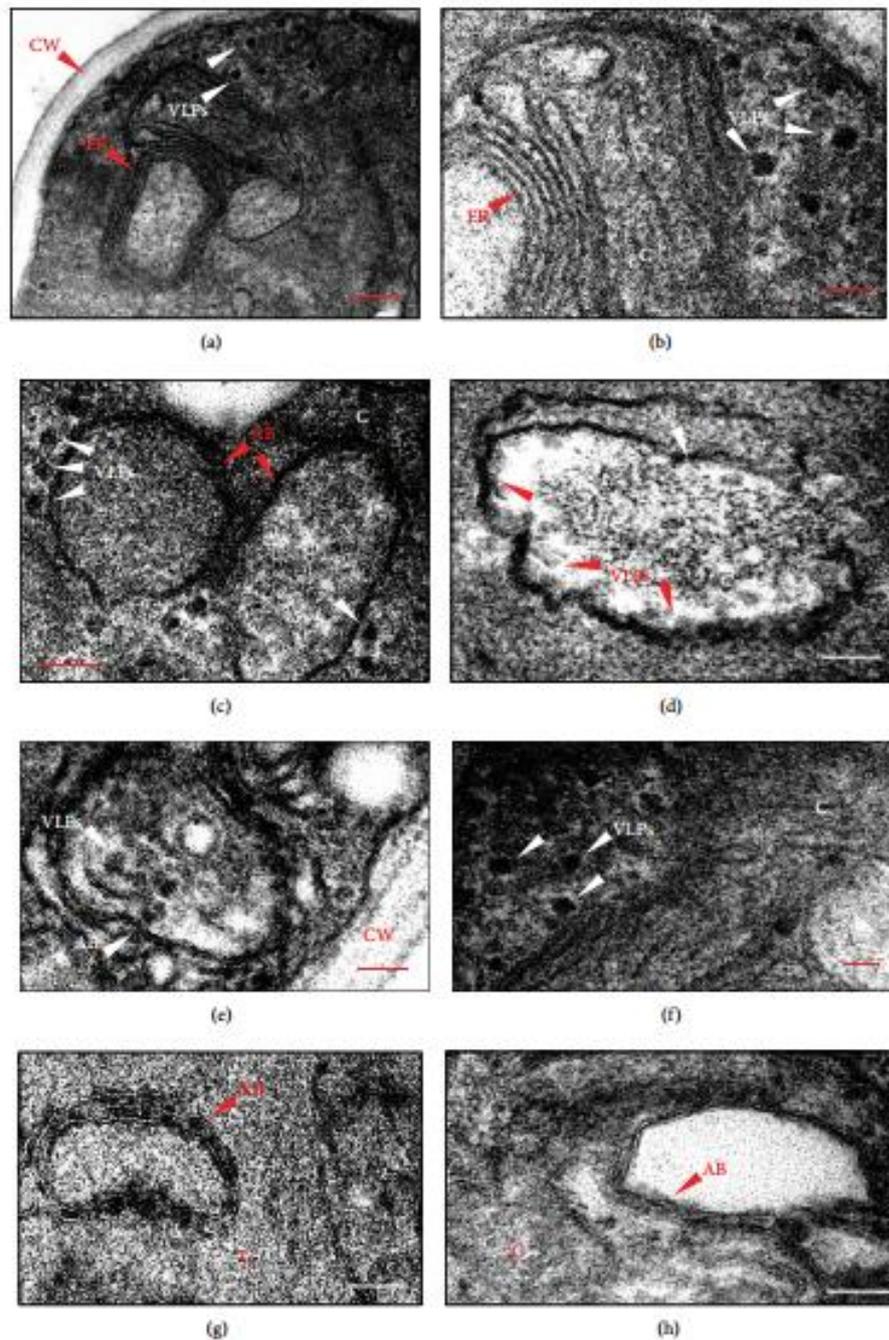


FIGURE 4: HPV VLPs self-assembly within the *P. pastoris* cells. (a and b) Electron-dense structures (VLPs) with estimated diameters of 55 nm were observed near the endoplasmic reticulum (ER) membranes of *P. pastoris* clones expressing L1 protein under regulation of *PGK1* promoter. (c–e) VLPs were visualized both near and inside the autophagic bodies (AB) and were either free from or in contact with the AB membranes. (f) Circumstantially, the VLPs were seen to be transiting in cytoplasm. (g) Close-up of electron-dense structures with an estimated size of 20 nm and cluster on ER membranes, which were identified as ribosomes. (h) Similar particles with 55 nm were not observed in the *P. pastoris* cells that were transformed with parental vectors, either in the cytosol or inside AB. (Bar = 200 nm in (a); 80 nm in (b)–(d), (f), and (h); 100 nm in (e); 40 nm in (g)).

for the HPV VLPs (Figures 4(a)–4(f)) and in accordance with the western blot analysis that shows the presence of the L1 protein. These particles were located near the endoplasmic reticulum membranes (Figures 4(a) and 4(b)) and inside the autophagic bodies (Figures 4(d) and 4(e)) (either free or apparently interacting with cellular membranes); however, they were absent from the cytoplasm of *P. pastoris* strains that had been transformed by the parental vectors (Figure 4(h)). We also searched for circular, electron dense cellular structures in the cytosol and likewise clustered on membranes which could be mistaken for VLPs. The structures highlighted in Figure 4(g) were identified as ribosomes mainly owing to their small diameter (~20 nm) and differential disposition when attached to membranes and concomitant presence in cells transformed with empty vectors. An immunocytochemical analysis was conducted with a view to providing a further characterization of VLPs within the yeast cells. However, the VLP detection was not possible by means of the CamVir antibody, which is often used to detect HPV16 capsomeres and VLPs [41, 53]. Previous attempts to detect intracellular HCV VLPs in *P. pastoris* through immunoelectron microscopy were hindered by the retention of cell membrane components in the architecture of the HCV core particles which has an envelope-like structure [37]. According to the authors, neither the anti-HCV core monoclonal antibody nor the core-reacting human sera were able to stain the particles, in spite of their visualization by conventional electron microscopy. This data could explain why we could not detect the HPV VLPs.

We attempted to characterize assembled HPV VLPs in the culture media from *P. pastoris* recombinant strains. It has been shown that assembly of HPV VLPs can be achieved with neutral pH, high ionic strength, and relatively low concentrations of reducing agents [54]. Conversely, high pH, low salt concentration, and the presence of reducing agents disassemble the VLP into capsomeres. As *P. pastoris* growth progresses in unbuffered medium, the pH drops to 3 or below [55]. It can be speculated that under this condition, culture media offers nonoptimal conditions for HPV VLPs assembly, since HPV L1 protein was detected by western blot after concentration. Nevertheless, the absence of VLP assembly under our experimental conditions does not compromise the use of L1 secreted protein as immunogens. Particle assembly protocols have been used for HPV VLP formation even when the L1 protein is expressed intracellularly, either to increase production yields or improve particle immunogenicity [22, 48–51]. Since our main objective was to evaluate the feasibility of the system, we believe that dot blot, colony blot, and western blot data ensure that our goal can be achieved.

4. Conclusion

The data presented in this work demonstrate the functionality of a biotechnology platform based on *P. pastoris* PGK1 promoter for the production of HPV16 VLPs. Constitutive expression of the HPV16 L1 capsid protein was efficiently achieved for the first time through an easier production schedule than is the case when an AOX1 inducible promoter is employed. In addition, an optimized α -MF secretion signal

downstream to P_{PGK1} provided a prompt secretion of L1 protein in the culture media. Although further experiments are needed to determine which production strategy is more effective for HPV L1 protein production, the data outlined here underline the efficiency of a PGK1-based platform as a heterologous expression system and support its employment for the production of HPV VLPs for vaccination purposes. Moreover, our preliminary data showing intracellular VLP assembly open up perspectives for the employment of *P. pastoris* cells that can express HPV L1 protein as a live attenuated vaccine. To the best of our knowledge, this is the first time that the expression of HPV L1 protein was achieved in *P. pastoris* through an IP-free biotechnology platform. The discovery of alternatives to biotechnology platforms for producing an efficient and cost-effective vaccine has the potential both to offer greater protection—since not all the HPV genotypes are covered by the current vaccines—and to allow the vaccine to be widely disseminated.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto and Dr. Christian Reis (Department of Microbiology, FIOCRUZ/Aggeu Magalhães Research Center, Pernambuco, Brazil) for their valuable support during the immunodetection studies; Dr. Janaína Viana Melo (Laboratory of Microscopy and Microanalysis, CETENE, Pernambuco, Brazil) for her assistance during the transmission electron microscopy analysis; and Dr. Marcos Antonio Moraes Junior (Laboratory of Genetics of Microorganisms, Federal University of Pernambuco, Brazil) for technical suggestions during the experiments. The authors are also grateful to Dr. Paulo Lee Ho (Biotechnology Centre, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil) for his helpful critical comments and suggestions, as well as for providing the HPV16 L1 protein produced in *P. pastoris* cells and the Platform of Sequencing-LABCEN/CCB in the UFPE for allowing them to use its facilities. This work was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), and FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco), and PPSUS (Programa de Pesquisa do Sistema Único de Saúde).

References

- [1] M. A. Stanley, "Genital human papillomavirus infections: current and prospective therapies," *Journal of General Virology*, vol. 93, no. 4, pp. 681–691, 2012.
- [2] L. A. Koutsky, D. A. Galloway, and K. K. Holmes, "Epidemiology of genital human papillomavirus infection," *Epidemiologic Reviews*, vol. 10, pp. 122–163, 1988.

- [3] H.-U. Bernard, R. D. Burk, Z. Chen, K. van Doorslaer, H. Z. Hausen, and E.-M. de Villiers, "Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments," *Virology*, vol. 401, no. 1, pp. 70-79, 2010.
- [4] J. M. M. Walboomers, M. V. Jacobs, M. M. Manos et al., "Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide," *The Journal of Pathology*, vol. 189, no. 1, pp. 12-19, 1999.
- [5] A. C. de Freitas, A. P. A. D. Gurgel, B. S. Chagas, E. C. Coimbra, and C. M. M. do Amaral, "Susceptibility to cervical cancer: an overview," *Gynecologic Oncology*, vol. 126, no. 2, pp. 304-311, 2012.
- [6] N. Muñoz, F. X. Bosch, S. De Sanjosé et al., "Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer," *The New England Journal of Medicine*, vol. 348, no. 6, pp. 518-527, 2003.
- [7] M. F. B. da Silva, B. S. Chagas, V. Guimarães et al., "HPV31 and HPV33 incidence in cervical samples from women in Recife, Brazil," *Genetics and Molecular Research*, vol. 8, no. 4, pp. 1437-1443, 2009.
- [8] C. de Martel, J. Ferlay, S. Franceschi et al., "Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis," *The Lancet Oncology*, vol. 13, no. 6, pp. 607-615, 2012.
- [9] D. M. Harper, E. L. Franco, C. M. Wheeler et al., "Sustained efficacy up to 4-5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial," *The Lancet*, vol. 367, no. 9518, pp. 1247-1255, 2006.
- [10] L. L. Villa, R. L. R. Costa, C. A. Petta et al., "High sustained efficacy of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus types 6/11/16/18 L1 virus-like particle vaccine through 5 years of follow-up," *British Journal of Cancer*, vol. 95, no. 11, pp. 1459-1466, 2006.
- [11] A. A. Hakim and T. A. Dinh, "Worldwide impact of the human papillomavirus vaccine," *Current Treatment Options in Oncology*, vol. 10, no. 1-2, pp. 44-53, 2009.
- [12] N. Hanumantha Rao, P. Baji Babu, L. Rajendra et al., "Expression of codon optimized major capsid protein (L1) of human papillomavirus type 16 and 18 in *Pichia pastoris*; purification and characterization of the virus-like particles," *Vaccine*, vol. 29, no. 43, pp. 7326-7334, 2011.
- [13] A. J. Sunga, I. Tolstorukov, and J. M. Cregg, "Posttransformational vector amplification in the yeast *Pichia pastoris*," *FEMS Yeast Research*, vol. 8, no. 6, pp. 870-876, 2008.
- [14] R. Kirnbauer, F. Booy, N. Cheng, D. R. Lowy, and J. T. Schiller, "Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 89, no. 24, pp. 12180-12184, 1992.
- [15] M. S. Campo and R. B. S. Roden, "Papillomavirus prophylactic vaccines: established successes, new approaches," *Journal of Virology*, vol. 84, no. 3, pp. 1214-1220, 2010.
- [16] C. S. McLean, M. J. Churcher, J. Meinke et al., "Production and characterisation of a monoclonal antibody to human papillomavirus type 16 using recombinant vaccinia virus," *Journal of Clinical Pathology*, vol. 43, no. 6, pp. 488-492, 1990.
- [17] R. Kirnbauer, J. Taub, H. Greenstone et al., "Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles," *Journal of Virology*, vol. 67, no. 12, pp. 6929-6936, 1993.
- [18] X. S. Chen, G. Casini, S. C. Harrison, and R. L. Garcea, "Papillomavirus capsid protein expression in *Escherichia coli*: purification and assembly of HPV11 and HPV16 L1," *Journal of Molecular Biology*, vol. 307, no. 1, pp. 173-182, 2001.
- [19] A. Varsani, A. L. Williamson, R. C. Rose, M. Jaffer, and E. P. Rybicki, "Expression of Human papillomavirus type 16 major capsid protein in transgenic *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi," *Archives of Virology*, vol. 148, no. 9, pp. 1771-1786, 2003.
- [20] K. A. Aires, A. M. Cianciarullo, S. M. Carneiro et al., "Production of human papillomavirus type 16 L1 virus-like particles by recombinant *Lactobacillus casei* cells," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 72, no. 1, pp. 745-752, 2006.
- [21] W. B. Lai and A. P. J. Middelberg, "The production of human papillomavirus type 16 L1 vaccine product from *Escherichia coli* inclusion bodies," *Bioprocess and Biosystems Engineering*, vol. 25, no. 2, pp. 121-128, 2002.
- [22] S. B. Bazan, A. de Alencar Muniz Chaves, K. A. Aires, A. M. Cianciarullo, R. L. Garcea, and P. L. Ho, "Expression and characterization of HPV-16 L1 capsid protein in *Pichia pastoris*," *Archives of Virology*, vol. 154, no. 10, pp. 1609-1617, 2009.
- [23] E. C. Coimbra, F. B. Gomes, J. F. Campos et al., "Production of L1 protein from different types of HPV in *Pichia pastoris* using an integrative vector," *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol. 44, no. 12, pp. 1209-1214, 2011.
- [24] Z. Jiang, G. Tong, B. Cai, Y. Xu, and J. Lou, "Purification and immunogenicity study of human papillomavirus 58 virus-like particles expressed in *Pichia pastoris*," *Protein Expression and Purification*, vol. 80, no. 2, pp. 203-210, 2011.
- [25] R. Daly and M. T. W. Hearn, "Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production," *Journal of Molecular Recognition*, vol. 18, no. 2, pp. 119-138, 2005.
- [26] A. Vassileva, D. A. Chugh, S. Swaminathan, and N. Khanna, "Expression of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* using the GAP promoter," *Journal of Biotechnology*, vol. 88, no. 1, pp. 21-35, 2001.
- [27] J. M. Cregg, J. F. Tschopp, C. Stillman et al., "High-level expression and efficient assembly of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*," *Nature Biotechnology*, vol. 5, no. 5, pp. 479-485, 1987.
- [28] J. R. M. de Almeida, L. M. P. de Moraes, and F. A. G. Torres, "Molecular characterization of the 3-phosphoglycerate kinase gene (PGK1) from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*," *Yeast*, vol. 22, no. 9, pp. 725-737, 2005.
- [29] M. J. Holland and J. P. Holland, "Isolation and identification of yeast messenger ribonucleic acids coding for enolase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, and phosphoglycerate kinase," *Biochemistry*, vol. 17, no. 23, pp. 4900-4907, 1978.
- [30] S. Macauley-Patrick, M. L. Fazenda, B. McNeil, and L. M. Harvey, "Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system," *Yeast*, vol. 22, no. 4, pp. 249-270, 2005.
- [31] H. J. Kim, H.-L. Kwag, Y. Jin, and H.-J. Kim, "The composition of the carbon source and the time of cell harvest are critical determinants of the final yield of human papillomavirus type 16 L1 protein produced in *Saccharomyces cerevisiae*," *Protein Expression and Purification*, vol. 80, no. 1, pp. 52-60, 2011.
- [32] J. Sambrook and D. W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY, USA, 3rd edition, 2001.

- [33] A. Arruda, *Utilização do promotor do gene PGKI de Pichia pastoris para expressão heteróloga [M.S. thesis]*, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil, 2008.
- [34] M. C. Goodnough, B. Hammer, H. Sugiyama, and E. A. Johnson, "Colony immunoblot assay of botulinum toxin," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 59, no. 7, pp. 2339-2342, 1993.
- [35] T. von der Haar, "Optimized protein extraction for quantitative proteomics of yeasts," *PLoS ONE*, vol. 2, no. 10, Article ID e1078, 2007.
- [36] J. M. Cregg, I. Tolstorukov, A. Kusari, J. Sunga, K. Madden, and T. Chappell, "Expression in the yeast *Pichia pastoris*," *Methods in Enzymology*, vol. 463, pp. 169-189, 2009.
- [37] V. Falcón, C. García, M. C. de la Rosa, I. Menéndez, J. Seoane, and J. M. Grillo, "Ultrastructural and immunocytochemical evidences of core-particle formation in the methylotrophic *Pichia pastoris* yeast when expressing HCV structural proteins (core-E1)," *Tissue & Cell*, vol. 31, no. 2, pp. 117-125, 1999.
- [38] M.-A. Park, H. J. Kim, and H.-J. Kim, "Optimum conditions for production and purification of human papillomavirus type 16 L1 protein from *Saccharomyces cerevisiae*," *Protein Expression and Purification*, vol. 59, no. 1, pp. 175-181, 2008.
- [39] H. J. Kim, S. J. Lim, J. Y. Kim, S. Y. Kim, and H.-J. Kim, "A method for removing contaminating protein during purification of human papillomavirus type 18 L1 protein from *Saccharomyces cerevisiae*," *Archives of Pharmacal Research*, vol. 32, no. 12, pp. 1759-1766, 2009.
- [40] H. J. Kim, S. Y. Kim, S. J. Lim, J. Y. Kim, S. J. Lee, and H.-J. Kim, "One-step chromatographic purification of human papillomavirus type 16 L1 protein from *Saccharomyces cerevisiae*," *Protein Expression and Purification*, vol. 70, no. 1, pp. 68-74, 2010.
- [41] H. J. Kim, S. J. Lim, H.-L. Kwag, and H.-J. Kim, "The choice of resin-bound ligand affects the structure and immunogenicity of column-purified human papillomavirus type 16 virus-like particles," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 4, Article ID e35893, 2012.
- [42] M. Romanos, C. Scorer, K. Sreerashtra, and J. Clare, "The generation of multicopy recombinant strains," *Methods in Molecular Biology*, vol. 103, pp. 55-72, 1998.
- [43] J. L. Cereghino and J. M. Cregg, "Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*," *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 24, no. 1, pp. 45-66, 2000.
- [44] M. A. Romanos, C. A. Scorer, and J. J. Clare, "Foreign gene expression in yeast: a review," *Yeast*, vol. 8, no. 6, pp. 423-488, 1992.
- [45] H. Ohi, N. Okazaki, S. Uno, M. Miura, and R. Hiramatsu, "Chromosomal DNA patterns and gene stability of *Pichia pastoris*," *Yeast*, vol. 14, no. 10, pp. 895-903, 1998.
- [46] S. Curvers, J. Linnemann, T. Klauser, C. Wandrey, and R. Takors, "Recombinant protein production with *Pichia pastoris* in continuous fermentation—kinetic analysis of growth and product formation," *Chemical Engineering and Technology*, vol. 25, no. 8, pp. 229-235, 2002.
- [47] T. Zhu, M. Guo, C. Sun et al., "A systematical investigation on the genetic stability of multi-copy *Pichia pastoris* strains," *Biotechnology Letters*, vol. 31, no. 5, pp. 679-684, 2009.
- [48] R. J. M. Raemaekers, L. de Muro, J. A. Gatehouse, and A. P. Fordham-Skelton, "Functional phytohemagglutinin (PHA) and Galanthus nivalis agglutinin (GNA) expressed in *Pichia pastoris* correct N-terminal processing and secretion of heterologous proteins expressed using the PHA-E signal peptide," *European Journal of Biochemistry*, vol. 265, no. 1, pp. 394-403, 1999.
- [49] H. M. Browne, M. J. Churcher, M. A. Stanley, G. I. Smith, and A. C. Minson, "Analysis of the L1 gene product of human papillomavirus type 16 by expression in a vaccinia virus recombinant," *Journal of General Virology*, vol. 69, no. 6, pp. 1263-1273, 1988.
- [50] J. Zhou and I. H. Frazer, "Glycosylation of human papillomavirus type 16 L1 protein," *Virology*, vol. 194, no. 1, pp. 210-218, 1993.
- [51] M. Yamaguchi, Y. Miyatsu, Y. Horikawa et al., "Dynamics of hepatitis B virus core antigen in a transformed yeast cell: analysis with an inducible system," *Journal of Electron Microscopy*, vol. 43, no. 6, pp. 386-393, 1994.
- [52] O. Taghavian, H. Spiegel, R. Hauck, H. M. Hafez, R. Fischer, and S. Schillberg, "Protective oral vaccination against Infectious bursal disease virus using the major viral antigenic protein VP2 produced in *Pichia pastoris*," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 12, Article ID e83210, 2013.
- [53] N. Thönes, A. Herreiner, L. Schädlich, K. Piuko, and M. Müller, "A direct comparison of human papillomavirus type 16 L1 particles reveals a lower immunogenicity of capsomeres than virus-like particles with respect to the induced antibody response," *Journal of Virology*, vol. 82, no. 11, pp. 5472-5485, 2008.
- [54] Q. Zhao, Y. Modis, K. High et al., "Disassembly and reassembly of human papillomavirus virus-like particles produces more virion-like antibody reactivity," *Virology Journal*, vol. 9, article 52, 2012.
- [55] R. A. Brierley, G. R. Davis, and G. C. Holtz, "Production of insulin-like growth factor-1 in methylotrophic yeast cells," United States Patent 5,32 4,639, 1994.

Manuscrito submetido como primeiro autor (Research in Microbiology):

BRIEF NOTE:

Evidence for a SUMO modification targeting the Human Papilloma Virus (HPV) capsid protein L2 in the protozoan *Leishmania tarentolae*

Filipe Colaço Mariz*^{a,b,c}, Larissa Mélo do Nascimento^{b,c}, Barbara Papadopoulou^c, Antonio Carlos de Freitas^a, Osvaldo Pompílio de Melo Neto^b.

^aLaboratory of Molecular Studies and Experimental Therapy, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, CEP 50670-901, Brazil.

^bDepartment of Microbiology, Aggeu Magalhães Research Center, FIOCRUZ-PE, Av. Professor Moraes Rego, s/n – Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, CEP 50740-465, Brazil.

^cResearch Center in Infectious Diseases, CHU de Quebec Research Center-Université Laval and Department of Microbiology-Infectious Diseases and Immunology, Laval University, 2705 Boulevard Laurier, Ville de Québec, QC, G1V 4G2, Canada.

E-mail: filipe.mariz@ufpe.br – *Correspondence and reprints, larissa@cpqam.fiocruz.br, barbara.papadopoulou@crchudequebec.ulaval.ca, acf_ufpe@yahoo.com.br, opmn@cpqam.fiocruz.br

Abstract

While expressing the Human Papillomavirus 16 (HPV16) L2 protein in *Leishmania tarentolae*, we found a post-translation modification by small ubiquitin-like modifier (SUMO) occurring in this system. Our data indicated: (i) *L. tarentolae*-expressed L2 protein is SUMOylated as described in mammalian cells; (ii) the identification of putative *L. tarentolae* SUMO protein and enzymes (E1b and E2); L2-SUMOylated protein accumulated inside the nucleus, where SUMO-related components are presumably located. This is the first report confirming the occurrence of SUMOylation in *Leishmania* species, highlighting the relevance of *L. tarentolae* as a heterologous expression system for production of proteins that require mammalian-like post-translational modifications.

Keywords: *L. tarentolae*, SUMOylation, L2 protein, HPV16, heterologous expression

Introduction

The flagellated protozoan *Leishmania tarentolae* is a non-pathogenic parasite of lizards from Gecko species (*Gekkonidae*) belonging to the Order Kinetoplastida, family Trypanosomatidae (RAYMOND et al., 2012). Initially isolated from the Moorish Wall Gecko, *Tarentolae mauritanica*, *L. tarentolae* was established in axenic culture many years ago and has been extensively used for molecular biology and biochemical studies as a non-pathogenic trypanosomatid model organism (PAPADOPOULOU; ROY; OUELLETTE, 1992; AZIZI et al., 2009). More recently, *L. tarentolae* has been explored as an attractive eukaryotic expression system for recombinant proteins (NIIMI, 2012). Since this parasite is well described as non-pathogenic to mammals (AZIZI et al., 2009; RAYMOND et al., 2012) and fully approved for use in biosafety level 1 laboratories, different reports have also investigated the use of *L. tarentolae* as a live vector vaccine against human (BRETON et al., 2007) and animal diseases (SALJOUGHIAN; TAHERI; RAFATI, 2014).

Papilloma viruses are well-recognized as causal agents of human and animal cancers (IARC WORKING GROUP, 2005). Persistent infection by HPV (Human Papillomavirus) is the major risk factor for the development of cervical intraepithelial neoplasia of all grades and is associated to 5% of all human cancers (DE MARTEL et al., 2012). The most promising approach for a large spectrum HPV vaccine explores the immunization with the minor capsid protein L2. In contrast to the current vaccines, which are based on Virus-Like Particles (VLPs) derived from the major capsid protein L1, the L2-based immunogens can induce cross-neutralizing antibodies against a broad range of HPV genotypes. However, the titers of neutralizing antibodies induced by L2 are much lower than those achieved by L1 VLP vaccination (RODEN et al., 2000). Seeking the establishment of a pan-HPV vaccine, some reports have highlighted the potential of using live vector vaccines to circumvent the low L2 immunogenicity (YOON et al., 2012).

Materials and Methods

Cell culture, transfections and expression analysis

Promastigotes of *L. tarentolae* (Parrot-TarII strain) were grown up to the late-log phase in SDM-79 medium supplemented with 5 µg/ml hemin and 5% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (Multicell, Wisent Inc.) as described previously (RAYMOND et al., 2012). Stable transfections were done by electroporation as described previously (PAPADOPOULOU; ROY; OUELLETTE, 1992). *L. tarentolae* transfectants were selected as described elsewhere (PAPADOPOULOU; ROY; OUELLETTE, 1992) in the presence of hygromycin and/or neomycin phosphotransferase genes. Total protein extracts were obtained by pelleting 10^7 logarithmic grown cells, washed and resuspended into 2x Laemmli Sample Buffer and boiled before loading onto gel for blotting as described previously (RAYMOND et al., 2012). The anti-mouse alpha-tubulin antibody (Sigma), the anti-mouse HA tag monoclonal antibody (ABM, Inc.) and the anti-L2 monoclonal antibodies (SCB, Inc.) were used for hybridization during Western blotting.

Localization studies

For immunolocalization studies, 10^7 mid-log-phase promastigotes cells were properly harvested, washed with PBS and fixed with 3% paraformaldehyde. Parasite cells were then permeabilized with 0.1% NP-40 and labeled with anti-L2 as a first antibody followed by an Alexia 488-conjugated secondary antibody. DNA was stained using DAPI (Molecular Probes), and cells were visualized using a Leica SPII-AOBS confocal microscope.

Results and Discussion

To design a recombinant *L. tarentolae* vector vaccine expressing the L2 protein, the gene encoding the full length HPV16 L2 (GI:333031) was cloned into a transfection vector (pSP-YHYG-αIR) previously known to mediate efficient ectopic expression in *Leishmania* (MANDAL et al., 2015). The cloned gene included sequences encoding an N-terminal polyhistidine tag (8xHis) and a C-terminal HA (Human influenza hemagglutinin) epitope (Fig. 1A). The resulting recombinant plasmid was transfected on its own or alongside a pSP-BT1 (PADMANABHAN et al., 2012) derived plasmid containing the L1 coding sequence, allowing for the co-expression of both the L2 and L1 proteins, but with only L2 having the

polyhistidine and HA tags. *L. tarentolae* strain was episomally transfected and properly selected, and the transfectants were then expanded to harvesting and preparation cell lysate. These were then tested through Western blotting for the expression of L2. The expected ~70 kDa L2 band was indeed observed in blots from *L. tarentolae* cells co-transfected with the two plasmids encoding both L1 and L2 and tested with an anti-HA monoclonal antibody. Surprisingly, however, a ~97 kDa band was clearly detected as well. Neither the ~70 kDa nor the ~97 kDa band was seen in lysates from control non-transfected cells, proving that both are plasmid encoded (Fig. 1B). These two bands were also observed in cells transfected with the plasmid encoding the L2 gene alone (data not shown), ruling out any possibility that the ~97 kDa might be related to the co-expression of L1 and L2. The identity of the ~97 kDa band was further confirmed through blots using both anti-His and anti-L2 monoclonal antibodies (Fig. 1B and 1C). Simultaneous co-expression of L1 was validated using a monoclonal anti-L1 antibody (CamVir), which confirmed that L1 is represented by a single ~55 kDa band of the expected size (Fig. 1C). As can be seen in the figure, the expression of the two L2 derived bands varies between different transfection experiments, but the ~97 kDa is generally found as the more abundant of the two and can, in some instances, be the sole detectable L2 derived band, as observed in the blot using the anti-His or anti-L2 antibodies.

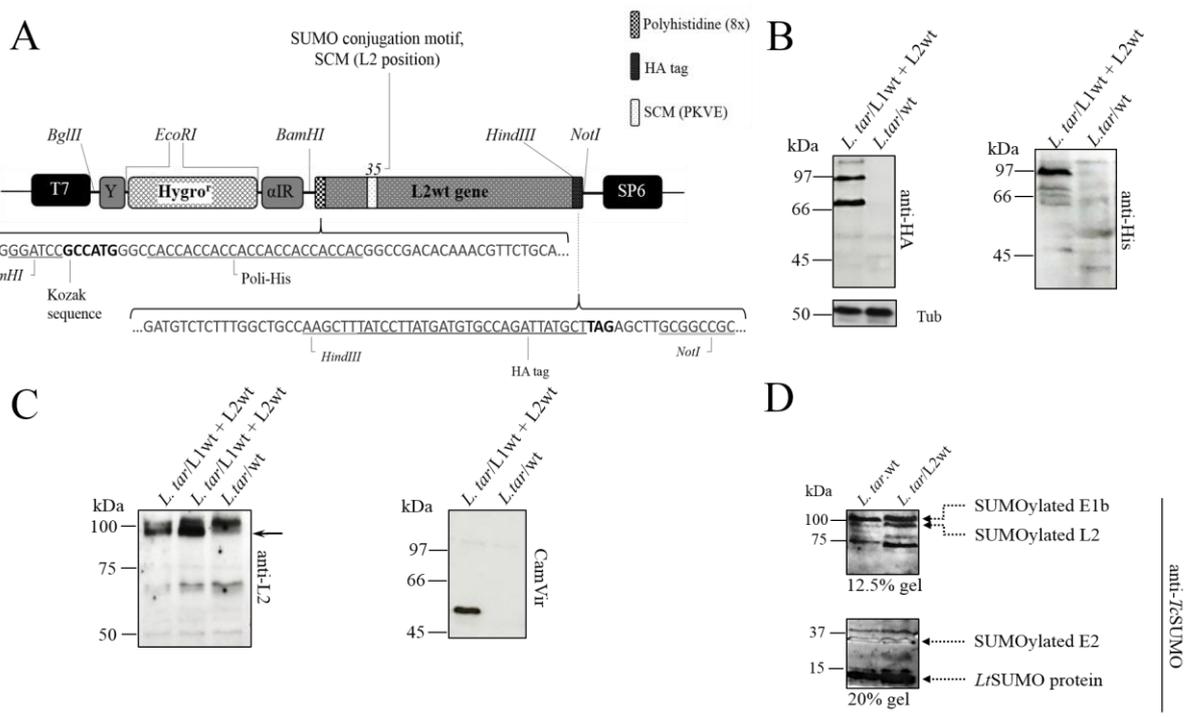


Figure 15. Expression analysis of the HPV16 L2 protein in transfected *Leishmania tarentolae* cells. **(A)** Schematic representation of the pSP-YHYG- α IR-L2 expression cassette, showing the two primers used for amplification of the L2 gene and relevant restriction sites, Kozak sequence, tags and SCM position. **(B and C)** Whole cell lysate from 10^7 promastigote cells were resolved on 12.5% SDS-PAGE, transferred to PVDF membrane and probed with different antibodies. In **(B)** the presence of two L2 isoforms in whole lysate from *L. tarentolae* cells transfected with plasmids encoding the L1 and L2 proteins is shown (left panel). The expected ~70 kDa protein and a slower-migrating protein, with an estimated molecular weight of ~97 kDa, were clearly detected by a monoclonal anti-HA antibody. Using a distinct set of transfected cells and a monoclonal anti-His antibody, the detection of the ~97 kDa was confirmed as the more abundant L2 isoform (right panel). Specificity of detection in both blots was evidenced by the absence of any similar protein in the *L. tarentolae* wild-type lysate. In **(C)** the expression of both L2 and the HPV major capsid protein L1 was also confirmed using monoclonal antibodies directed against the two HPV proteins. The anti-L2 antibody (left panel) detected the ~97 kDa efficiently (black arrow) but it also cross-reacted with a slightly larger protein which is also present in the *L. tarentolae* wild type. The co-expression of the L1 is shown on the right panel. **(D)** Confirmation of L2 SUMOylation was achieved by probing the *L. tarentolae* whole lysate with a polyclonal serum directed against *Tc*SUMO. Among several other proteins detected in lysates from both wild type and transfected cells, a 97 kDa protein is observed only in the transfectants (a putative SUMOylated E1b enzyme is also indicated). Blotting of the same samples run on a 20% SDS-PAGE, allowed the detection by the same serum of further bands whose size are compatible with the predicted molecular weights for the putative SUMO protein and SUMO E2 conjugating enzyme from *L. tarentolae*.

Distinct interacting motifs for members of the small ubiquitin-like modifier (SUMO) family of proteins were recently characterized within the L2 sequence. When expressed in mammalian systems, L2 is modified by a single post-translational modification known as SUMOylation and displays a slow-migrating pattern associated with shifts in size similar to that observed in Fig. 1 (MARUSIC et al., 2010). SUMO proteins are conserved and

ubiquitously expressed in eukaryotes, but are absent in prokaryotes and archaea. SUMOylation takes place through a conjugation pathway involving a three-step enzymatic cascade, similarly to the ubiquitylation pathway (GAREAU; LIMA, 2011). Briefly, SUMO is initially synthesized as an active precursor that must be cleaved by specific proteases (Ulp/SENp enzymes) in order to expose a C-terminal di-glycine motif, which is necessary for conjugation. Once matured, SUMO is activated by a SUMO specific E1 activating enzyme, a heterodimer of E1a/E1b, in an ATP dependent reaction. A single E2 conjugating enzyme, named Ubc9, is then responsible for the transfer of SUMO to the target protein (substrate) after its recognition of a SUMOylation consensus motif in the target protein. Although SUMO E2 enzymes can directly interact with SUMO substrates, in opposition to ubiquitin-specific E2 enzymes which require E3 ligases in order to recognize their substrate, the conjugation process can be assisted by SUMO E3 ligases (GAREAU; LIMA, 2011; IRIBARREN et al., 2015).

Post-translational modification by SUMO regulates diverse cellular processes such as transcription, replication, chromosome segregation and DNA repair. Protein modification by SUMO can induce changes in enzyme activity, interfere with protein-protein interactions or even induce changes in protein intracellular localization (GAREAU; LIMA, 2011). In mammalian cells, SUMOylation of L2 has also been shown to interfere with L2 stability and with its ability to interact with cellular targets and has been demonstrated to occur in specific bodies within the nuclei of host cells (MARUSIC et al., 2010; BUND et al., 2014). Similarly, SUMOylation in *Trypanosoma cruzi* has been successfully demonstrated to occur predominantly at the parasite nucleus (BAYONA et al., 2011). As in other organisms such as some invertebrates and yeasts (GAREAU; LIMA, 2011), a single SUMO gene has been identified in these parasites but so far only four trypanosomatid proteins have been demonstrated to be SUMOylated. Although the existence of a SUMO machinery has been experimentally confirmed for some trypanosomatids, such as *Trypanosoma brucei* (KLEIN; DROLL; CLAYTON, 2013; IRIBARREN et al., 2015) and *Trypanosoma cruzi* (BAYONA et al., 2011), there is no report so far regarding the occurrence of SUMOylation in *Leishmania* species.

When searching for the components of the SUMO pathway in trypanosomatids through BLAST surveys, a *L. tarentolae* putative SUMO protein was identified (LtaP08.0450) sharing 87% and 63% identities with orthologs from *T. cruzi* (TcSUMO)

(BAYONA et al., 2011) and *T. brucei* (*TbSUMO*) (IRIBARREN et al., 2015), respectively. Thus, we employed an anti-*TcSUMO* rabbit polyclonal antibody (IRIBARREN et al., 2015) in order to confirm the modification of L2 protein by SUMOylation in *L. tarentolae* transfectants. Indeed, Western blotting analysis demonstrated the detection of the ~97 kDa L2 band in the whole lysate from *L. tarentolae* recombinant cells, but not in the wild type parental strain (Fig. 1D). Moreover, several proteins were also detected by the anti-*TcSUMO* antibody in whole lysates from both wild type and recombinant cells, in a pattern resembling that observed from *T. cruzi* using the same antibody. We speculate that some of those proteins are related to the *L. tarentolae* putative SUMO conjugating enzyme E2 (LtaP02.0320, 24 kDa) properly attached to SUMO, as well as the SUMO protein itself (*LtSUMO*, 12 kDa) (Fig. 1D). Another protein is probably related to the putative *L. tarentolae* SUMO activating enzyme E1 (LtaP08.0220, 114 kDa) which shares 61% identity with the putative *T. cruzi* E1b subunit (94 kDa). Intriguingly, we observed a 114 kDa protein which is in agreement with the migration pattern of a recently reported *T. brucei* E1b properly SUMOylated (YE et al., 2015), but does not match the predicted molecular weight for a SUMOylated version of the putative *L. tarentolae* E1 conjugating enzyme.

Here, we also aimed to investigate the subcellular localization of L2 protein in *L. tarentolae*, considering that SUMOylation has been described to occur in the nucleus of *T. cruzi* (BAYONA et al., 2011). Although the L2 protein displayed a predominantly cytoplasmic localization when probed with anti-L2 antibodies through immunofluorescence, an interesting concentration of L2 within the nucleus of recombinant parasites was observed. These findings are consistent with the localization of both mammalian-derived L2 protein and SUMOylated components in *T. cruzi* (BUND et al., 2014) (Fig. 2).

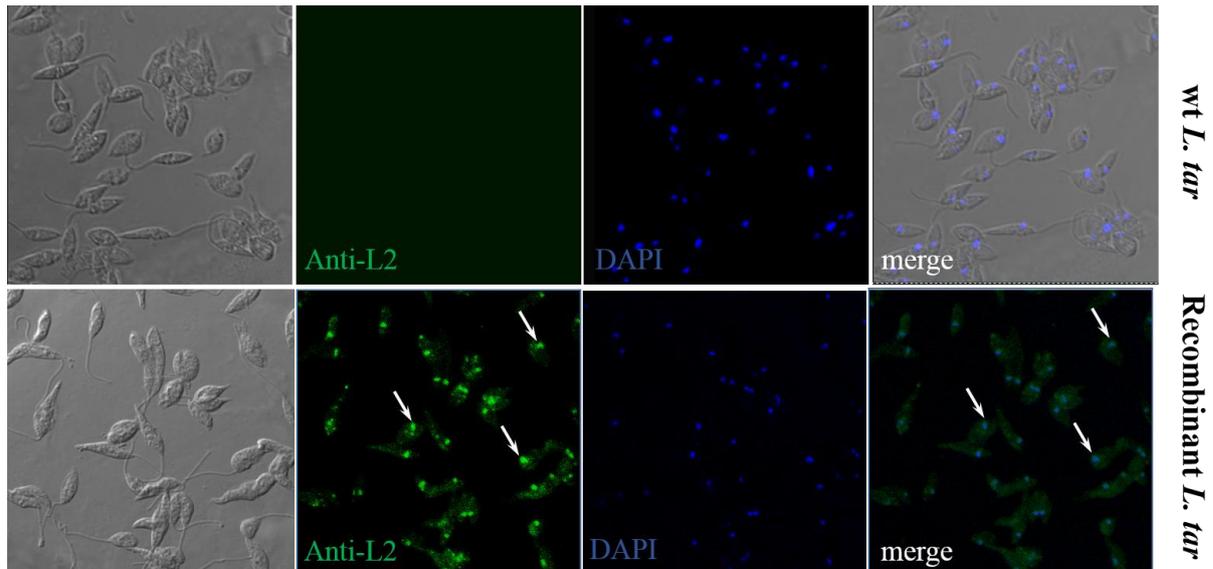


Figure 16. Subcellular localization of HPV16 L2 protein in *L. tarentolae* recombinant strain. Indirect immunofluorescence assays were carried out with mid-log-phase promastigotes (5×10^6 cells) using anti-L2 and Alexa 488-conjugated secondary antibody, according to standard procedures. Following DNA staining with DAPI, the analysis of recombinant parasites using a Leica SPII-AOBS confocal microscopy demonstrated a cytoplasmic dispersion of L2 protein as well as a marked concentration of this HPV capsid protein in the nucleus. Specificity of detection was evaluated by employing the anti-L2 antibody against *L. tarentolae* wild type cells, from which no recognition was observed.

It has recently been demonstrated that SUMOylation plays a role in different mechanisms of cellular regulation in *T. brucei* such as the control of both replicative life-cycle stages (OBADO et al., 2011), ribosomes biogenesis, mitochondrial constituents, translation initiation (BAYONA et al., 2011) and the antigenic variation of the parasite surface glycoproteins, relevant for evasion of the host immune response (LÓPEZ-FARFÁN et al., 2014). Taken together, the findings presented here demonstrate the first evidence of a post-translational modification through SUMOylation in *Leishmania* species. Subsequent investigations are required, however, in order to fully understand the relevance of SUMOylation pathways in other closely related *Leishmania* species, specifically those responsible for many relevant human diseases. Furthermore, the mammalian-like SUMOylation pattern observed for the HPV16 L2 expressed in *L. tarentolae* highlights the attractiveness of this host as an alternative expression system for mammalian proteins.

Acknowledgments

We thank Hiva Azizi and Carole Dumas (CHU de Québec) for technical support and Dr. Cássia Docena (Center for Technological Platforms, NPT/FIOCRUZ-PE) for the support during the immunofluorescence analysis. We also express our gratitude to Dr. Vanina E. Alvarez (IIB-INTECH) for kindly providing us with the anti-*Tc*SUMO polyclonal antibody and for experimental suggestions. F. C. Mariz and L. M. Nascimento were recipients of the CAPES/PDSE (Brazilian Doctoral Sandwich Program) and CAPES/DS Fellowships, non-simultaneously. This work was partially supported by CNPq and FACEPE (PPSUS-2013 and PRONEM-2014), both Brazilian funding agencies, and by the CIHR operating grant MOP-12182 awarded to BP. The authors have no conflict of interest to declare.

References

- [1] Raymond F, Boisvert S, Roy G, Ritt J-F, Légaré D, Isnard A, et al. Genome sequencing of the lizard parasite *Leishmania tarentolae* reveals loss of genes associated to the intracellular stage of human pathogenic species. *Nucleic Acids Res* 2012;40:1131–47. doi:10.1093/nar/gkr834.
- [2] Papadopoulou B, Roy G, Ouellette M. A novel antifolate resistance circle of *Leishmania* the amplified H. *EMBO J* 1992;11:3601–8.
- [3] Azizi H, Hassani K, Taslimi Y, Najafabadi HS, Papadopoulou B, Rafati S. Searching for virulence factors in the non-pathogenic parasite to humans *Leishmania tarentolae*. *Parasitology* 2009;136:723–35. doi:10.1017/S0031182009005873.
- [4] Niimi T. Recombinant Protein Production in the Eukaryotic Protozoan Parasite *Leishmania tarentolae*: A Review. In: Lorence A, editor. *Recomb. Gene Expr. Rev. Protoc.*, vol. 824. Third Edit, Totowa, NJ: Springer Science Business Media; 2012, p. 307–15. doi:10.1007/978-1-61779-433-9.
- [5] Breton M, Zhao C, Ouellette M, Tremblay MJ, Papadopoulou B. A recombinant non-pathogenic *Leishmania* vaccine expressing human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) Gag elicits cell-mediated immunity in mice and decreases HIV-1 replication in human tonsillar tissue following exposure to HIV-1 infection. *J Gen Virol* 2007;88:217–25. doi:10.1099/vir.0.81995-0.

- [6] Saljoughian N, Taheri T, Rafati S. Live vaccination tactics: possible approaches for controlling visceral leishmaniasis. *Front Immunol* 2014;5:134. doi:10.3389/fimmu.2014.00134.
- [7] IARC Working Group. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Human papillomavirus. Lyon: 2005.
- [8] de Martel C, Ferlay J, Franceschi S, Vignat J, Bray F, Forman D, et al. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *Lancet Oncol* 2012;13:607–15.
- [9] Roden RB, Yutzy WH, Fallon R, Inglis S, Lowy DR, Schiller JT. Minor capsid protein of human genital papillomaviruses contains subdominant, cross-neutralizing epitopes. *Virology* 2000;270:254–7. doi:10.1006/viro.2000.0272.
- [10] Yoon S-W, Lee T-Y, Kim S-J, Lee I-H, Sung M-H, Park J-S, et al. Oral administration of HPV-16 L2 displayed on *Lactobacillus casei* induces systematic and mucosal cross-neutralizing effects in Balb/c mice. *Vaccine* 2012;30:3286–94. doi:10.1016/j.vaccine.2012.03.009.
- [11] Mandal G, Mandal S, Sharma M, Charret KS, Papadopoulou B, Bhattacharjee H, et al. Species-specific antimonial sensitivity in *Leishmania* is driven by post-transcriptional regulation of AQP1. *PLoS Negl Trop Dis* 2015;9:e0003500. doi:10.1371/journal.pntd.0003500.
- [12] Padmanabhan PK, Dumas C, Samant M, Rochette A, Simard MJ, Papadopoulou B. Novel features of a PIWI-like protein homolog in the parasitic protozoan *Leishmania*. *PLoS One* 2012;7:e52612. doi:10.1371/journal.pone.0052612.
- [13] Marusic MB, Mencin N, Licen M, Banks L, Grm HS. Modification of human papillomavirus minor capsid protein L2 by sumoylation. *J Virol* 2010;84:11585–9. doi:10.1128/JVI.01269-10.
- [14] Gareau JR, Lima CD. The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011;11:861–71. doi:10.1038/nrm3011.The.
- [15] Iribarren PA, Berazategui MA, Cazzulo JJ, Alvarez VE. Biosynthesis of SUMOylated Proteins in Bacteria Using the *Trypanosoma brucei* Enzymatic System. *PLoS One* 2015;10:e0134950. doi:10.1371/journal.pone.0134950.
- [16] Bund T, Spoden G a, Koynov K, Hellmann N, Boukhallouk F, Arnold P, et al. An L2

- SUMO interacting motif is important for PML localization and infection of human papillomavirus type 16. *Cell Microbiol* 2014;16:1179–200. doi:10.1111/cmi.12271.
- [17] Bayona JC, Nakayasu ES, Laverrière M, Aguilar C, Sobreira TJP, Choi H, et al. SUMOylation pathway in *Trypanosoma cruzi*: functional characterization and proteomic analysis of target proteins. *Mol Cell Proteomics* 2011;10:M110.007369. doi:10.1074/mcp.M110.007369.
- [18] Klein CA, Droll D, Clayton C. SUMOylation in *Trypanosoma brucei*. *PeerJ* 2013;1:e180. doi:10.7717/peerj.180.
- [19] Ye K, Zhang X, Ni J, Liao S, Tu X. Identification of enzymes involved in SUMOylation in *Trypanosoma brucei*. *Sci Rep* 2015;5:10097. doi:10.1038/srep10097.
- [20] Obado SO, Bot C, Echeverry MC, Bayona JC, Alvarez VE, Taylor MC, et al. Centromere-associated topoisomerase activity in bloodstream form *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res* 2011;39:1023–33. doi:10.1093/nar/gkq839.
- [21] López-Farfán D, Bart J-M, Rojas-Barros DI, Navarro M. SUMOylation by the E3 ligase TbSIZ1/PIAS1 positively regulates VSG expression in *Trypanosoma brucei*. *PLoS Pathog* 2014;10:e1004545. doi:10.1371/journal.ppat.1004545.

Manuscrito em preparação como primeiro autor:

Expression and structural characterization of chimeric Human papillomavirus-like particles and capsomeres in the non-pathogenic protozoan *Leishmania tarentolae*

F. C. Mariz^{1,2}; L. M. Nascimento^{1,2}; A. J. D. Silva¹; A. Pereira-Neves²; O. P. de Melo Neto²; A. C. Freitas¹; B. Papadopoulou³

¹Laboratory of Molecular Studies and Experimental Therapy, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

²Department of Microbiology, Aggeu Magalhães Research Center, FIOCRUZ-PE, Recife, Pernambuco, Brazil.

³Research Center in Infectious Diseases, CHU de Quebec Research Center-Université Laval and Department of Microbiology, Infectious Diseases and Immunology, Laval University, Quebec, QC, Canada.

Abstract

It is well accepted that a second-generation Human papillomavirus (HPV) vaccine is needed to circumvent the limitations related to the current licensed ones. In this sense, developing newly approaches that increases the spectrum of protection and decreases the production cost are key points for establishing a HPV vaccine widely spread. This scenario will not be achieved unless the current vaccine platforms (based on yeast and insect cells) or antigen compositions (L1 major capsid protein assembled into virus-like particles, VLPs) are modified. In this work, we investigate the use of *Leishmania tarentolae* (*L. tar*) for production of: (i) L1 chimeric capsomeres displaying a L2 cross-protective epitope or a combination of two different therapeutic epitopes of E5 protein (E5m); (ii) L1 and L1-L2 VLPs; (iii) L1 chimeric VLPs displaying E5m epitopes. Detection of L1-based proteins and full-length L2 protein was confirmed in *L. tar* promastigote cells using monoclonal antibodies by western-blotting and indirect immunofluorescence. *L. tar*-derived cVLPs and capsomeres were structurally characterized by equilibrium density sedimentation on sucrose gradient and by affinity chromatography with heparin-sepharose columns. Transmission electronic microscopy confirmed cVLPs and capsomeres assembling both in total protein extract as well as within parasites cells. Taken together, this preliminary data highlights *L. tar* as an affordable recombinant system for producing subunit vaccines against HPV. Further steps will include vaccination of mice with the *L. tar* recombinant strains designed in this study for evaluation of immune response against *L. tar*-based vaccine vector.

Keywords: HPV16, *L. tarentolae*, VLPs, capsomeres, vaccine

Manuscrtos publicados como co-autor:

Clinical Infectious Diseases Advance Access published February 27, 2013

REVIEW ARTICLE

Human Papillomavirus Vertical Transmission: Review of Current Data

A. C. Freitas, F. C. Mariz, M. A. R. Silva, and A. L. S. Jesus

Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

Despite the increasing evidence of human papillomavirus (HPV) vertical transmission, this route is regarded as less clinically important because of the detections of transient HPV DNA. However, recent studies have provided clear evidence of papillomavirus productive infection in lymphocytes, placenta, and bovine fetal tissue. Furthermore, a model of papillomavirus latency has been recently proposed that could explain the failure or transience in HPV detection observed in some infected infants. This new evidence of hematogenous and vertical spread of HPV suggests that these modes of transmission should be investigated in greater detail to obtain a better understanding of the infection and a fuller awareness of the preventive measures that can be taken against HPV-related diseases.

Keywords. human papillomavirus; vertical transmission; human cancers; human papillomatosis.

Human papillomavirus (HPV) is the most common sexually transmitted infection among humans, and represents a well-established cause of cervical cancer in females and a significant factor in the development of anogenital, head, and neck cancers [1].

A number of investigations have found that HPV infection may also be transmitted by nonsexual routes [2], as HPV DNA has been detected in blood and in reproductive and placental cells, as well as in infants, in children, and in individuals who have never had sexual intercourse [2–4]. HPV horizontal transmission through saliva or other contact has been invoked to explain cases of oral infection in infants whose mothers are HPV negative [5], and investigations of vertical transmission have led to conflicting results and transient HPV detections in children [6, 7]. Thereby, we are still unable to fully understand the clinical relevance of these findings, for either pregnancy or pediatric care.

In theory, vertical transmission can occur through the following mechanisms of transmission: periconceptual transmission (during fertilization of an oocyte or immediately after fertilization), prenatal (during pregnancy), and perinatal (during or immediately after birth). In this review, we will discuss the significance and implications of the presence of papillomavirus in nonepithelial sites, and examine the possible consequences of fetal exposure to HPV and the extent to which these new findings can provide a better understanding of the natural history of papillomavirus infection.

POSSIBLE MECHANISMS OF HPV VERTICAL TRANSMISSION

Although HPV DNA has been detected in different sites of the male reproductive tract [8–10], sperm cells [4, 11, 12], semen [13, 14], endometrium, and ovaries [15], which suggests that HPV could be transmitted during the fertilization of an oocyte or immediately afterward, the significance of these findings is still unknown. In vitro analyses have indicated the viability of HPV infection in spermatozooids and the transcription of HPV genes in fecund oocytes [8–10, 16–20], and the transcriptional activity of HPV-16 in sperm

Received 13 August 2012; accepted 29 January 2013.

Correspondence: A. C. Freitas, PhD, Av. Prof. Moraes Rego 1235, Cidade Universitária, Recife 50670-901, PE, Brazil (ac_freitas@yahoo.com.br).

Clinical Infectious Diseases

© The Author 2013. Published by Oxford University Press on behalf of the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For Permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com.

DOI: 10.1093/cid/cir066

was confirmed *in vivo* [21]. However, further investigations are necessary to confirm this route of transmission.

For this reason, the discussion about the possible mechanisms of HPV vertical transmission will center on the prenatal and perinatal routes, which are better understood.

PRENATAL TRANSMISSION

The observation of infants showing signs of HPV-induced lesions at birth, such as laryngeal and anogenital lesions, has led to the belief that intrauterine HPV transmission can occur [22, 23]. HPV DNA has been detected in amniotic fluid [3], placenta, and the umbilical cord [7]. Both chorionic and placental tissue can be infected through the hematogenous route and hence, HPV can be spread to amniotic cells that are then ingested by the fetus [2, 3]. Transplacental infection, another possible means of HPV intrauterine transmission, can occur through the ascending route from the maternal genital tract, as it has been shown that the presence of HPV-DNA, both in amniotic fluid [3] and the umbilical cord [2], is correlated with cervical intraepithelial lesions in pregnant women.

Once believed to be low, the HPV vertical transmission rate has shown inconsistent results, probably due to the heterogeneous nature of the clinical trials [24]. Despite this, in a systematic quantitative review, Medeiros et al [24] reported a pooled relative risk of mother-to-child HPV transmission (4.8) when the mother is shown to be HPV positive. Additionally, the risk of the newborn having the same HPV type as that found in the maternal genital tract is 4 times greater when the umbilical cord blood is positive for the same HPV [25]. Evidence from the cervical samples indicates that mothers who transmit HPV to their infants have a higher viral load than those who do not [26].

Sarkola et al [25] reported that peripheral blood samples from all mothers who had HPV in the placenta and umbilical cord tested negative for HPV. According to these authors, the detection of viral DNA in their samples appears to be due to a maternal history of productive infection and not the detection of viral genetic material during pregnancy. However, there remains the possibility that HPV infected the placenta during early pregnancy and had already cleared the cervix at the time of delivery [2].

During pregnancy, the uterine canal undergoes anatomic and immunologic changes that may increase the susceptibility of pregnant women to infections [27]. In addition to other human viruses such as HIV, cytomegalovirus, and Epstein-Barr virus, HPV may be able to infect the placenta or cells of fetal origin [28]. The transplacental transmission of HIV and maternal cells, including lymphocytes, is a phenomenon that has already been described and can be stimulated by

pathologic conditions [28, 29]. Reports of the presence of HPV in polymorphonuclear cells suggest that the transfer of maternal cells could allow the virus to pass through maternal-fetal barrier. Additionally, as observed for hepatitis B virus and herpesvirus, under certain immunosuppressive conditions, there can be an increase in the passage of lymphocytes carrying latent HPV through the maternal-fetal barrier [28].

HPV trophoblast infection has been described in different studies [25, 30, 31]. Furthermore, You et al [32] demonstrated *in vitro* that trophoblast cells are broadly permissive for HPV and that this virus is able to complete its life cycle in trophoblast cell cultures.

PERINATAL TRANSMISSION

In this section, perinatal transmission will be considered as the result of the fetus coming into contact with infected cells of the vagina and cervix during birth. Some authors have demonstrated that there is both an increased rate of HPV detection among newborns by vaginal delivery (51.4%), compared to those delivered by cesarean section (27.3%) [33] and an increased incidence of juvenile respiratory papillomatosis after prolonged delivery (>10 hours) [34]. At the same time, Tenti et al [35] observed a low potential for viral transmission to the oropharyngeal mucosa of newborns from mothers without changes in oncotic colposcopy or a history of genital warts.

The view that a cesarean delivery provides protection against the transmission of neonatal herpes in pregnant women with obvious injuries has led to the suggestion that this procedure can be adopted for perinatal pregnant women with genital warts [27]. However, there is no clear consensus about the degree of protection that cesarean delivery can offer against maternal-fetal transmission of HPV [2]. This lack of agreement is based on 3 hypotheses: (1) the risk of disease transmission would be low; (2) a cesarean delivery does not ensure complete protection, because papillomatosis transmission has even been observed in elective cesarean delivery; and (3) the risks resulting from a cesarean section are greater than the potential benefits [5, 34]. In rare circumstances, the cesarean is recommended for women with genital warts that cause obstruction in the birth canal, or in cases where vaginal delivery will result in excessive bleeding due to laceration of the warty lesions [27].

HPV VIRAL LATENCY

Given the lack of a clear understanding of the natural history of HPV, this raises a key question: Does the failure to detect viral DNA transmitted from a previously infected individual represent viral clearance or a state of viral latency [36]? In

natural history studies, women may undergo multiple transient states that can lead to detection of HPV DNA in cervical samples [37]. Thus, because it is impossible to detect viral DNA in an individual, we cannot differentiate between the following states: DNA-negative individuals who are not infected and immune; DNA-negative individuals not infected and susceptible; and DNA-negative and infected individuals [36].

Viral latency has been invoked to justify this situation. This viral status, which is characterized by a significant decrease in viral protein expression and the establishment of papillomavirus DNA in the episomal form, restricts the infection to basal cells of the epithelium [38], where they remain controlled by a responsive immunologic memory [39]. However, factors that suppress the immune system allow an occurrence of viral reactivation [38], as described in studies that have detected fulminant warts in immunosuppressed individuals [39].

Animal models of papillomavirus infection have provided valuable experimental evidence for viral latency [38]. The observations obtained from cottontail rabbit papillomavirus and canine oral papillomavirus models have shown that latent viral particles are virologically active under certain conditions. This is analogous to the detection of HPV DNA in normal laryngeal epithelium of patients with recurrent respiratory papillomatosis (RRP) in remission [40]. A model of HPV latency has been proposed to carry this out [36].

The limited understanding of this scenario has clear implications for a literal interpretation of the status of HPV infection, particularly for infants. Some studies suggest that detection of HPV DNA in newborns is only persistent in the early days [35] or months [6, 26]; other authors have reported cases in which HPV persists until the first [41] and third years of life [5]. The assumption that detection of HPV in newborns, from a vertical transmission, is clinically insignificant because it may not be persistent ignores the viral latency and the real implications of this mode of transmission (Figure 1).

EVIDENCE OF PAPILOMAVIRUS VERTICAL TRANSMISSION THROUGH ANIMAL MODELS OF INFECTION BASED ON BOVINE PAPILOMAVIRUS

To date, no studies have clearly demonstrated HPV vertical transmission in humans. However, studies with BPV (bovine papillomavirus) have shown the most consistent data to support the viability of hematogenous and vertical transmission [42, 43].

BPV is responsible for the development of skin lesions and cancers in bovids [42, 44, 45]. BPV vertical transmission was initially suggested after viral detection in the blood of cows and their offspring [45]. These reports were followed by detection of BPV DNA in the reproductive tracts of bovids, fluids

and gametes, and embryonic annexes [44–49]. After the detection of BPV protein in lymphocytes [42], this cell was postulated as a vehicle for carrying BPV to the reproductive tract [49].

Recent discoveries made by Roperto et al [43] may represent a watershed in the investigation of papillomavirus vertical transmission, as their study showed productive infection of BPV-2 in cells of the uterine epithelium and chorionic placenta. Additionally, E5 oncoprotein was characterized to form a complex with the platelet-derived growth factor β receptor (PDGFR β), both in the trophoblast cells and in bovine fetal organs [43]. This complex might be associated with an abnormal organogenesis in the embryo and an impairment of pregnancy [43]. Together, these significant findings corroborate the hypothesis of the vertical transmission of this virus.

IMPLICATIONS OF HPV VERTICAL TRANSMISSION

Since the 1990s, various groups have investigated HPV vertical transmission and detected viral DNA and antibodies in both pregnant mothers and in newborns [2]. However, different techniques and methodologies for sample collection (buccal swab, cervical brush, blood) or detection of viral DNA (hybridization by Southern blotting, polymerase chain reaction) have variable sensitivities and have yielded conflicting results [2, 36]. Owing to the incomprehension of the molecular mechanisms governing viral latency and the development of natural immunity against HPV, and the failure to assess viral activity, the presence of HPV-DNA in blood and reproductive and embryonic cells was treated as a transitional marker, which represented less frequent and/or nonpersistent events.

Animal models suggest that papillomavirus can be spread to different tissues by lymphocyte infection, in particular to the reproductive tract and gametes [49]. Additionally, recent experiments with cattle confirm *in vivo* the viability of productive papillomavirus infection in cells of the placenta. Even though HPV-DNA was also found in lymphocytes, the outcomes of this finding need further investigation.

Nobbenhuis et al [50] showed that the first 2 trimesters of pregnancy are characterized by an increasing susceptibility to HPV. It can represent a latent HPV activated during early pregnancy. *In vivo* and *in vitro* assays have shown that the levels of steroid hormones, which characteristically rise during pregnancy, may act as HPV cofactors in epithelial proliferation [27]. This means that this "window of accessibility" may increase the exposure of the fetus to vertical transmission.

The possible implications of HPV vertical transmission are wide-ranging, given the oncogenic characteristics of HPV [1]. One of the well-characterized clinical complications is RRP, which is the development of lesions in the larynx, vocal cords,

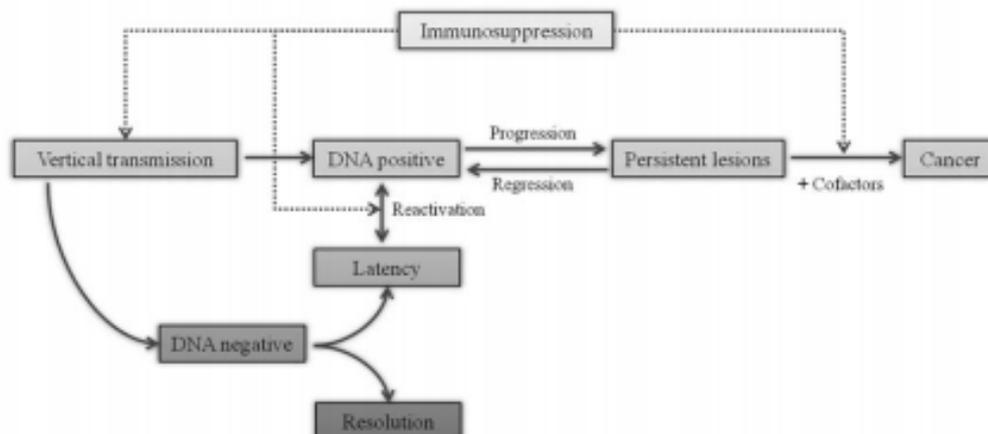


Figure 1. Natural history model of human papillomavirus (HPV) infection and DNA transition states showing the possible influences of vertical transmission and viral latency. The DNA detection from infants who have acquired HPV from their mothers could be transient due to viral latency. Under some circumstances as immunosuppression, the latent virus can be reactivated and induce the formation of lesions, which could progress to cancer or not. Alternatively, the immunosuppression could contribute to viral reactivation and/or acquirement during pregnancy, which could possibly result in vertical transmission.

and oral and nasal mucous membranes, and in rare cases, reaches the trachea and bronchi [2, 51]. RRP has a bimodal age distribution that includes the juvenile form and an adult form [51]. Although some studies have established a relationship between juvenile RRP and the presence of maternal genital warts in 30%–50% of patients [2], the majority of children who develop this disease are born from women with no history of genital warts during pregnancy [34].

Although the results are less clear than those of RRP, the presence of HPV in semen has been linked to male infertility; asthenozoospermia has been linked to viral detection, and infertile men have a prevalent HPV infection in the spermatozoid [4, 19, 20]. The exact prevalence of HPV-DNA in sperm remains a controversial issue. HPV semen infection was found in 10% of the samples from asymptomatic men who had unprotected intercourse [13]; this figure rose to 53.8% among patients affected by genital warts and 40.9% of patients who had an HPV-positive female partner [14]. Despite our lack of a clear understanding of the role of HPV in the semen, the literature raises the possibility that spermatozooids might act as a vector in the transmission of HPV DNA. This may occur both in the cumulus cells, where it can lead to implantation failure [52], and in the embryo, where it may explain why some HPV-negative pregnant women give birth to HPV-positive infants [2]. Perino et al [53] reported an increased risk of abortion when HPV-DNA testing was positive in the female partner (40% infected vs 13.7% noninfected), which was even higher when the sperm samples of the male partner were infected (66.7% infected vs 15% not infected).

In pregnant women, the risk of HPV transplacental dissemination and the subsequent development of disorders such as hydatidiform mole and choriocarcinoma have been supported by *in vitro* assays. HPV has been shown to deregulate trophoblast–endometrial cell adhesion and invasion [30, 54] and this finding supports the emergence of disorders and impairments in pregnancy resulting from the action of HPV in the placenta, such as genetic abnormalities of the fetus, spontaneous abortions, and premature births [30, 31]. According to Hermonat et al [31], 60% (15/25) of the samples obtained from spontaneous abortion products and 20% (3/15) of those obtained from elective abortion products were positive for the presence of HPV E6 and E7 genes. Furthermore, HPV-16 DNA in syncytiotrophoblastic cells was detected in 29% of the samples collected from the spontaneous abortion group. Finally, the exposure of a 2-cell mouse embryo to HPV-DNA demonstrated a decrease in blastocyst formation and a reduced hatching process [55].

Interestingly, Roperto et al [43] found that E5/PDGFR complex, which is important for the development of urinary bladder carcinogenesis, was also characterized in bovine fetal organs. Although HPV E5 protein is not characterized by the main viral oncoprotein, its action on the epidermal growth factor receptor (EGFR) and its correlation with cell cycle disorders in the epithelium [56] have already been described. If the findings obtained with BPV are extrapolated for infection in humans, it can be postulated that E5/EGFR complex is related to disorders of the embryonic attachments described in the literature. In addition to a possible relationship with

pregnancy loss, HPV infection was also linked to spontaneous premature births. The HPV-DNA was detected more frequently in the extravillous trophoblast region of placentas from spontaneous preterm delivery cases (15/30) than from controls (6/30) [30]. These findings support the hypothesis that HPV infection could cause abnormal placental functions which, in turn, may partly be the origin of prematurity.

Finally, the exposure of the fetal immune system to viral antigens might reduce the postpartum immune response to viral proteins, a phenomenon that might be applicable to children who develop Burkitt lymphoma and may have antibodies against Epstein-Barr virus in the first 6 months of life [22]. Considering what has been proposed for the HPV latency model, it can also be assumed that contact between the embryo or fetus with viral antigens does not have an immediate effect such as abortion or malformation. Rather, the virus remains in a latency period until some cellular disturbance stimulates the viral activation and replication. Taken together, these hypotheses could partly explain cases in which HPV-positive women give birth to HPV-negative infants, as well as the familial tendency to develop HPV-related cancers [3].

PERSPECTIVES AND CONCLUSIONS

This review discusses the current concepts with regard to HPV vertical transmission. However, it should be stressed that there is still no way to describe in detail how this phenomenon occurs. This subset of work suggests a complex network of events leading to mother-to-child HPV transmission, which could be a combination of factors linked to HPV infection during pregnancy and to the pregnant mother herself (eg, age, mode of delivery). In addition, the impact of HPV transmission on embryonic outcomes seems to depend on the precise moment of infection.

In light of this, others significant questions arise: How should we proceed when HPV DNA is identified in the mother during the pregnancy? Even on the basis of conservative clinical reasoning from which the puerperal period can reverse a greater predisposition to HPV by pregnant women, this situation seems to increase the exposure of the fetus to vertical transmission. Moreover, questions about HPV in men are also important. Should research about HPV infections be extended to the fathers during the prenatal exams? Should semen banks be subject to a screening for HPV?

The number of reports of nonepithelial tropism of HPV is still increasing, and the impact of this scenario must be investigated. Further work should focus clearly on the question of characterizing these nonsexual routes of transmission and should employ methodologies that are sensitive enough to distinguish between HPV latency and productive/active infection [2, 6]. With vaccination programs against HPV still being set up in various

countries, it is crucial to have a proper understanding of the natural history of HPV.

Notes

Acknowledgments. We thank Raiza Bruscky for her valuable assistance in providing the illustration for the manuscript.

Financial support. The work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, and Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco.

Potential conflicts of interest. All authors: No potential conflicts.

All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

References

1. WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre). Human papillomavirus and related cancers in the world: summary report. Available at: <http://www.who.int/hpvcentre>. Accessed 26 September 2011.
2. Syrjänen S. Current concepts on human papillomavirus infections in children. *APMIS* 2010; 118:494–509.
3. Armbruster-Moraes E, Ioshimoto LM, Leão E, Zugaib M. Presence of human papillomavirus DNA in amniotic fluids of pregnant women with cervical lesions. *Gynecol Oncol* 1994; 54:152–8.
4. Garolla A, Pizzol D, Foresta C. The hole of human papillomavirus on sperm function. *Curr Opin Obstet Gyn* 2011; 23:232–7.
5. Puranen MH, Yliskoski MH, Saarikoski SV, Syrjänen KJ, Syrjänen SM. Exposure of an infant to cervical human papillomavirus infection of the mother is common. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 176:1039–45.
6. Castellsagué X, Drudis T, Cañadas MP, et al. Human papillomavirus (HPV) infection in pregnant women and mother-to-child transmission of genital HPV genotypes: a prospective study in Spain. *BMC Infect Dis* 2009; 9:74.
7. Rombaldi RL, Serafini EP, Mandelli J, Zimmermann E, Losquiavo KP. Perinatal transmission of human papillomavirus DNA. *Virol J* 2009; 6:83.
8. Griffiths TR, Mellon JK. Human papillomavirus and urological tumours: II. Role in bladder, prostate, renal and testicular cancer. *BJU Int* 2000; 85:211–7.
9. Rintala MAM, Pollanen PP, Nikkanen VP, Grénman SE, Syrjänen SM. Human papillomavirus DNA is found in the vas deferens. *J Infect Dis* 2002; 183:1664–7.
10. Giovannelli L, Migliore MC, Capra G, et al. Penile, urethral and seminal sampling for diagnosis of human papillomavirus infection in men. *J Clin Microbiol* 2007; 45:248–51.
11. Didelot-Rousseau MN, Diafouka F, Yayo E, Kouadio LP, Monnet D, Segondy M. HPV seminal shedding among men seeking fertility evaluation in Abidjan, Ivory Coast. *J Clin Virol* 2007; 39:153–5.
12. Bezold G, Politch JA, Kiviat NB, Kuypers JM, Wolff H, Anderson DJ. Prevalence of sexually transmissible pathogens in semen from asymptomatic male infertility patients with and without leukocytospermia. *Fertil Steril* 2007; 87:1087–97.
13. Foresta C, Garolla A, Zuccarello D, et al. Human papillomavirus found in sperm head of young adult males affects the progressive motility. *Fertil Steril* 2010; 93:802–6.
14. Foresta C, Pizzol D, Moretti A, Barzon L, Palù G, Garolla A. Clinical and prognostic significance of human papillomavirus DNA in the sperm or exfoliated cells of infertile patients and subjects with risk factors. *Fertil Steril* 2010; 94:1723–7.
15. Lai CH, Hsueh S, Lin CY, et al. Human papillomavirus in benign and malignant ovarian and endometrial tissues. *Int J Gynecol Pathol* 1992; 11:210–5.

16. Bodaghi S, Wood LV, Roby G, Ryder C. Could human papillomavirus be spread through blood? *J Clin Microbiol* 2005; 43:5428-34.
17. Wolff H. The biologic significance of white blood cells in semen. *Fertil Steril* 1995; 63:1143-57.
18. Bielanski A. Disinfection procedures for controlling microorganisms in the semen and embryos of humans and farm animals. *Theriogenology* 2007; 68:1-22.
19. Foresta C, Ferlin A, Bertoldo A, Patassini C, Zuccarello D, Garolla A. Human papilloma virus in the sperm cryobank: an emerging problem? *Int J Androl* 2010; 34:242-6.
20. Foresta C, Patassini C, Bertoldo A, et al. Mechanism of human papillomavirus binding to human spermatozoa and fertilizing ability of infected spermatozoa. *PLoS One* 2011; 6:e15036.
21. Lai YM, Yang FP, Pao CC. Human papillomavirus deoxyribonucleic acid and ribonucleic acid in seminal plasma and sperm cells. *Fertil Steril* 1996; 65:1026-30.
22. Hajek E. Contribution to the etiology of laryngeal papilloma in children. *J Laryngol Otol* 1956; 70:166.
23. Marcoux D, Nadeau K, McCuaig C, Powell J, Oligny LL. Pediatric anogenital warts: a 7-year review of children referred to a tertiary-care hospital in Montreal, Canada. *Pediatr Dermatol* 2006; 23:199-207.
24. Medeiros LR, Ethur ABM, Hilgert JB, et al. Vertical transmission of the human papillomavirus: a systematic quantitative review. *Cad Saude Publica* 2005; 21:1006-15.
25. Sarkola ME, Grénmani SE, Rintala MAM, Syrjanen KJ, Syrjanen SM. Human papillomavirus in the placenta and umbilical cord blood. *Acta Obstet Gyn Scand* 2008; 87:1181-8.
26. Kaye JN, Cason J, Pakarian FB, et al. Viral load as a determinant for transmission of human papillomavirus type 16 from mother to child. *J Med Virol* 1994; 44:415-21.
27. Maluf M, Perin PM. HPV e gestação. In: Rosenblatt C HPV na pratica clinica. Atheneu: Brazil Press; 2005: 193-225.
28. Younes AS, Csire M, Kapusinszky B, Szomor K, Takács M, Berencsi G. Heterogeneous pathways of maternal-fetal transmission of human viruses. *Pathol Oncol Res* 2009; 15:461-5.
29. Bhoopat L, Khunamornpong S, Sirivatanapa P, et al. Chorioamnionitis is associated with placental transmission of human immunodeficiency virus-1 genotype E in the early gestational period. *Mod Pathol* 2005; 18:1357-64.
30. Gomes LM, Ma Y, Ho C, McGrath CM, Nelson DB, Parry S. Placental infection with human papillomavirus is associated with spontaneous preterm delivery. *Hum Reprod* 2008; 3:709-15.
31. Hermonat PL, Han L, Wendel PJ, et al. Human papillomavirus is more prevalent in first trimester spontaneously aborted products of conception compared to elective specimens. *Virus Genes* 1997; 14:13-17.
32. You H, Liu Y, Agrawal N, et al. Infection, replication, and cytopathology of human papillomavirus type 31 in trophoblasts. *Virology* 2003; 316:281-9.
33. Tseng CJ, Liang CC, Soong YK, Pao CC. Perinatal transmission of human papillomavirus in infants: relationship between infection rate and mode of delivery. *Obstet Gynecol* 1998; 91:119-24.
34. Silverberg MJ, Thorsen P, Lindeberg H, Grant LA, Shah KV. Condyloma in pregnancy is strongly predictive of juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis. *Obstet Gynecol* 2003; 101:645-52.
35. Tenti P, Zappatore R, Miglioia P, Spinillo A, Belloni C, Carnevali L. Perinatal transmission of human papillomavirus from gravidas with latent infections. *Obstet Gynecol* 1999; 93:475-9.
36. Gravitt PE. The known unknowns of HPV natural history. *J Clin Invest* 2011; 121:4593-9.
37. Trottier H, Ferreira S, Thomann P, et al. Human papillomavirus infection and reinfection in adult women: the role of sexual activity and natural immunity. *Cancer Res* 2010; 70:8569.
38. Maglennon GA, McIntosh P, Doobar J. Persistence of viral DNA in the epithelial basal layer suggests a model for papillomavirus latency following immune regression. *Virology* 2011; 414:153-63.
39. Schmook T, Nindl I, Ulrich C, Meyer T, Sterry W, Stockfleth E. Viral warts in organ transplant recipients: new aspects in therapy. *Brit J Dermatol* 2003; 149:20-4.
40. Abramson AI, Nouri M, Mullooly V, Fisch G, Steinberg BM. Latent human papillomavirus infection is comparable in the larynx and trachea. *J Med Virol* 2004; 72:473-7.
41. Watts H, Koutsky LA, Holmes KK, et al. Low risk of perinatal transmission of human papillomavirus: results from a prospective cohort study. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 178:365-73.
42. Roperto S, Comazzi S, Ciusani E, et al. Peripheral blood mononuclear cells are additional sites of productive infection of bovine papillomavirus type 2. *J Gen Virol* 2011; 92:1787-94.
43. Roperto S, Borzacchiello G, Esposito I, et al. Productive infection of bovine papillomavirus type 2 in the placenta of pregnant cows affected with urinary bladder tumors. *PLoS One* 2012; 7:33569.
44. Carvalho C, Freitas AC, Brunner O, et al. Bovine papillomavirus type 2 in reproductive tract and gametes of slaughtered bovine female. *Braz J Microbiol* 2003; 34:72-3.
45. Freitas AC, Carvalho C, Brunner O, et al. Viral DNA sequences in peripheral blood and vertical transmission of the virus: a discussion about BPV-1. *Braz J Microbiol* 2003; 34:76-8.
46. Yagutu A, Carvalho C, Freitas AC, Góes LGB, Stocco dos Santos RC. Papillomatosis in cattle: in situ detection of bovine papillomavirus DNA sequences in reproductive tissues. *Braz J Morphol Sci* 2006; 23:525-9.
47. Lindsey CJ, Almeida ME, Vicari CF, et al. Bovine papillomavirus DNA in milk, blood, urine, semen and spermatozoa of bovine papillomavirus-infected animals. *Genet Mol Res* 2009; 8:310-8.
48. Silva MAR, Pontes NE, da Silva KMG, Guerra MMP, Freitas AC. Detection of bovine papillomavirus type 2 DNA in commercial frozen semen of bulls (*Bos taurus*). *Anim Reprod Sci* 2011; 129:146-51.
49. Freitas AC, Silva MAR, Carvalho CCR, et al. Papillomavirus DNA detection in non epithelial tissues: a discussion about bovine papillomavirus. In: Mendez-Villas A. Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology. Badajoz, Spain: Formatex, 2007:697-704.
50. Nobbenhuis MA, Helmerhorst TJ, Brule AJ, et al. High-risk human papillomavirus clearance in pregnant women: trends for lower clearance during pregnancy with a catch-up postpartum. *Brit J Cancer* 2002; 87:75-80.
51. Derkay CS, Wiatrak B. Recurrent respiratory papillomatosis: a review. *Laryngoscope* 2008; 118:1236-47.
52. Kadze R, Chan PJ, Jacobson JD, Corselli JU, King A. Temperature variable and the efficiency of sperm mediated transfection of HPV 16 DNA into cells. *Asian J Androl* 2002; 4:169-73.
53. Perino A, Giovannelli L, Schillaci R, et al. Human papillomavirus infection in couples undergoing in vitro fertilization procedures: impact on reproductive outcomes. *Fertil Steril* 2011; 95:1845-8.
54. Boulonou S, Weyn C, Van Noppen M, Moussan AM, Favre M, Delyenne PO. Effects of HPV-16 E5, E6 and E7 proteins on survival, adhesion, migration and invasion of trophoblastic cells. *Carcinogenesis* 2010; 31:473-80.
55. Henneberg AA, Patton WC, Jacobson JD, Chan PJ. Human papilloma virus DNA exposure and embryo survival is stage-specific. *J Assist Reprod Genet* 2006; 23:255-9.
56. Genter-Williams SM, Disbrow GL, Schlegel R, Lee D, Threadgill DW, Lambert PF. Requirement of epidermal growth factor receptor for hyperplasia induced by E5, a high-risk human papillomavirus oncogene. *Cancer Res* 2005; 65:6534-42.

Manuscrito publicado como co-autor:



Production of Equine Infectious Anemia Virus (EIAV) antigen in *Pichia pastoris*

Luciana Cavalcanti de Arruda Coutinho^a, André Luiz Santos de Jesus^b,
Karin Florêncio Lins de Paiva Fontes^a, Eliane Campos Coimbra^b, Filipe Colaço Mariz^b,
Antonio Carlos de Freitas^b, Rita de Cássia Carvalho Maia^a, Roberto Soares de Castro^{a,*}

^a Department of Veterinary Medicine, Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP 52171-900, Recife, Pernambuco, Brazil
^b Laboratory of Molecular Studies and Experimental Therapy, Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, CEP 50670-901, Recife, Pernambuco, Brazil

ABSTRACT

Article history:

Received 22 August 2012
Received in revised form 21 March 2013
Accepted 4 April 2013
Available online 17 April 2013

Keywords:

Methylotrophic yeasts
Western blotting
AGID
Capsid protein
ELISA
EIA

Equine Infectious Anemia (EIA) is a persistent lentivirus infection of horses which causes a chronic clinical condition with worldwide importance in veterinary medicine. The p26 protein is usually prepared for use as an antigen in serological tests for EIA diagnosis since it is a well-conserved gene sequence and very immunogenic. In view of the ability of yeast to make post-translational modifications of proteins, this study was carried out to allow *Pichia pastoris* to be used for the expression of a synthetic codon-optimized EIAV p26 gene. The gene was cloned into pPICZαA vector after appropriate enzymatic digestion. *P. pastoris* clones transformed with the pPICZαAp26 construction were induced to produce the recombinant p26 protein (rp26) under the regulation of alcohol oxidase 1 promoter by adding methanol to the culture medium. The p26 gene expression was detected by RT-PCR and the production of rp26 was confirmed by dot blotting, Western blotting, ELISA and AGID. The *P. pastoris* expression system was capable of producing a functional EIAV p26 protein that can be used directly in the functionality tests without requiring laborious purification or recovery steps. This is the first reported study of EIAV p26 protein production in yeast cells.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Equine Infectious Anemia (EIA) is a viral disease of equids caused by a macrophage-tropic lentivirus belonging to the Retroviridae family, and characterized by chronic infection (Craig et al., 2009). The EIA virus (EIAV) genome consists of two complementary RNA positive strands with 8.2 kb, comprising three genes (gag, pol and env coding structural and nonstructural proteins) and three open reading frames that encode regulatory proteins (tat, rev and S2). The 55 kDa Gag-precursor (Pr55gag) polyprotein coded by the gag region is essential in the virus replication cycle because it is related to virus budding from the host cells. This Pr55gag precursor is cleaved by the viral protease into four main mature virion internal structural proteins: p15 (transmembrane), p26 (capsid), p11 and p9 (nucleocapsid) (Hussain et al., 1988; Stephens et al., 1986). The p26 protein represents about 40% of the total number of

EIAV proteins and is well conserved among different viral strains (Zhang et al., 1999). It is also the most immunogenic protein (Leroux et al., 2004; Montelaro et al., 1982) and thus the target antigen used in serological tests using EIA.

The disease is most widespread in hot and humid climates, and its principal form of transmission is through hematophagous insects of the Tabanidae family (Issel and Foil, 1984). Infected animals are a constant source of the disease virus, and most of them (95%) are asymptomatic carriers (Reis and Leite, 1994). Another obstacle to disease control is the lack of treatment or vaccine against EIAV. Thus, laboratory diagnosis plays a decisive role in the control and prevention of the disease. The detection of EIAV antibodies through serological tests such as agar gel immunodiffusion assay (AGID) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), are recommended by the World Organization for Animal Health (OIE) as official tests for international equine transit (OIE, 2008). Most studies that involve the diagnosis of EIA, have reported the production of viral antigens from cell cultures infected with EIAV (Bouillant et al., 1986; Malmquist et al., 1973). However, bovine serum proteins that are used routinely in cell cultures, can cause nonspecific reactions, and lead to conflicting results (Alvarez et al., 2007a).

Other heterologous systems can be regarded as more reliable and efficient, while also being capable of producing antigens on a large scale, with a greater degree of homogeneity in the

* Corresponding author. Tel.: +55 81 33206428.
E-mail addresses: lcacoutinho@gmail.com (L.C. de Arruda Coutinho), andreluizjesus@gmail.com (A.L.S. de Jesus), karinfontes@gmail.com (K.F.L. de Paiva Fontes), elianeccoimbra@gmail.com (E.C. Coimbra), filipe.mariz@yahoo.com.br (F.C. Mariz), acf.ufpe@yahoo.com.br (A.C. de Freitas), rcmaia@dmv.ufpe.br (R. de Cássia Carvalho Maia), rscastro@dmv.ufpe.br (R.S. de Castro).

production, in contrast with the cell culture system (Bürki et al., 1992; Rossmann and Horvath, 1989). Several studies have been carried out with the aim of producing EIAV p26 protein in heterologous expression systems, such as *Escherichia coli* (Alvarez et al., 2007b; Archambault et al., 1989; Birkett et al., 1997; Jin et al., 1999; Piza et al., 2007) and baculovirus-infected insect cells (Kong et al., 1997). Although the *E. coli* expression system is considered to be simple and inexpensive, it raises some problems including the fact that it is unable to undergo post-translational modifications (like proper formation of disulfide bonds) and has poor recombinant protein solubility (Porro et al., 2010; Sahdev et al., 2008). In contrast, eukaryotic systems have the potential capacity to make the necessary modifications for the biological activity of recombinant proteins. The *Pichia pastoris* yeast expression system has several advantages over other heterologous expression systems (Pokoj et al., 2010), including easy genetic manipulation and the ability to produce and secrete high levels of heterologous proteins in low cost culture media, from which it can easily be recovered (Macauley-Patrick et al., 2005).

This paper describes the first record of the production of EIAV p26 protein using *P. pastoris* as a heterologous expression system.

2. Materials and methods

2.1. Codon-optimization of EIAV p26 gene

The nucleotide sequence of EIAV p26 gene was designed *in silico* and was based on the sequence of a Wyoming viral strain (NC_001450). The gene was optimized through the increase of GC content and the replacement of rare codons with the more commonly used codons in *P. pastoris* yeast. The analysis of the preferred codons of the heterologous gene and the host organism was performed online by GCUA (<http://gcu.schoedl.de>) software. In addition, the GC content of the heterologous gene was analyzed through the GenRunner for Windows program version 3.05 (Hasting Software). After this analysis, the nucleotide sequence was sent to Epoch Biolabs (Texas, USA) for synthesis. The codon-optimized gene was fused to a polyhistidine tag at the C-terminal portion, to facilitate the immunodetection of the p26 protein.

2.2. Cloning of EIAV p26 gene into pPICZαA vector

All the DNA manipulations were performed in accordance with the standard protocols recommended by Sambrook and Russel (2001). The codon-optimized EIAV p26 gene was digested with *Xho*I and *Not*I enzymes (New England Biolabs, MA, USA) and cloned into pPICZαA expression vector (Invitrogen, SP, Brazil) which was digested in the same way. This product was used to transform competent cells of *E. coli* DH5α strain. After the transformation procedure, the cells were plated onto low salt Luria-Bertani (LB) medium (0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, 1% tryptone, pH 7.5), supplemented with 25 μg/ml zeocin (Invitrogen) and the plates were incubated for 16 h at 37 °C. The presence and orientation of the insert was analyzed through plasmid extraction followed by enzymatic digestion and DNA sequencing.

2.3. DNA sequencing

The expression cassette was sequenced by dideoxy method (ABI3100 sequencer, Applied Biosystems). The edition and sequence analysis was carried out by means of the BioEdit program

for Windows. Multiple sequence alignments were performed using the ClustalW program for Windows.

2.4. The transformation of *P. pastoris* and selection of recombinants

The *P. pastoris* strain used for recombinant protein expression was the X-33, wild genotype, phenotype Mut⁺ (methanol utilization plus). *P. pastoris* cells were transformed by electroporation, with the expression cassette linearized by digestion with *Sac*I enzyme and grown on plates containing YPDS (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose, 1 M sorbitol, 2% agar) supplemented with 100 μg/ml zeocin. The recombinants resistant to zeocin were analyzed for the presence of the expression cassette by colony PCR under the following conditions: initial denaturation at 94 °C for 4 min, 35 cycles of denaturation at 94 °C for 1 min, followed by annealing at 55 °C for 1 min and extension at 72 °C for 2 min, with final extension at 72 °C for 10 min. The AOX1F and R primers were used for this amplification, as provided in EasySelect™ *Pichia* Expression Kit (Invitrogen).

2.5. Screening by dot blotting

P. pastoris positive in the colony PCR was first analyzed for the protein production per induction assay in deep well plates. Isolated colonies from selective medium were inoculated into 1 mL of BMGY medium (1% yeast extract, 2% peptone, 1.34% YNB, 0.002% biotin, 1% glycerol, 100 mM sodium phosphate, pH 6.0) and incubated at 28 °C for 24 h under vigorous shaking. Following this, the cells were centrifuged and transferred to 1 mL of BMMY medium (composition similar to BMGY, except for the replacement of glycerol with by 0.5% methanol). Induction was performed for 72 h with the addition of methanol to a final concentration of 1% every 24 h. After the growth, aliquots of 1 mL were collected and centrifuged, and the supernatant was recovered for analysis of recombinant p26 (rp26). Aliquots of 100 μL of the supernatant of the plate induction were used for the analysis of rp26 production by dot blotting assays, as described by Coimbra et al. (2011) using a monoclonal antibody (mAb) anti-6xHis alkaline phosphatase conjugated (1:10,000) (Sigma-Aldrich, SP, Brazil) and NBT/BCIP (Sigma-Aldrich) for revelation of reactions.

2.6. Expression of EIAV p26 gene in *P. pastoris*

The EIAV p26 gene expression was evaluated by RT-PCR of the p26 mRNA from *P. pastoris* cells induced by methanol. The clones which showed most intense reaction in the dot blotting assay, were selected for induction in baffled flasks. The induction assay was performed at 28 °C, with agitation speed of 200 rpm for 72 h. 1% methanol was added every 24 h and the aliquots were collected for analysis of growth curve, pH variation, presence of viral RNA and protein detection. As a negative control, *P. pastoris* X-33 was used and transformed with the empty pPICZαA vector and as a positive control *P. pastoris* GS115/pPICZαA/HSA was used in the expression of human serum albumin. Both controls were provided by the Easy Select *Pichia* Expression Kit.

Total RNA from *P. pastoris* clones induced by methanol was extracted using an RNAeasy extraction kit (Qiagen, SP, Brazil) following the manufacturer's recommendations. The EIAV p26 mRNA was detected by RT-PCR using the ImProm-II Reverse Transcription System kit (Promega, WI, USA). For the RT-PCR, the primers p26F 5'-TGAGGAGATGAACCGTTTC-3' and p26R 5'-GCCTTTGGCTTACCGATC-3' were designed for amplification of a 300 bp internal fragment from the EIAV p26 gene, based on the codon-optimized nucleotide sequence of the gene.

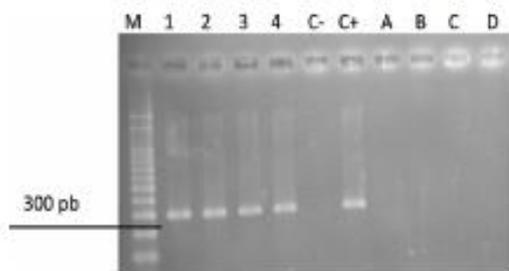


Fig. 1. RT-PCR of *P. pastoris* X-33/pPICZαAp26 after 72 h of methanol induction using p26F and p26R primers. M: 100 pb ladder; lanes 1–4: amplicon of 300 bp, relative to the central region of the nucleotide sequence that encodes the EIAV p26 protein; C–: water, negative control; C+: pPBSKp26 plasmid; lanes A–D: samples without reverse transcriptase enzyme.

2.7. Preparation of the antigen for AGID, ELISA and immunoblotting assays

The supernatant of *P. pastoris* transformed with pPICZαAp26 construction and the supernatant of *P. pastoris* transformed with only pPICZαA, was centrifuged ($10,000 \times g$ for 5 min) and 40-fold concentrated by dialysis against PEG 6000 40% (w/v) (Vetec Química Fina, SP, Brazil) in phosphate buffered saline (PBS) pH 7.6. The precipitation process was performed slowly in the magnetic agitator at 4 °C, accompanied by dialysis using a membrane – 3787-D50 (Thomas Scientific, USA/Canada). After this, 10 mM PMSF (Sigma–Aldrich), was added with 2 M sorbitol and 15 ppm of the Proclin™ (Rohm and Haas, PA, USA), which defines the composition of the rp26 antigen. This product was used in different concentrations to meet the requirements of the AGID and ELISA immunoassays that were performed. In Western blotting, the rp26 antigen did not undergo any dilution however, since the ELISA and AGID 3.75 × and 2 × were diluted in PBS, respectively.

2.8. Immunoblotting

The proteins were quantified by the Bradford method, separated by 12.5% polyacrylamide gel electrophoresis and stained by silver nitrate in accordance with Morrissey (1981). After the transfer of proteins to polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Millipore, MA, USA), the blocking step was performed with 5% non-fat dry milk for 1 h and the membrane was incubated overnight at 4 °C against OIE standard positive anti EIAV serum (1:1000) (Batch: 7SAIE, Laboratory for equine disease in Maisons-Alfort, France). Following this, the membrane was washed with PBS-Tween and incubated with protein G horseradish peroxidase conjugated (1:45,000) (Sigma–Aldrich). The reaction was revealed with the ECL chemiluminescent kit (GE Healthcare, SP, Brazil).

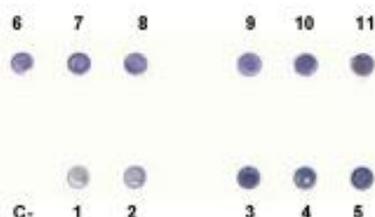


Fig. 2. Screening of *P. pastoris* recombinants. Representative dot blotting assay from recombinant *P. pastoris* supernatants. Wells 1–11: screening of *P. pastoris* recombinants after 72 h of methanol induction; C–: supernatant from *P. pastoris* transformed with only the expression vector used as negative control.

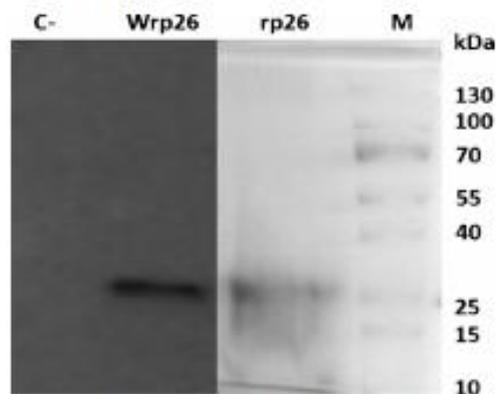


Fig. 3. Western blotting and SDS-PAGE stained by silver nitrate. Lane C–: supernatant from *P. pastoris* transformed with only the expression vector used as negative control; lane Wrp26: rp26 protein revealed with the OIE standard positive serum anti EIAV on Western blotting; lane rp26: rp26 protein from EIAV stained with silver; lane M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas, MD, USA).

2.9. ELISA and AGID

A 96-wells ELISA microplate (MICROLON™ 600-655081, Greiner-Bio One, SP, Brazil) was coated with 100 μL of the EIAV rp26 antigen. The optimum antigen concentration (3.75 × diluted) determined by titration against OIE standard serum was used in 0.05 M carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.6 and incubated for 2 h in a humid chamber at 37 °C. The blocking step was performed with 200 μL of 4% non-fat dry milk solution and incubated for 1 h. Three washings stages were carried out with 200 μL of 0.1% PBS-Tween 20 (PBS-T). The sera were diluted in a solution containing 0.1% PBS-T, 2% non-fat dry milk and 10 mM EDTA, added in the wells, incubated at 37 °C for 1 h and washed. After this, 100 μL of conjugate (protein G horseradish peroxidase conjugated) was added and diluted 1:90,000 in a solution containing 0.1% PBS-T and 2% non-fat dry milk. After being incubated again for 1 h at 37 °C, the plates were washed 5 times. Next, 100 μL of chromogenic substrate 0.1 M citrate-phosphate buffer (pH 5.0) was used. Finally, the plates were incubated at room temperature for 15 min and 100 μL of 2 N sulfuric acid was added. The plates were read using an ELISA reader (Multiskan Plus Thermo Fisher Scientific, USA) at a wavelength of 450 nm. The results were expressed as a ratio of O.D. serum positive/O.D. negative serum (P/N). 35 samples were used as positive sera for EIAV-positive carriers in the AGID test and 35 samples as negative sera from equestrian entity certified as being free of EIA.

The AGID was performed according to the instructions of the OIE manual (2008) using 1% agarose (Invitrogen) in borate buffer. The positive OIE standard anti-EIAV serum was tested 2 × concentrated, undiluted and 2 × diluted. In addition to this standard serum, the EIAV positive serum from the commercial Bruch kit (SP, Brazil), was also used and the anti-EIAV positive serum from Biovetech (PE, Brazil). The tests were performed with 20 μL of both reagents (antigen and serum). The optimal rp26 antigen concentration was determined as 2 × diluted.

3. Results

3.1. Construction of pPICZαAp26 and *P. pastoris* transformation

The optimization of the p26 gene for expression in *P. pastoris* resulted in a difference of 21% from the wild-type gene sequence. The EIAV p26 gene was cloned into the pPICZα expression vector and the pPICZαAp26 expression cassette was confirmed by enzymatic digestion and sequencing. This construction was used to

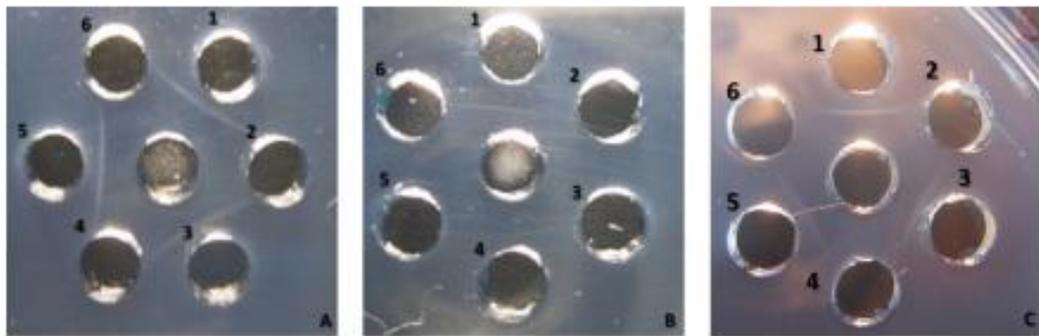


Fig. 4. Agar gel immunodiffusion with rp26. Unique precipitation lines resulted from the antigen/antibody reaction in agarose plate. (A) Central well: rp26 antigen; wells 1, 3 and 5: EIAV positive serum from Bruch kit; wells 2, 4 and 6: no sample. (B) Central well: negative control (supernatant of *P. pastoris* transformed with expression vector only), no precipitation lines were observed; wells 1, 3 and 5: EIAV positive serum from Bruch kit; wells 2, 4 and 6: no sample. (C) Central well: rp26 antigen; wells 2, 4 and 6: OIE standard positive serum 2x concentrated, undiluted and 2x diluted, respectively; well 1: EIAV positive serum undiluted from Biovetech; well 3: EIAV positive serum 1:1,5 diluted from Biovetech; well 5: EIAV positive serum 1:2 diluted from Biovetech. Readings were taken with 48 h of the reaction.

transform *P. pastoris* and the recombinants were submitted to *P. pastoris* colony PCR using the AOX1F and R primers to confirm the integration of the expression cassette into the genome of the yeast. The results observed in the PCR reaction indicated the presence of DNA fragments that are compatible with the construction (data not shown).

3.2. Production of rp26 protein

During induction, the growth rate of the clones ranged from 2.5×10^8 to 2.7×10^9 cells/mL while the pH of the media varied between 5.5 and 6.3 after 72 h of induction. The recombinant *P. pastoris* was also analyzed for p26 gene expression by RT-PCR. A 300 bp fragment from EIAV p26 gene was detected, which confirmed the presence of viral mRNA in *P. pastoris* after methanol induction. As a genomic DNA contamination control, a reverse transcription reaction without a reverse transcriptase enzyme, was performed for the samples analyzed (Fig. 1).

The immunodetection of the rp26 protein from supernatant was performed by dot blotting using anti-6xHis monoclonal antibody in the screening process (Fig. 2). According to the protein quantification system employed, about 230 µg/mL of total extracellular protein extract were obtained from the supernatant after PEG concentration. Around 10 µg of this sample was applied to SDS-PAGE and a protein with 26 kDa was observed (Fig. 3). The Western blotting assay using a polyclonal antibody (OIE standard positive serum) revealed a band of approximately 26 kDa, which represents the EIAV p26 protein molecular mass expected (Fig. 3).

3.3. Immunoreactivity of rp26

The ELISA with EIAV rp26 antigen from supernatant of *P. pastoris* revealed a 4.8 P/N ratio with minimum background activity (data not shown). When the AGID serological test was conducted with the same rp26 antigen used in ELISA, it revealed the formation of a single line identical to the EIAV positive sera: Bruch (Fig. 4A) and Biovetech (Fig. 4C). A minimum activity with an OIE standard serum was observed (Fig. 4C). The negative control (supernatant from *P. pastoris* strain transformed with expression vectors without the insert) did not detect any immunological reaction (Fig. 4B).

4. Discussion

Heterologous gene expression was detected by RT-PCR, dot blotting and Western blotting, which confirmed the gene transcription and the recombinant protein production in *P. pastoris* clones after

methanol induction. The immunoreactivity and specificity of rp26 protein was assessed by ELISA and AGID assays that only showed clearly positive reactions with positive sera.

The EIAV p26 protein has been produced in *E. coli* (Alvarez et al., 2007a; Jin et al., 1999; Piza et al., 2007), since it offers easy genetic manipulation and low cost media. However, in this system, nearly 70% of the recombinant proteins are overexpressed as insoluble inclusion bodies, and thus the process of purification and recovery of intracellular products from *E. coli* becomes laborious (Yang et al., 2011). The *P. pastoris* expression system was chosen so that the recombinant p26 could be used for EIA diagnosis by AGID and ELISA, because this is widely used and recognized as efficient (Lin-Cereghino et al., 2006; Sorensen, 2010). The recovery and purification of the recombinant protein was assisted by using the α -factor peptide from the pPICZ α A vector, which is a signal sequence to secrete the rp26.

Moreover, the problem of premature interruption of transcriptions, caused by the presence of AT-rich regions in the gene (which may produce truncated mRNA), was reduced by synthesizing the EIAV p26 gene (Romanos, 1995). The increased levels of protein expression were carried out by using preferred codons for expression in *P. pastoris* with A-T content adjusted to 55%, which represents the percentage considered necessary to potentiate the expression level in *P. pastoris* (Sreerikshna et al., 1997).

During the screening process by dot blotting, it was observed that the intensity of the reactions revealed in mAb anti-6xHis, varied between the clones, which suggests that there was a difference in the amount of the expressed protein, possibly due to the variable copy-number of cassette expression integrated into each clone (Cregg et al., 1993).

The presence of the rp26 from *P. pastoris* supernatants, shown by SDS-PAGE and Western blotting confirms that the protein was secreted, and this enabled the supernatant to be used directly for diagnostic assays after careful titration (Cereghino and Cregg, 2000; Rees et al., 1999). In Western blotting, where ELISA and AGID were used, the rp26 antigen was obtained in a simple process involving supernatant clarification, concentration and dilution. In ELISA a high P/N ratio was observed, which mean that the positive and negative samples could be clearly distinguished. A unique precipitation line was viewed between the rp26 antigen and three different anti-EIAV sera (OIE reference serum, Bruch commercial kit and Biovetech) in AGID. From a careful analysis of the assay, a minimum reaction was observed that accompanied the formation of a discrete identity line between the serum and standard recombinant antigen. This shows the ability of the antigen to detect weak positive reactions. These results reaffirm the expression of rp26

in the supernatant and show that the recombinant protein has a similar immunoreactivity to native protein.

In SDS-PAGE analysis, it was possible to visualize a weak band with a molecular weight corresponding to what can be expected for the target protein. The confirmation of the rp26 protein was performed by Western blotting. However, the diagnostic tests conducted in this study suggest that these levels of proteins are more than sufficient, since both AGID and ELISA required antigen dilutions to establish optimum concentrations. The results showed clearly that rp26 was also found in immunoreactive form in supernatants and kept a minimum range of stability variation throughout the year, as was also observed in the ELISA and AGID preliminary monitoring tests (OIE, 2008).

A common problem observed in serological tests that involve an EIA diagnosis, is the nonspecific reactions (Alvarez et al., 2007a) that can cause difficulties in interpreting positive results, in particular, with ELISA. Thus, the OIE recommendation is that the positive sera in ELISA should be retested in AGID which is a highly specific test. In this study, no reaction between the equine sera and nonspecific components of the supernatant was observed in the Western blotting, AGID and ELISA assays, which confirms the qualitative aspect of the assays. As *P. pastoris* is not infectious to mammals, the problem of nonspecific reactions is avoided by using this yeast for the expression of rp26.

5. Conclusions

The *P. pastoris* expression system was shown to be capable of producing a functional EIAV p26 protein that can be used directly in the functionality tests without requiring laborious purification or recovery steps. The yield of the p26 protein production is scalable, and therefore, sufficient in view of the need for antigen dilutions in ELISA and AGID. Further studies on achieving standardization in the production of the recombinant protein will be conducted using a bioreactor, which offers better control on variables in the production such as temperature, pH and optical density, when compared with the production of flasks. Finally, the validation process for rp26 ELISA and AGID in EIA diagnosis tests, will be carried out in accordance with the principles and methods employed for validating diagnostic assays for infectious diseases recommended by OIE.

Acknowledgments

This work was sponsored by the Foundation for the Support of Science and Technology Pernambuco State (FACEPE), Research and Projects Financing (FINEP) (PAPPE – 2008; Proc APS 0338-5.05/08), and the National Council of Technological and Scientific Development (CNPQ) and Biotech. The authors would like to thank Dr Hans Aymeric from the Laboratory for Equine Disease (Maisons-Alfort, France) for supplying the OIE reference anti-EIAV serum and the Brazilian Ministry of Agriculture and Livestock for granting an import license. Some of the experiments were conducted in the Laboratory of Molecular and Experimental Therapy Studies (LEMTE) at the Federal University of Pernambuco (UFPE).

References

Alvarez, I., Gutierrez, G., Ostund, E., Barrandeguy, M., Trono, K., 2007a. Western blot assay using recombinant p26 antigen for detection of equine infectious anemia virus-specific antibodies. *Clin. Vaccine Immunol.* 14, 1616–1648.

Alvarez, I., Gutierrez, G., Vissani, A., Rodriguez, S., Barrandeguy, M., Trono, K., 2007b. Standardization and validation of an agar gel immunodiffusion test for the diagnosis of equine infectious anemia using a recombinant p26 antigen. *Ver. Microbiol.* 121, 344–351.

Archambault, D., Wang, Z., Laca, J.C., Gazit, A., Yaniv, A., Dahlberg, J.E., Tronick, S.R., 1989. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for equine infectious anemia virus detection using recombinant Pr55gag. *J. Clin. Microbiol.* 27, 1167–1173.

Birkett, A.J., Yéamos, B., Crespo, L.R., Gavilanes, F., Peterson, D.L., 1997. Cloning, expression, purification and characterization of the major core protein (p26) from equine infectious anemia virus. *Biochim. Biophys. Acta* 1339, 62–72.

Bouillant, A.M., Nielsen, K., Ruckerbauer, G.M., Samagh, B.S., Hare, W.C., 1986. The persistent infection of a canine thymus cell line by equine infectious anemia virus and preliminary data on the production of viral antigens. *J. Virol. Methods* 13, 309–321.

Bürki, F., Rossmannith, W., Rossmannith, E., 1992. Equine lentivirus, comparative studies on four serological tests for the diagnosis of equine infectious anaemia. *Ver. Microbiol.* 33, 353–360.

Cereghino, J.L., Cregg, J.M., 2000. Heterologous protein expression in the methylophilic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 45–66.

Coimbra, E.C., Gomes, F.B., Campos, J.F., D'Arc, M., Carvalho, J.C., Mariz, F.C., Jesus, A.L.S., Stocco, R.C., Beçak, W., Freitas, A.C., 2011. Production of L1 protein from different types of HPV in *Pichia pastoris* using an integrative vector. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 44, 1209–1214.

Craig, J.K., Barnes, S., Zhang, B., Cook, J.S., Howe, L., Issel, J.C., Montelaro, R.C., 2009. An EIAV field isolate reveals much higher levels of subtype variability than currently reported for the equine lentivirus family. *Retrovirology* 6, 1–12.

Cregg, J.M., Vedvick, T.S., Raschke, W.C., 1993. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *BioTechnology* 11, 905–910.

Hussain, K.A., Issel, C.J., Rwambo, P.M., Arnizaut, A.B., Ball, J.M., Schnorr, K.L., Montelaro, R.C., 1988. Identification of gag precursor of equine infectious anaemia virus with monoclonal antibodies to the major viral core protein, p26. *J. Gen. Virol.* 69, 1719–1724.

Issel, C.J., Foil, L.D., 1984. Studies on equine infectious anemia virus transmission by insects. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 184, 293–297.

Jin, Z., Jin, L., Peterson, D.L., Lawson, C.J., 1999. Model for Lentivirus capsid core assembly based on crystal dimers of EIAV p26. *Mol. Biol.* 286, 83–93.

Kong, X.K., Pang, H., Sugiura, T., Sentsui, H., Onodera, T., Matsumoto, Y., Akashi, H., 1997. Application of equine infectious anaemia virus core proteins produced in a Baculovirus expression system, to serological diagnosis. *Microbiol. Immunol.* 41, 975–980.

Leroux, C., Cadore, J.L., Montelaro, R.C., 2004. Equine Infectious Anemia Virus (EIAV): what has HIV's country cousin got to tell us? *Ver. Res.* 35, 485–512.

Lin-Cereghino, G.P., Godfrey, L., de la Cruz, B.J., Johnson, S., Khongsathiene, S., Tolstorukov, I., Yan, M., Lin-Cereghino, J., Veenhuis, M., Subramani, S., Cregg, J.M., 2006. Mxr1p, a key regulator of the methanol utilization pathway and peroxisomal genes in *Pichia pastoris*. *Mol. Cell. Biol.* 26, 883–897.

Macaulay-Patrick, S., Fazenda, M.L., McNeil, B., Harvey, L.M., 2005. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast* 22, 249–270.

Malmquist, W.A., Barnett, D., Becvar, C.S., 1973. Production of equine infectious anaemia antigen in a persistently infected cell line. *Arch. Gesamte Virusforsch.* 42, 361–370.

Montelaro, R.C., Lohrey, N., Parekh, B., Blankeney, E.W., Issel, C.J., 1982. Isolation and comparative biochemical properties of the major internal polypeptides of equine infectious anemia. *J. Virol.* 42, 1029–1038.

Morrissey, J.H., 1981. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal. Biochem.* 117, 307–310.

World Organization for Animal Health (OIE), 2008. Principles of validation of diagnostic assays for infectious diseases. *Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds and Bees)*, vol. 1.34–45 (Chapter 1.1.4).

Piza, A.S.T., Pereira, A.R., Terreran, M.T., Mozzar, O., Tanuri, A., Brandão, P.E., Richtzenhain, L.J., 2007. Serodiagnosis of equine infectious anemia by agar gel immunodiffusion and ELISA using a recombinant p26 viral protein expressed in *Escherichia coli* as antigen. *Prev. Vet. Med.* 78, 239–245.

Pokoj, S., Lauer, I., Först, K., Himly, M., Nari, A., Enrique, E., Miguel-Moncin, M.M.S., Lidholm, J., Vieths, S., Scheurer, S., 2010. *Pichia pastoris* is superior to *E. coli* for the production of recombinant allergenic non-specific lipid-transfer protein. *Protein Expr. Purif.* 69, 68–75.

Porro, D., Gasser, B., Fossati, T., Maurer, M., Brnanduardi, P., Sauer, M., Mattanovich, D., 2010. Production of recombinant proteins and metabolites in yeasts: when are these systems better than bacterial production systems? *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2, 1–10.

Rees, G.S., Gee, C.K., Ward, H.L., Ball, C., Tarrant, G.M., Poole, S., Bristow, A.F., 1999. Rat tumour necrosis factor- α : expression in recombinant *Pichia pastoris* purification, characterization and development of a novel ELISA. *Eur. Cytokine Netw.* 10, 383–392.

Reis, J.K.P., Leite, R.C., 1994. Otimização da produção e estabilização do antígeno do vírus da anemia infecciosa equina, para uso diagnóstico. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.* 46, 380–385.

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

Rossmannith, W., Horvath, E., 1989. A western blot for the serological diagnosis of equine infectious anemia. *J. Vet. Med.* 36, 49–56.

Sahdev, S., Khattar, S.K., Saini, K.S., 2008. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of existing biotechnology strategies. *Mol. Cell. Biochem.* 307, 249–264.

Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, third ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sorensen, H.P., 2010. Towards universal systems for recombinant gene expression. *Microb. Cell Fact.* 9, 27.

- Sreekrishna, K., Brankamp, R.G., Kropp, K.E., Blankenship, D.T., Tsay, J., Smith, P.L., Wierschke, J.D., Subramaniam, A., Birkenberger, L.A., 1997. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene* 190, 55–62.
- Stephens, R.M., Casey, J.W., Rice, N.R., 1986. Equine infectious anemia virus gag and pol genes: relatedness to visna and AIDS virus. *Science* 231, 589–594.
- Yang, Z., Zhang, L., Zhang, Y., Zhang, T., Feng, Y., Lu, X., Lan, W., Wang, J., Wu, H., Cao, C., Wang, X., 2011. Highly efficient production of soluble proteins from insoluble inclusion bodies by a two-step-denaturing and refolding method. *PLoS ONE* 6, 1–8.
- Zhang, W., Auyong, D.B., Oaks, J.L., Mcguire, C., 1999. Natural variation of equine infectious anemia virus Gag protein cytotoxic T lymphocyte epitopes. *Virology* 261, 242–252.

Manuscrtos publicados como co-autor:

Journal of Virological Methods 207 (2014) 226–231



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Virological Methods

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



Secretory expression of Porcine Circovirus Type 2 capsid protein in *Pichia pastoris*



Jackeline G. Silva^a, Eliane C. Coimbra^a, André L.S. Jesus^a, Filipe C. Mariz^a, Karen M.G. Silva^b, Zélia I.P. Lobato^c, Ana C. Campos^b, Luciana C.A. Coutinho^b, Roberto S. Castro^b, Antonio C. Freitas^{a,*}

^a Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

^b Department of Veterinary Medicine, Federal Rural University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

^c Department of Preventive Veterinary Medicine, Federal University of Minas Gerais, School of Veterinary Medicine, Minas Gerais, Brazil

ABSTRACT

Article history:

Received 12 November 2013

Received in revised form 23 April 2014

Accepted 15 July 2014

Available online 24 July 2014

Keywords:

Porcine circovirus

Pichia pastoris

ELISA

PMWS

Porcine circovirus type 2 (PCV2) is associated with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). The PCV2 capsid (Cap) protein is a leading antigen candidate for vaccine and serological diagnostic testing, due to its immunogenic properties. In this study, the codon-optimized PCV2 Cap gene was cloned into a pPICZαA vector for secretory expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* after methanol induction. The screening of recombinant yeasts was followed by detection of the recombinant Cap (rCap) protein by Western blot, using sera from pigs naturally infected with PCV2. The rCap secreted protein was used without prior purification as a coating antigen in the ELISA test, with high discrimination between PCV2-positive and negative sera. These results reveal a high confidence in the specific immunoreactivity of the secreted antigen and show the antigenicity of the recombinant protein. The feasibility of the *P. pastoris* expression system for the production of PCV2 Cap as secreted protein and its apparent bioactivity, suggests there are good prospects for the use of this antigen in the investigation of PCV2 infections and testing for vaccine purposes.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Porcine circovirus type 2 (PCV2) is one of the most important pathogens for swine in many countries (Gillespie et al., 2009). This virus is linked to a set of diseases known as "Porcine Circovirus Associated Diseases" (PCVAD), of which the Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) (Opriessnig et al., 2007; Rose et al., 2012) is the most important (Darwich and Mateu, 2012) and has serious economic effects on the swine industry (Marcekova et al., 2009). PCV2 is a small non-enveloped DNA virus with a circular single-stranded genome, and is member of the Circoviridae family (Allan and Ellis, 2000). The PCV2 genome consists of three open reading frames (ORF): ORF1 encodes the Rep proteins involved in viral replication, ORF2 encodes the major capsid protein (Cap) (Nawagitgul et al., 2000) and ORF3 encodes

apoptosis-inducing protein (Liu et al., 2006). The PCV2 capsid protein is the primary immunogenic protein (Mahé et al., 2000; Blanchard et al., 2003b). Due to its highly conserved epitopes and induction of a strong immune reaction against sera from PCV2-positive animals (Blanchard et al., 2003a; Wu et al., 2008), this protein has been employed in the development of vaccines and serodiagnostic assays (Patterson et al., 2008; Huang et al., 2011).

Several criteria must be taken into account when making a PMWS diagnosis (Segalés et al., 2005). For instance, it should be noted if the animal shows clinical signs of disease (such as wasting and paleness) and further histopathological lesions as well as PCV2 viral load in the lymphoid tissues (Segalés, 2012). Hence, it is essential to compile a serological profile of animals experiencing PMWS whether they have clinical signs or not (Pinto et al., 2011). Recently, several enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) have been carried out based on recombinant proteins employed as a coating antigen for detecting PCV infection (Wu et al., 2008; Júnior et al., 2009; Yin et al., 2010). The use of recombinant antigens in serological diagnosis has significant benefits because they are cheap and easy to produce, and their antigenicity can be reliably established (Wu et al., 2008).

* Corresponding author at: Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rêgo, 1235, Cidade Universitária, PO Box 50670-901, Recife, Pernambuco, Brazil. Tel.: +55 81 21268569; fax: +55 08121268522.
E-mail addresses: antonio.freitas@pq.cnpq.br, acf_ulpe@yahoo.com.br (A.C. Freitas).

In general, yeasts have been consistently employed for heterologous gene expression (Gellisen and Hollenberg, 1997; Sohn et al., 2010). The *Pichia pastoris* expression system has been widely used for the production of recombinant proteins (Schutter et al., 2009), either secreted or in an intracellular form. This system was chosen since it offers several advantages, these include the use of a strong and tightly regulated promoter derived from the alcohol oxidase I (*AOX1*) gene, the ability of the cells to be cultivated at high density and the possibility of introducing typical eukaryotic post-translational modifications in the recombinant protein (Hu et al., 2011). In addition, since *P. pastoris* secretes only a few native proteins, the purification process of the recombinant products can be assisted by employing the secretory pathway (Cregg et al., 2000).

The aim of this study was to obtain the secretory production of PCV2 capsid protein in *P. pastoris* and evaluate the functional activity of the recombinant protein with regard to its antigenic properties.

2. Materials and methods

2.1. Codon optimization of the Cap gene

The heterologous gene was designed on the basis of a sequence of PCV2 BRA1 isolates deposited in the GenBank (DQ364650.1). The PCV2 Cap sequence was synthesized with codons optimized for expression in *P. pastoris*, and a sequence encoding the polyhistidine tag (6xHis) at the C-terminal of the protein was added to allow the immunodetection of the recombinant protein. The optimized sequence was deposited in GenBank with the accession number KM210286. The online program Graphical Codon Usage Analyzer (available at <http://gcua.schoedl.de>) was used to analyze the codon usage of the heterologous gene and the host organism. The gene was synthesized by Epoch Life Science (TX, USA).

2.2. Cloning of the Cap gene in an expression vector

The codon-optimized Cap gene was digested with *XhoI* and *NotI* enzymes (New England Biolabs, MA, USA) and cloned into the pPICZαA expression vector (Life Technologies, SP, Brazil) for secretory expression in the yeast through the use of the α-factor mating secretion signal from *Saccharomyces cerevisiae*, that is present in the vector. *Escherichia coli* DH5α were transformed and the pPICZαA/rCap clones were grown in low salt LB medium (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, 2% agar) supplemented with 25 μg/mL zeocin™ (Life Technologies). The presence and orientation of the insert were analyzed by enzymatic digestion and DNA sequencing. The sequencing was performed by the dideoxy method (ABI3100 sequencer, Life Technologies), and the alignment of the sequences was carried out by the ClustalW program.

2.3. Transformation of *P. pastoris*

The recombinant plasmid (10 μg of DNA) was first linearized with the *SacI* enzyme and used to transform *P. pastoris* strain X-33, phenotype Mut+ (methanol utilization plus) by electroporation, in accordance with the manufacturer's instructions (Life Technologies). Briefly, after electroporation, the cells were transferred to a 15 mL sterile tube and incubated for 2 h at 30 °C without agitation. The efficiency of the transformation was increased by adding 1 mL of YPD to the tube, which was incubated for another 2–3 h at 30 °C under agitation. Aliquots of 10, 25 and 100 μL were taken from this material and plated on YPDS medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose, 1 M sorbitol and 2% Agar) containing 100 μg/mL zeocin and incubated at 30 °C for 5 days.

2.4. Screening of the recombinants (Colony blot and Dot blot)

The recombinants selected by zeocin were screened for rCap protein detection by Colony blot and Dot blot. In the colony blot assay, the plate with the recombinant colonies is incubated with methanol, for induction for 72 h. The PVDF membrane was laid on colonies of the transformants and incubated at 37 °C for 3 h. Following this, the membrane was washed with TTBS, blocked with 5% milk, and incubated with penta-His antibody (Qiagen, SP, Brazil) (1:1000) for 2 h at 28 °C. After further washing stage, the membrane was incubated with the anti-mouse HRP-conjugated antibody (1:2000) (Sigma–Aldrich, SP, Brazil) for 1 h. The reaction was revealed with tetramethylbenzidine (TMB) substrate solution (Sigma–Aldrich). In the case of the dot blot assays, the clones were cultivated on a small scale (5 mL) with YPD medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose) for 24 h. At the end of this period, the clones were induced for heterologous expression by the addition of methanol to a final concentration of 0.5% over a period of 72 h, at 28 °C. The supernatant was recovered and used in the dot blot assay as described by Coimbra et al. (2011) using the monoclonal anti-6xHis antibody conjugated with alkaline phosphatase (1:1000) (Sigma–Aldrich). The NTB/BCIP substrate was used for the revelation of reactions (Sigma–Aldrich).

2.5. Expression of recombinant Cap protein in *P. pastoris*

P. pastoris transformants were inoculated into 500 mL of BMGY medium (1% yeast extract, 2% peptone, 1.34% YNB, 0.002% biotin, 1% glycerol, 100 mM sodium phosphate, pH 6.0) and incubated at 28 °C for 48 h under vigorous agitation (240 rpm) to obtain biomass. For the induction of the rCap protein, the obtained biomass was centrifuged and transferred to 100 mL of BMMY medium (the same components as those of BMGY with glycerol replaced by 0.5% methanol) in 1 L flasks. Methanol was added to the culture every 24 h to a final concentration of 1%, to maintain the induction of the recombinant protein. The culture was kept at 28 °C with agitation (240 rpm) for 72 h. After this, the cells were centrifuged and the supernatants were recovered.

2.6. SDS-PAGE and Western blot assay

The proteins were concentrated with PEG (Polyethylene glycol) 6000 (10%) (Vetec Química Fina, SP, Brazil), boiled at 95 °C for 7 min in SDS-loading buffer (10% 2-mercaptoethanol, 4% SDS, 0.004% bromophenol blue, 20% glycerol, 0.125 M Tris–HCl, pH 6.8) and then separated on 12.5% SDS-PAGE gel. The gel was stained with silver nitrate. For the western blot, two aliquots of the supernatant were used. One was concentrated in PEG, and the other precipitated with 20% trichloroacetic acid (TCA) (Sigma–Aldrich) before being transferred onto PVDF membranes using a Trans-blot Semi-dry apparatus (Scie-Plas, CA, UK) at 320 mA for 1 h.

The membrane was blocked with 5% non-fat dry milk in TBS at room temperature for 1 h and then incubated with swine sera at a dilution of 1:25 at 4 °C for 1.5 h. After three washes in TBS-Tween, the membrane was incubated with peroxidase-conjugated protein G (Sigma–Aldrich) at 4 °C for 1 h. The reaction was revealed using the ECL chemiluminescent kit (GE Healthcare, SP, Brazil). The protein was quantified by means of the Bradford protein assay kit (Bio-rad, SP, Brazil).

2.7. Indirect ELISA using the rCap as antigen (rELISA)

Indirect ELISA was performed to test preliminarily the immunoreactivity of the rCap. The supernatant was dialyzed against PEG 6000 40% (w/v) in phosphate buffered saline (PBS – 0.05 M, 0.15 M NaCl), pH 7.6 through a membrane with a cut-off

of 12,000 daltons, at 4°C for 24 h. The supernatants were concentrated at 25× and used as an antigen in ELISA. A set of positive and negative sera from swine herds monitored for circovirus using an immunoperoxidase monolayer assay (IPMA) were selected for testing in ELISA. The antigen and serum concentrations were initially determined so that a significant difference could be obtained between the optical density of five positive and five negative sera, which determines the P/N ratio (OD of five positive/OD of five negative). After this standardization, the test was applied in 30 PCV2-positive and 28 PCV2-negative sera previously tested in IPMA.

Briefly, the ELISA plates were coated with rCap protein at 37 °C for 3 h. Then, each well was washed with PBS-T (PBS pH 7.4 containing 0.1% Tween-20) and blocked with non-fat dry milk for 1 h in a damp chamber. After washing with PBS-T, 100 µL of the swine sera that had previously been diluted in PBS containing 2% of non-fat dry milk and 10 mM EDTA (w/v) was added to each well and the plates were incubated. In addition, after washing with PBS-T, 100 µL of protein G-peroxidase conjugated in the PBS-T containing 2% non-fat dry milk, was added, and incubated. The plates were washed three times, and a colorimetric reaction was obtained by using substrate solution (citrate-phosphate buffer 0.1 M pH 5.0, 0.1 mg/ml TMB, 0.02% hydrogen peroxide). The reaction was stopped with 100 µL of 2 N sulfuric acid. The plates were read using an ELISA reader apparatus (Multiskan Plus, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) at a wavelength of 450 nm.

3. Results

3.1. Cloning of the Cap gene for expression in *P. pastoris*

After the modification, the mean difference between the codon usage of the PCV2 Cap gene and *P. pastoris* codon bias was reduced from 19% to 10%. A 782 bp fragment was released from the rCap/pPICZαA vector after enzymatic digestion with *Xho*I/*Not*I, which demonstrated the successful cloning of the codon-optimized PCV2 Cap gene (full length ORF2) into pPICZαA, (Fig. 1). The 4400 bp final construction was designated/named PCV2pPICZαA/rCap and was further confirmed by DNA sequencing (data not shown).

3.2. Analysis of recombinant yeasts and the detection of the rCap protein

P. pastoris recombinants were obtained after the transformation with the PCV2pPICZαA/rCap construction and a further selection was performed based on zeocin resistance. After this, the clones were screened by the immunodetection of the rCap protein by

colony and dot blot. Seven out of 35 clones analyzed showed a strong reaction in the colony blot, as seen in Fig. 2a. Three out of seven recombinant clones were more reactive in dot blot, as shown in Fig. 2b. The absence of reaction in the negative control excluded the possibility of a nonspecific reaction in the evaluated clones. A 39-kDa protein was visualized in the SDS-PAGE gel and detected by western blot using anti-PCV2 swine serum, whereas no reaction was observed in the negative control (*P. pastoris* cells transformed in the pPICZαA empty vector). These results confirmed the production of rCap protein in the supernatant of the *P. pastoris* clones (Fig. 3). The total protein quantification in the supernatant of transformed *P. pastoris* was 140 µg/mL.

3.3. rCap protein used as an antigen in indirect ELISA

Initial standardization of the ELISA indicated that the dilutions of 1:100 of the recombinant antigen, 1:20 of serum and 1:90,000 of protein G peroxidase-conjugated showed the best P/N ratio. The ELISA using the rCap presented a P/N ratio of 597. These preliminary results demonstrated that the secreted rCap protein that was used directly from the culture supernatant of *P. pastoris* is functional and able to cause a significant reaction to PCV2-positive sera in an indirect ELISA.

4. Discussion

In this study, the recombinant protein of PCV2 (rCap) was produced in *P. pastoris* in a secreted form, through the employment of a codon-optimized gene. It was also reported that the immunoreactivity of rCap was successfully maintained/confirmed when the supernatant of *P. pastoris* was subjected to reaction against sera from PCV2-infected animals in an ELISA. For this purpose, the codon-optimized PCV2 Cap gene was cloned into pPICZαA, a vector for secretory expression in *P. pastoris*, using the secretion signal (α -mating factor of *S. cerevisiae*). After the recombinant clones had been screened by colony and dot blot assays, the rCap protein was detected on SDS-PAGE and Western blot.

The detected rCap protein presented approximately 39 kDa; this was slightly higher than the estimated molecular weight for the PCV2 Cap protein (30 kDa). Glycosylation sites have been found for this protein (Hamel et al., 1998), and a variation in the protein mobility was observed when the production of the protein was compared in different recombinant systems (Bucarey et al., 2009), which may explain their different sizes. Nevertheless, the results presented here are in agreement with those of Tu et al. (2012), which found the PCV2 cap protein in a similar molecular weight.

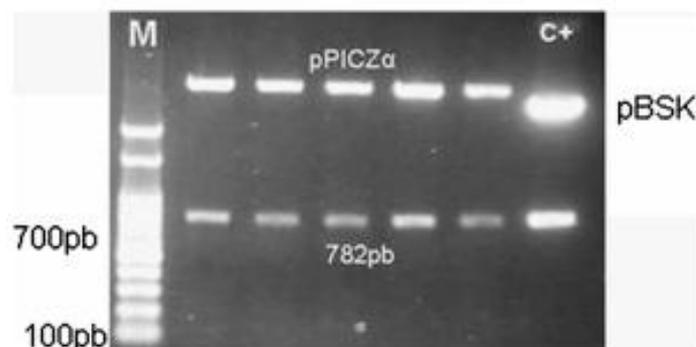


Fig. 1. Enzymatic digestion of the PCV2pPICZαA/rCap construction. The reaction resulted in the release of the cap gene with 782 bp; this is visualized on 1% agarose gel. Lane M: 100-bp DNA ladder (Ludwig Biotech); C+ vector pBlueScript SK containing the codon-optimized PCV2 capsid gene.

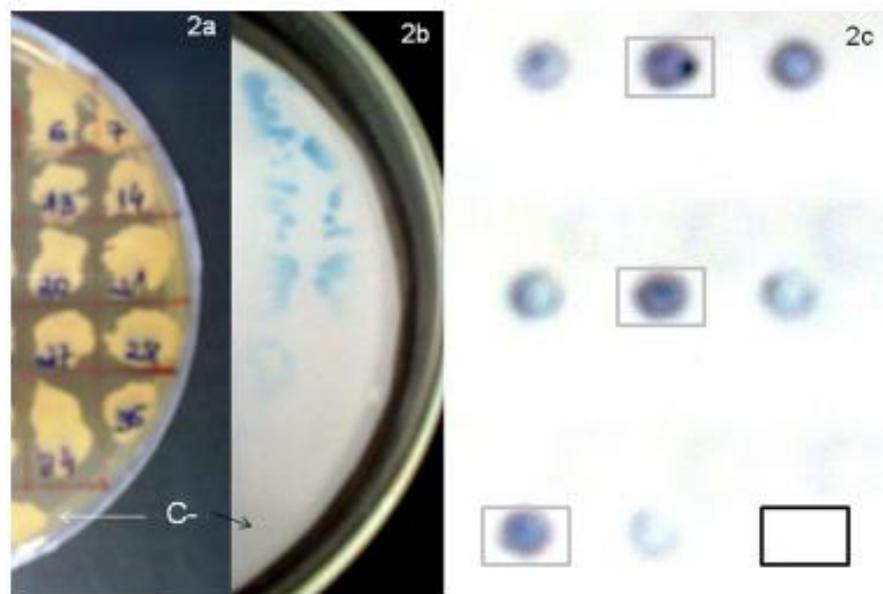


Fig. 2. Screening of the recombinant yeasts. In Fig. 2a, there is a representation of the colonies of recombinant *P. pastoris* selected by zeocin in YPD plates; In Fig. 2b the PVDF membrane revealed a specific reaction by using the penta-His antibody; In Fig. 2c, there is a Dot Blot assay which uses a supernatant after induction of 72 h to verify the expression of the rCap protein. Positive reactions (gray box) and the absence of reaction in the negative control (black box); (C-): *P. pastoris* transformed pPICZα empty vector.

Each expression system has its benefits and drawbacks (Wurm, 2004; Kost et al., 2005). Some authors have reported that *E. coli* expression system is not suitable for expressing the PCV2 capsid gene (Zhou et al., 2005; Trundova and Celer, 2007). The reason is that this system requires a degree of optimization which can be achieved by removing the N-terminal domain of the Cap protein which provides the nuclear localization signal (NLS) (Yin et al., 2010). However it is recognized that this sequence represents an important domain for the formation of the inner surface of the virion (Lekcharoensuk et al., 2004; Wu et al., 2012). Alternatively, the expression of rCap protein in eukaryotic systems, such as yeast

(*S. cerevisiae*), insect cells and mammalian cells has been used successfully (Fan et al., 2007; Bucarey et al., 2009; Júnior et al., 2009). However, yeast cultures are easy to maintain, which makes them faster and less expensive to use than other eukaryotic expression systems.

The *P. pastoris* system has been widely used for recombinant protein production, since it has a folding capacity similar to that of mammals (Schutter et al., 2009), and the production of short-chain N-linked oligosaccharides (Kang et al., 1998). Bucarey et al. (2009) reported that to produce the PCV2 Cap protein in *S. cerevisiae* was necessary to optimize the gene, suggesting that the

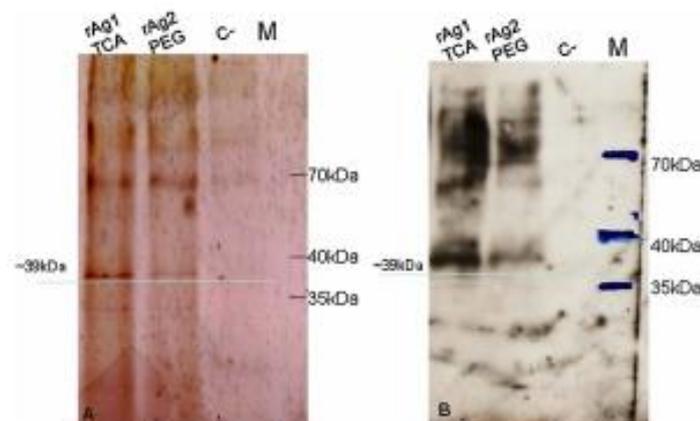


Fig. 3. SDS-PAGE and Western Blotting of recombinant *P. pastoris* secreting PCV2 Cap protein. (A) Recombinant protein (rCap) with molecular mass of about 39 kDa, analyzed by polyacrylamide gel stained by silver nitrate. Lane M: Pager Ruler Prestained Protein Ladder (Thermo); Lane 1 (rAg1): TCA-concentrated supernatant; Lane 2 (rAg2): concentrated supernatant with PEG; C-: *P. pastoris* transformed pPICZα empty vector. (B) Detection of the recombinant antigen (rAg), with molecular mass of about 39 kDa, using sera from pigs infected with PCV2. Lane M: Pager Ruler Prestained Protein Ladder (Thermo); Lane 1 (rAg1): TCA-concentrated supernatant; Lane 2 (rAg2): concentrated supernatant with PEG; C-: *P. pastoris* transformed pPICZα empty vector.

codon usage derived from the wild Cap gene negatively affects the metabolism of the yeast. In view of this, in this study, the Cap gene was codon-optimized for expression in *P. pastoris*, and the codon usage frequency between the Cap gene and the yeast *P. pastoris* was reduced from 19% to 10% after the codon optimization.

To date, Tu et al. (2012) represent the only work that describes the expression of the PCV2 Cap gene in *P. pastoris*, but in contrast with this study, the authors failed to detect the protein in the supernatant. According to the authors, the NLS domain present in the N-terminal region of the protein may have caused a tragic effect on its export. The results described here contradict this hypothesis, since it was not necessary to produce a truncated Cap protein for its secretion and function in *P. pastoris*. The rCap presented perfect integrity and antigenicity in immunoassays, indicating an effective feature when tested against PCV2-positive sera in Western blot and ELISA.

It is fair to say that other studies have reported difficulties in secreting certain proteins in *P. pastoris* (Resina et al., 2005; Gasser et al., 2006, 2007). According to Lin-Cereghino et al. (2013), *P. pastoris* is often unable to secrete some proteins for a number of reasons, for example, the recombinant proteins may be retained in the ER or Golgi apparatus, which greatly decreases the secretion level of the foreign protein. However, similar to this work, other works showed the ability of *P. pastoris* to secrete heterologous proteins (Outchkourov et al., 2002; Han et al., 2004; Coutinho et al., 2013).

After the concentration of recombinant antigen with PEG, the rCap protein was used directly in ELISA without cell lyses or chromatographic purification procedure. This facility shows a practical application for the low-cost recombinant antigen that was produced, and another advantage of the *P. pastoris* expression system in being able to secrete foreign proteins in a relatively pure form, without the need for laborious procedures for the recovery of a biologically active protein.

These preliminary data open up perspectives for the use of *P. pastoris* for the production of the rCap antigen on a larger scale in order to develop serological tests or immunization strategies for prevention of PCV infection.

5. Conclusion

In the present work, PCV2 capsid protein was successfully produced and secreted for recombinant *P. pastoris* after methanol induction. An immunoassay using PCV2-positive sera showed optimum functionality for the rCap protein and it is expected that future strategies will be employed to establish serological tests or vaccines for porcine circoviruses.

Acknowledgments

The authors acknowledge the collaboration of Dr. Clara Nilce Barbosa from Department of Veterinary Medicine, Federal Rural University of Pernambuco, Brazil. This work received the financial support of Brazilian Agencies CAPES (Edital PRODOC/2007).

References

Allan, G.M., Ellis, J.A., 2000. Porcine circoviruses: a review. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12, 3–14.

Blanchard, P., Mahé, D., Cariolet, R., Keranflech, A., Baudouard, M.A., Cordioli, P., Albina, E., Jestin, A., 2003a. Protection of swine against post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) by porcine circovirus type 2 (PCV2) proteins. *Vaccine* 21, 4565–4575.

Blanchard, P., Mahé, D., Cariolet, R., Truong, C., Dimna, M.L., Arnaud, C., Rose, N., Eveno, E., Albina, E., Madec, F., Jestin, A., 2003b. An ORF2 protein-based ELISA for porcine circovirus type 2 antibodies in post-weaning multisystemic wasting syndrome. *Vet. Microbiol.* 94, 183–194.

Bucarey, S.A., Noriega, J., Reyes, P., Tapia, C., Sáenz, L., Zufiga, A., Tobar, J.A., 2009. The optimized capsid gene of porcine circovirus type 2 expressed in yeast forms virus-like particles and elicits antibody responses in mice fed with recombinant yeast extracts. *Vaccine* 27, 5781–5790.

Coimbra, E.C., Gomes, F.B., Campos, J.F., D'Arc, M., Carvalho, J.C., Mariz, F.C., Jesus, A.L.S., Stocco, R.C., Bejak, W., Freitas, A.C., 2011. Production of L1 protein from different types of HPV in *Pichia pastoris* using an integrative vector. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 44, 1209–1214.

Coutinho, L.C.A., Jesus, A.L.S., Fontes, K.F.L.P., Coimbra, E.C., Mariz, F.C., Freitas, A.C.F., Maia, R.C.C., Castro, R.S., 2013. Production of Equine Infectious Anemia Virus (EIAV) antigen in *Pichia pastoris*. *J. Virol. Methods* 191, 95–100.

Cregg, J.M., Cereghino, J.L., Shi, J., Higgins, D.R., 2000. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol. Biotechnol.* 16, 23–52.

Darwich, L., Mateu, E., 2012. Immunology of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Res.* 164, 61–67.

Fan, H., Ju, C., Tong, T., Huang, H., Lv, J., Chen, H., 2007. Immunogenicity of empty capsids of porcine circovirus type 2 produced in insect cells. *Vet. Res. Commun.* 31, 487–496.

Gasser, B., Maurer, M., Gach, J., Kunert, R., Mattanovich, D., 2006. Engineering of *Pichia pastoris* for improved production of antibody fragments. *Biotechnol. Bioeng.* 2, 353–361.

Gasser, B., Maurer, M., Rautio, J., Sauer, M., Bhattacharyya, A., Saloheimo, M., Penttilä, M., Mattanovich, D., 2007. Monitoring of transcriptional regulation in *Pichia pastoris* under protein production conditions. *BMC Genom.* 8, 1–18.

Gellisen, G., Hollenberg, P.C., 1997. Application of yeasts in gene expression studies: a comparison of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* and *Kluyveromyces fragilis* – a review. *Gene* 190, 87–97.

Gillespie, J., Opiessnig, T., Meng, X.J., Pelzer, K., Buechner-Maxwell, V., 2009. Porcine circovirus type 2 and porcine circovirus-associated disease. *J. Vet. Intern. Med.* 23, 1151–1163.

Hamel, A.L., Lin, L.L., Nayar, G.P.S., 1998. Wasting syndrome in pigs associated with postweaning multisystemic. *J. Virol.* 72, 5262–5267.

Han, X., Bartlam, M., Jin, Y.-h., Liu, X., He, X., Cai, X., Xie, Q., Rao, Z., 2004. The expression of SARS-CoV M gene in *P. pastoris* and the diagnostic utility of the expression product. *J. Virol. Methods* 122, 105–111.

Huang, L., Lu, Y., Wei, Y., Gao, L., Liu, C., 2011. Development of a blocking ELISA for detection of serum neutralizing antibodies against porcine circovirus type 2. *J. Virol. Methods* 171, 26–33.

Hu, F., Li, X., Mao, P.H., Jin, X., Rao, B., Zheng, P., Zhou, Y.L., Sheng, Y.L., Ke, T., Ma, L.X., 2011. A visual method for direct selection of high-producing *Pichia pastoris* clones. *BMC Biotechnol.* 11, 23.

Júnior, A.S., Castro, L.A., Neto, D.C., Silva, F.M.F., Vidigal, P.M.P., Moraes, M.P., Almeida, M.R., 2009. Development and evaluation of a recombinant DNA vaccine candidate expressing porcine circovirus 2 structural protein. *Pesq. Vet. Bras.* 29, 76–82.

Kang, H.A., Sohn, J.H., Choi, E.S., Chung, B.H., Yu, M.H., Rhee, S.K., 1998. Glycosylation of human α_1 -antitrypsin in *Saccharomyces cerevisiae* and methylotrophic yeasts. *Yeast* 14, 371–381.

Kost, T.A., Condreay, J.P., Jarvis, D.L., 2005. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* 23, 567–575.

Lekcharoensuk, P., Morozov, I., Paul, P.S., Thangthumnyom, N., Wajjwalku, W., Meng, X.J., 2004. Epitope mapping of the major capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) by using chimeric PCV1 and PCV2. *J. Virol.* 78, 8135–8145.

Lin-Cereghino, G.P., Stark, C.M., Kim, D., Chang, J., Shaheen, N., Poerwanto, K., Agari, K., Mousa, P., Low, L.K., Tran, N., Huang, A.D., Nattestad, M., Oshiro, K.T., Chang, J.W., Chavan, A., Tsai, J.W., Lin-Cereghino, J., 2013. The effect of a factor secretions signal mutations on recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Gene* 519, 311–317.

Liu, J., Chen, L., Du, Q., Chua, H., Kwang, J., 2006. The ORF3 protein of porcine circovirus type 2 is involved in viral pathogenesis in vivo. *J. Virol.* 80, 5065–5073.

Mahé, D., Blanchard, P., Truong, C., Arnaud, C., Cann, P.L., Cariolet, R., Madec, F., Albina, E., Jestin, A., 2000. Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes. *J. Gen. Virol.* 81, 1815–1824.

Marcelova, Z., Psikal, I., Kosinova, E., Benada, O., Sebo, P., Bumba, L., 2009. Heterologous expression of full-length capsid protein of porcine circovirus 2 in *Escherichia coli* and its potential use for detection of antibodies. *J. Virol. Methods* 162, 133–141.

Nawagitgul, P., Morozov, I., Bolin, S.R., Harms, P.A., Sorden, S.D., Paul, P.S., 2000. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *J. Gen. Virol.* 81, 2281–2287.

Opiessnig, T., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2007. Porcine circovirus type 2-associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *J. Vet. Diagn. Invest.* 19, 591–615.

Outchkourov, N.S., Stiekema, W.J., Jongasma, M.A., 2002. Optimization of the expression of equistatin in *Pichia pastoris*. *Protein Express. Purif.* 24, 18–24.

Patterson, A.R., Johnson, J., Ramamoorthy, S., Meng, X.-J., Halbur, P.G., Opiessnig, T., 2008. Comparison of three enzyme-linked immunosorbent assays to detect Porcine circovirus-2 (PCV-2) – specific antibodies after vaccination or inoculation of pigs with distinct PCV-1 or PCV-2 isolates. *J. Vet. Diagn. Invest.* 20, 744–751.

Pirro, F.F., Gerber, P.F., Oliveira, T.M.J., Borges, I.A., Lobato, Z.L.P., 2011. Serological profile, viremia and PCV2 shedding in naturally infected pigs of herds with or without postweaning multisystemic wasting syndrome. *Pesq. Vet. Bras.* 31, 17–22.

- Resina, D., Cos, O., Ferrer, P., Valero, F., 2005. Developing high cell density fed-batch cultivation strategies for heterologous protein production in *Pichia pastoris* using the nitrogen source-regulated FLD1 promoter. *Biotechnol. Bioeng.* 91, 760–767.
- Rose, N., Opriessnig, T., Grasland, B., Jestin, A., 2012. Epidemiology and transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Res.* 164, 78–89.
- Segalés, J., 2012. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus Res.* 164, 10–19.
- Segalés, J., Allan, G.M., Domingo, M., 2005. Porcine circovirus diseases. *Anim. Health Res. Rev.* 6, 119–142.
- Schutter, K., Lin, Y.-C., Tiels, P., Hecke, A.V., Glinka, S., Weber-Lehmann, J., Rouze, P., Van de Peer, Y., Callewaert, N., 2009. Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. *Nat. Biotechnol.* 27, 561–567.
- Sohn, S.B., Graf, A.B., Kim, T.Y., Gasser, B., Maurer, M., Ferrer, P., Matranovich, D., Lee, S.V., 2010. Genome-scale metabolic model of methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and its use for in silico analysis of heterologous protein production. *Biotechnol. J.* 5, 705–715.
- Trundova, M., Celer, V., 2007. Expression of porcine circovirus 2 ORF gene requires codon optimized *E. coli* cells. *Virus Genes* 34, 199–204.
- Tu, Y., Wang, Y., Wang, G., Wu, J., Liu, Y., Wang, S., Jiang, C., Cai, X., 2012. High-level expression and immunogenicity of a porcine circovirus type 2 capsid protein through codon optimization in *Pichia pastoris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 2867–2875.
- Wu, P.-C., Chien, M.-S., Tseng, Y.-Y., Lin, J., Lin, W.-L., Yang, C.-W., Huang, C., 2008. Expression of the porcine circovirus type 2 capsid protein subunits and application to an indirect ELISA. *J. Biotechnol.* 133, 58–64.
- Wu, P.-C., Lin, W.-L., Wu, C.M., Chi, J.N., Chien, M.S., Huang, C., 2012. Characterization of porcine circovirus type 2 (PCV2) capsid particle assembly and its application to virus-like particle vaccine development. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95, 1501–1507.
- Wurm, F.M., 2004. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* 22, 1393–1398.
- Yin, S., Sun, S., Yang, S., Shang, Y., Cai, X., Liu, X., 2010. Self-assembly of virus-like particles of porcine circovirus type 2 capsid protein expressed from *Escherichia coli*. *Virology* 7, 2–5.
- Zhou, J.-Y., Shang, S.-B., Gong, H., Chen, Q.-X., Wu, J.-X., Shen, H.-C., Chen, T.-F., Guo, J.-Q., 2005. In vitro expression, monoclonal antibody and bioactivity for capsid protein of porcine circovirus type 2 without nuclear localization signal. *J. Biotechnol.* 118, 201–211.

Capítulo publicado no livro *Cervical Cancer: Screening Methods, Risk Factors and Treatment Options* (ISBN: 978-1-62948-062-6)

Chapter

TREATMENT OF CERVICAL DISEASE: REVIEW OF THE CURRENT DATA

AC Freitas, ALS Jesus and FC Mariz

Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Brazil

ABSTRACT

Persistent infection involving oncogenic Human Papillomavirus (HPV) types, is the most common sexually transmissible disease and is associated with 5% of all cancers in people of both sexes. Although efficient, the currently licensed anti-HPV vaccines do not have therapeutic potential to treat established lesions. Other immunizing approaches directed to the E6 and E7 viral oncoproteins, have been tested with varying degrees of success to stimulate immune responses to the regression of pre-malignant and malignant lesions. On the other hand, the current therapeutic treatment is not virus-specific and consists of the physical removal of the lesions or the induction of inflammatory responses to cause the regression of established lesions. Hence, recently attempts have been made to identify and characterize the potential molecular antagonists against the viral proteins and their respective cellular targets. The use of lead compounds, which can disturb the viral replication, as well as the inhibitors of the viral carcinogenesis, have proved to be an attractive approach due to their high affinity and specificity. However, these studies are still in their early stages and it is unlikely that new anti-HPV chemotherapeutic agents can be developed for clinics in the next 10-20 years.

Keywords: Cervical cancer, HPV, therapies

INTRODUCTION

It is estimated that 5% of all human cancers are caused by HPV infection [1]. Together with cervical intraepithelial lesions of all grades and warts, this scenario represents a huge burden to the health services [2].

Since 2008, two prophylactic vaccines have been licensed to provide protection against HPV. Both have high efficacy against HPV-16 and -18 [3, 4], which are the most common viral types linked to cervical cancer [5], and have the potential to prevent 70% of carcinomas and 90% of genital warts in the next 10-20 years [6].

However, the estimated impact of these vaccines may be compromised due their high costs which prevent them from being available in developing countries, where more than 80% of deaths result from HPV infection [5]. In other words, a large section of the unvaccinated public will still be affected by HPV-related diseases and, thus high priority must be given to producing virus-specific therapies.

The objective of the treatment against HPV clinical infection is the removal of the clinically-visible disease through the destruction of condyloma by physical removal or by the induction of inflammatory responses [2]. Since these alternatives are not virus-specific, these therapeutic approaches have had varying degrees of success [7]. Hence, a great effort has been made to identify and characterize molecules that might be antagonistic to HPV proteins and their cellular targets so that anti-HPV drugs can be produced. However, these studies are still at an early stage and it is unlikely that a chemotherapeutic agent against cervical cancer be developed for clinical use in the next 10-20 years [2].

THE TREATMENT OF HPV-RELATED LESIONS: WHAT MAKES IT DIFFICULT?

The Infectious Cycle X the Host Immunity against HPV

Although the suggestion that HPV plays a role in cervical carcinogenesis was first proposed three decades ago [8], there has been slow progress in the development of effective anti-HPV therapies, largely due to the difficulty of conducting studies into the biology and pathogenesis of HPV, which possess a unique and complex replication cycle [2].

HPV has access to the basal keratinocytes of the stratified squamous epithelium through micro-lesions and/or micro-abrasions. The small viral genome - 8 kb double-stranded DNA - has 8 ORFs (open-reading frames), six of which encode non-structural and early proteins (E1, E2, E4, E5, E6 and

E7), while the other two remaining ORFs encode structural or late proteins (L1 and L2) [9]. The gene expression pattern of the virus depends on epithelial differentiation and occurs through a complex network of events involving splicing sites within the virus genome [10].

There are no easily handled animal models for HPV infection and the experimental reproduction of the viral life-cycle can only be achieved by *in vivo* culture systems, which are technically demanding, extremely complex and only capable of producing small amounts of infectious viral particles [11].

As a result of a number of sequential stages, the first sign of cervical carcinogenesis is the HPV infection, but its progress mainly depends on the persistence of this infection [12]. In this context, despite the immunity of the female genital tract, HPV is highly adapted to its host, which allows the persistence of infection. Although they are entirely intraepithelial, HPV infections occur in "privileged" sites in which the number of antigen-presenting cells (APCs), which are basically Langerhans cells (LC), is significantly reduced [13, 14]. In addition, the intraepithelial non-lytic cycle is able to prevent the stimulation of molecular signals which are essential for the immune response, such as those that lead to the production of pro-inflammatory cytokines that result in the migration of APCs [15, 16].

Apart from causing the transformation of infected cells, viral oncoproteins also assist viral evasion of the immune system. The combined action of E5 and E6 proteins has a significant effect on the recognition of infected cells by the immune cells, either by inhibiting contact between infected and immune cells [17], down-regulating MHC/HLA-I [18-23], or preventing an appropriate molecular signaling being employed for the immune system, such as the inhibition of cytokine expression [24, 16, 21].

Another complication of HPV infection is viral latency. This phenomenon is characterized by an infection that is restricted to the basal keratinocytes because the viral genome is maintained in episomal form which significantly lowers the expression of the viral proteins [25]. Latent infection is kept under control by a responsive immunological memory [26], but does not necessarily result in viral clearance [27]. These lesions are unlikely to recur in immunocompetent individuals, but possible factors suppressing the immune system can allow viral reactivation and lesion formation [25, 28].

A correct understanding of this scenario is of great importance for the development of therapeutic strategies against HPV-induced lesions. As a means of bypassing the viral evasion mechanisms and activating effective responses, the most promising approaches to immunization have explored different ways of effectively introducing viral oncoprotein- based antigens to the immune system. However, as these strategies are still in the early stages of being tested, the current therapeutic options consist of ablative therapies or are based on cytotoxic agents, as will be shown in the following sections.

CURRENT THERAPEUTIC ALTERNATIVES

Why to Treat, When to Treat and How to Treat?

The vast majority of individuals are able to react against HPV and eliminate viral infection. However, there are a few infected individuals that cannot combat the virus; some of them develop clinical lesions and will be further submitted to the treatment that is currently available; others will remain infected although without HPV-related diseases [29, 30]. Since there is no virus-specific therapy for HPV, the treatment against human papillomatosis is based on an attempt to eliminate lesions which might lead to cancer in association with the stimulus of the immune response in order to resolve the viral infection. Furthermore, as they represent a sexually transmissible disease, the elimination of HPV-related lesions is a means of preventing viral dissemination. It is up to the doctor to assess the need for treatment and which therapeutic option is most suitable, in the light of the following factors: confirmation of virus presence, the type of infecting virus (whether low or high risk), characteristics of the lesions (whether localized or disseminated), the type of infection (clinical, subclinical or latent) [31].

When deciding on the most appropriate treatment the following factors should be taken into account [31]:

1. **A molecular biology diagnosis carried out through a genital swab.** This kind of diagnosis can reveal the presence of viral DNA although it does not specify the existence and/or location of the lesions, or their characteristics (size, extent etc). It is thus necessary to submit the patient to genitoscopy to carry out a proper mapping of the lesions. In cases where the findings of the research are HPV-positive through the use of a swab without any association with clinically lesions, the patient may be latently infected. As a result, there is no confirmation regarding either whether it might lead to transmission of the disease or if there are any therapeutic indications.
2. **The examination by genital swab is HPV-negative.** In this case, there is no certainty that the patient is not infected with HPV due to the possible presence of keratinized or old genital lesions, which have a small amount of viral DNA but might permit viral transmission. It is necessary to establish the presence of these lesions to avoid an erroneous diagnosis which might suggest that there is no need for treatment.
3. **Treatment of clinical lesions.** It is not uncommon to observe warty lesions, called satellite lesions, which are only detectable by genitoscopy. Likewise, there are significant papular lesions which are only visible upon application of acetic acid and further examination with magnification (usually resulting from infection involving high-risk types). These situations may explain, for example, why cases are sometimes wrongly assessed as recurrence, when in

fact they represent intraepithelial lesions that have been incorrectly located and treated in an inappropriate way.

4. **Diagnosis by genitoscopy (colposcopy).** This is the most suitable approach for allowing the correct mapping of lesions and evaluating their characteristics, such as size, location and extent.

For this reason, common sense should prevail when planning the treatment schedule. Radical decisions – which are only favorable for the treatment of clinical lesions or, alternatively, which proposes the treatment of all clinical and subclinical cases, as well as the need to take preventive treatment based on topical preparations – should not be recommended. The effectiveness of current available therapies depends on this analysis, since the alternative forms of treatment can lead to excellent results or be contraindicated, depending on the nature of the HPV infection.

Table 1. The alternative forms of treatment for intra-epithelial lesions caused by HPV are categorized by levels of clinical recommendation. Adapted from American Society for Colposcopy and Cervical Pathology [94].

Category	Method	Mechanism of action	Efficacy rate	Recurrence rate
First line	Imiquimod 5%	Immunomodulatory	72-84%	5-19%
	Podophyllotoxin	Cytotoxic agent	45-88%	31-60%
	Cryotherapy	Ablative/excisional	68-90%	38%
Second line	Laser therapy	Ablative/excisional	27-82%	7-72%
	Electrosurgery	Ablative/excisional	70-80% *	25-39% *
Other therapies	TCA	Cytotoxic agent	70-81%	30-60% **
	Interferon	Immunomodulatory	32-60% (intralesional)	65-67%
			17-21% (systemic)	Non reported
	Polyphenon E	Immunomodulatory	53.6%	6.8%

* Maw, 2004 [38].

** de Carvalho, 2005 [31]

Another important factor is the progress of the treatment, with regard to the frequency with which recurrence occurs associated with exuberant lesions. This means that, treatment should be more intensive and bring together the different therapeutic options at an early stage.

Table 1 categorizes the alternative forms of treatment for the intraepithelial lesions in accordance with clinical recommendations. In the following section, these therapies will be discussed in the light of the methods employed: non-surgical treatment, ablative/excisional treatment, immunomodulators and combination therapy.

Non-Surgical Treatment

Topical preparations based on cytotoxic agents result in cell death through contact, either by antiproliferative or chemidestructive action, regardless of viral status [2]. The use of podophyllotoxin as a solution or cream is the first line of treatment for genital warts and promotes the destruction of verrucous lesions without major alterations to the normal skin [31, 32]. The resulting necrotic action is thought to be based on its ability to bind to the microtubule proteins with subsequent cell cycle arrest in metaphase [2]. The disadvantages of using podophyllotoxin in therapy include systemic absorption, potential mutagenic action in the epithelium and the recurrence of the condition in 65% of cases. Furthermore, bone marrow suppression, liver disorders and neurological impairment have been reported [33-35]. An alternative treatment is the topical use of trichloroacetic acid (TCA) which involves a local caustic and keratolytic activity that causes corrosion of warts without serious systemic effects [32]. TCA is as effective as podophyllotoxin, although it has drawbacks such as the ulceration of adjacent normal areas, dermal abrasions and secondary infections [31, 32]. As in the case of podophyllotoxin, the rate of recurrences may reach 60% [31].

Ablative/Excisional Therapies

Currently ablative or excisional therapies represent the vast majority of anti-HPV therapeutics for genital lesions [36], which include cryotherapy, excision by scalpel or scissors (also called cold surgery), laser therapy and electro-surgery [31, 37]. These methods are suitable for treating lesions at any site. In the presence of intraepithelial neoplasia, the procedure that is most widely recommended is conization (designation resulting from the conical shape of the removed tissue) or loop electrosurgery (LOOP). The latter, together with cryotherapy and laser therapy, employ physical ablative methods – i.e. the application of extreme heat or freezing for epidermal, dermal and vascular damage, leading to the induction of an effective inflammatory response [31, 32] – which generally offer a highly effective form of protection in the short term, with the disappearance of 70-80% of the lesions [38]. In general, cryotherapy assists the treatment of large or grouped lesions, while laser therapy has beneficial cosmetic results by allowing rapid healing without forming scars [32].

The main drawback is the recurrence rate which can reach almost 40% of cases [38], although the procedures entail the removal of a safety margin of 3-5 mm of healthy tissue beyond the injured area [31]. Alternative treatment in cases of exuberant lesions include the excision of lesions with cold surgery followed by the application of laser therapy in the wound bed, a method which results in a lower recurrence rate [31]. In addition, intraepithelial lesions are often multifocal, which makes the ablation procedure impractical or ineffective [39].

Immunomodulators

The treatment of genital warts based on immunomodulatory agents is able to assist in stimulating an innate immune response. The polyphenon E, or sinecatechins, is an extract obtained from the tea leaves of *Camellia sinensis* administered as a topic ointment. It has an effect on the regression of warty lesions because of the epigallocatechin gallate molecule, which operates under different signaling pathways, and induces apoptosis via caspase activation and inhibition of telomerase [40, 41].

Imiquimod is a topical drug that is capable of inducing the secretion of pro-inflammatory cytokines, interleukins and type I interferons (IFN-I), through its agonist action on the toll-like receptor 7 in macrophages, dendritic cells and keratinocytes [42, 32]. Immunomodulation which is based on the secretion of IFN has integral action on the resolution of warty lesions and also indirectly carries out an antiviral activity [43, 44]. Thus, in addition to its proven efficacy and safety, the use of imiquimod leads to reduced recurrence rates (12%) [45].

However, special attention should be paid to imiquimod and other agents that induce immune responses based on IFN-I. It has been reported that treatment of intraepithelial lesions infected with high risk HPV through the use of IFN- α and IFN- β is highly effective in cells containing the viral DNA in episomal form, by arresting growth and inducing the loss of episomes, but no effect has been reported on cells that are carriers of integrated viral DNA [24, 46]. As a result, repeated use of preparations that can produce high local concentrations of IFN-I may result in the selection of cells containing integrated HPV DNA that allow the disease to become malignant [2].

Combination Therapy

It should be stressed that none of the available therapies is superior to the others and there is no ideal treatment for all cases. Other factors apart from those already discussed with regard to the treatment schedule, should also be taken into account: the cost of treatment and its practicality, side effects and the professional experience of the medical staff. Some patients require a series of treatment sessions rather than just one and, in this respect, the therapeutic modality should be changed if the patient has not made substantial improvement after a complete course of treatment (most genital warts respond within 3 months of therapy) or if side effects are severe [47].

Although relatively recent, the studies which have assessed the effectiveness of combined therapy for the treatment of genital warts have shown promising results. Combination therapy, which generally establishes the association between cytotoxic and immunomodulator modalities, represents an interesting alternative for the treatment of patients with both recurrent and new warty lesions. The recurrence rates observed from a comparison of 5% imiquimod monotherapy, surgical excision of residual warts after partial response to treatment with imiquimod and surgical treatment alone, were respectively: 15% (after 17 months), 20% (after 19 months) and 65% (after 5

months) [48]. Similarly, the use of imiquimod after laser therapy for treatment of genital condylomas has shown recurrence of lesions in only 7.3% of patients (138) [49].

Finally, better therapeutic results can be achieved even in cases where distinct therapies are combined, but with the same purpose (for example, by combining two cytotoxic methods). The remission rates of genital warts (new or recurrent) that were observed from a comparison between the employment of 25% podophyllin, TCA, cryotherapy, TCA/podophyllin or cryotherapy/podophyllin were, respectively, 82.1%, 84.5%, 92.4%, 94% and 100% [50]. In addition, fewer sessions were needed for the complete remission of warts among patients undergoing the combination therapy in comparison with those submitted to monotherapy [50].

Special attention should be paid to the fact that the concomitant use of imiquimod and cytotoxic agents is not recommended because of the risk that it might exacerbate the inflammatory processes [51].

Special Situations

A rapid growth of friable genital warts has been observed in pregnant women, probably as a result of the higher serum levels of steroid hormones – which act as cofactors in the epithelial proliferation of HPV [52-55] – and the relative state of maternal immunosuppression which is peculiar to this physiological condition [31]. Large or extensive lesions can cause obstruction of the birth canal, laceration of tissue and/or profuse bleeding during vaginal delivery. Thus, treatment of genital warts should be performed during pregnancy to reduce the risk of obstetric and/or neonatal complications, as well as some unforeseen discomfort caused to the mother [31]. The third trimester is considered to be the ideal period for the treatment of infection since at this time there is a lower risk of recurrence [56].

Table 2. Therapies currently available for the treatment of genital warts and their recommended application during pregnancy and puerperal period. Adapted from Maluf & Perin, 2005 [7].

Method	Mechanism of action	Safety during pregnancy	Safety during breastfeeding
Podophylotoxin	Cytotoxic agent	Unknown	Contra-indicated
TCA	Cytotoxic agent	Yes	Indicated
Imiquimod 5%	Immunomodulatory	Unknown	Contra-indicated
Cryotherapy	Ablative/excisional	Yes	Indicated
Electrosurgery	Ablative/excisional	Yes	Indicated
Laser therapy	Ablative/excisional	Yes	Indicated
Interferon	Immunomodulatory	No	Contra-indicated

The use of podophyllotoxin and imiquimod is contra-indicated during pregnancy (Table 2). Although the teratogenic potential of podophyllotoxin has not been confirmed for humans, this cytotoxic agent has been classified as category C by the FDA (Food and Drug Administration). The reason for this is its potential absorption and toxicity to the fetus, since it has neuro and myelotoxicity, as already reported [32, 57]. The administration of imiquimod during pregnancy is also classified as category C by the FDA because there have been no clinical trials conducted with pregnant women with this drug. Even though the teratogenic effects of imiquimod are unknown, it should only be prescribed during pregnancy in cases where its benefits outweigh the possible risk to the fetus [31].

The treatment of genital warts in HIV-infected patients should follow the same line of reasoning. Attention must be paid, however, to immunocompromised patients since their warty lesions have more serious features (they are larger and more numerous), they are not responsive to therapy and there are more frequent recurrences [58, 59]. The use of imiquimod in immunosuppressed patients is safe, although in some circumstances the use of combined therapy is needed to achieve better results and a longer disease-free period [60-63].

PERSPECTIVES ON NEW FORMS OF TREATMENT

Specific therapies against HPV infection are able to treat both non-apparent infections and visible clinical diseases. These antiviral drugs are the only alternative, for a significant section of the population who are already infected with HPV, and comprise immunosuppressed individuals, who cannot be treated by immunotherapy. In addition, multifocal genital lesions are not sensitive to ablative therapy and do not respond to immunotherapy [2].

The challenges for the development of anti-HPV drugs are proportional to their degree of effectiveness. Papillomaviruses only encode one enzyme, E1 helicase, which considerably constrains the adoption of traditional approaches. The other early genes E2, E4, E5, E6 and E7 act through molecular interactions with DNA and proteins of the host cell, but these interactions have not been suitably characterized for drug design or the identification of candidate molecules [2].

Targeting the Replication of HPV

The replication of the HPV genome is dependent upon E1 and E2 protein interaction [64, 65] in the viral origin of replication (*ori*) [66]. Once the E1-E2 complex is assembled, these proteins recruit the

DNA polimerase α to the *ori* for the initiation of viral DNA replication [67]. However, the assembly of this complex is sequential and depends on the binding of ATP to E1 [68], which is a helicase with ATPase activity.

Small inhibitory molecules of the ATPase activity of HPV-6 E1 were identified by high-throughput screening [69]. These lead molecules probably inhibit ATP binding by allosteric mechanisms [70] but, unfortunately, they were not active in cell culture assays [71]. At the same time, two series of inhibitory molecules of the cooperative interaction between E1-E2 and *ori* were identified for genotypes -6 and -11 [69]. These compounds are able to bind to the overlapping sites on the interface between E1-E2 [72]. The mechanism of interaction is illustrated in the figure 1. Unfortunately, the studies involving this class of inhibitors were discontinued after the efficacy of the prophylactic vaccines had been demonstrated in the control tests [2].

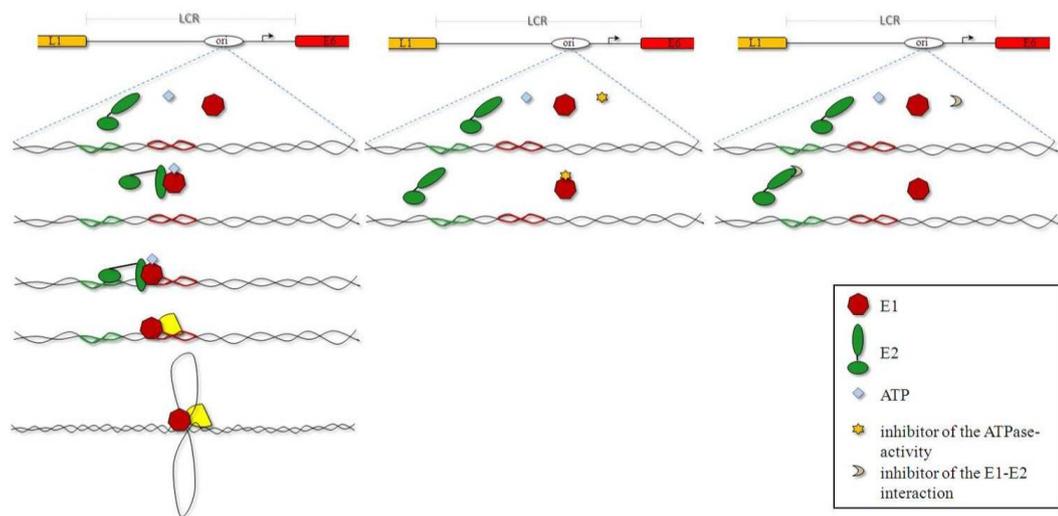


Figure 1. HPV E1 and E2 proteins as antiviral targets. (A) HPV genome replication is dependent upon the interaction of the E1 and E2 proteins in the *ori*, which is located on the viral LCR (Long Control Region). In turn, the formation of E1-E2 complex depends of ATP binding. Once formed, the E1-E2 complex recruits the DNA pol α to the *ori*. (B) Molecule inhibitors compete allosterically for the ATP-binding site and prevent the formation of the E1-E2 complex in the HPV-6 *ori*. (C) Other molecules are also capable of interfering with the formation of E1-E2 complex of HPV-6 and -11 targeting sites which are located in the interaction interfaces of these viral proteins.

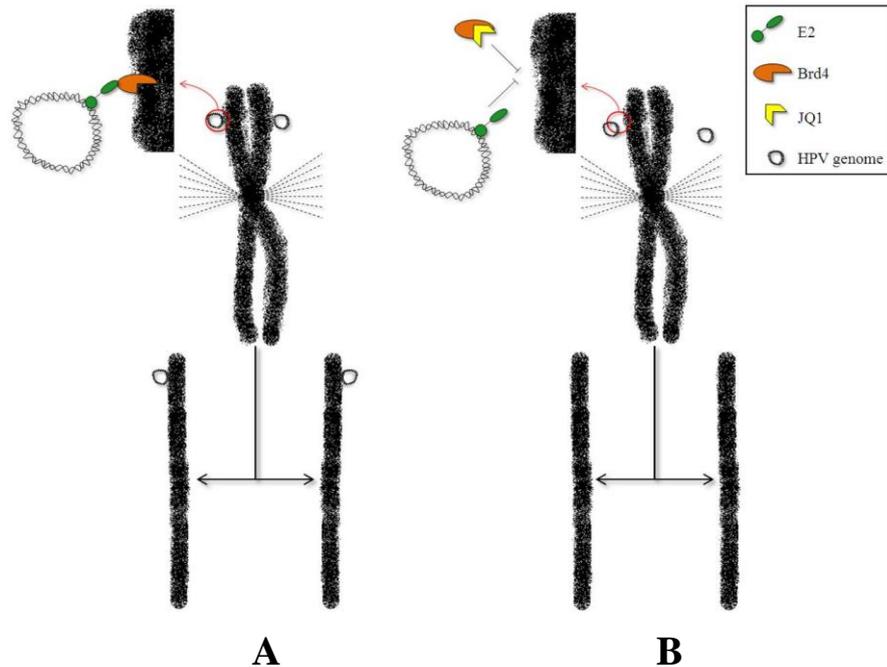


Figure 2. HPV E2 protein as an antiviral target. (A) By interacting with E2, Brd4 is able to attach the viral episome to the host chromosome since it is bound to the acetylated histones of the chromatin. The cooperation between E2-Brd4 allows the viral genomes to be equally partitioned at the mitoses. (B) JQ1 is a small molecule capable of inhibiting the binding of Brd4 to the chromatin and thus represents a potential target for the development of anti-HPV drugs.

Finally, recent evidence has shown the interaction between Brd4 – a bromodomain protein that binds to acetylated histones – and E2 protein of both high and low risk HPV types [73]. Given the role of E2 in the maintenance of the viral episome [74], the E2-Brd4 interaction is likely to be responsible for attaching the viral episome to the mitotic spindle, and thus allow an equal partition of the viral genome during mitosis [75, 76]. The discovery of a molecule capable of inhibiting the binding of Brd4 to chromatin, called JQ1 [77], provides a prospect for producing drugs that can inhibit the interaction between E2 and Brd4. Figure 2 illustrates the role of HPV E2 protein.

Targeting the HPV Carcinogenesis

The combined action of E6 and E7 oncoproteins of high-risk genotypes is essential for the maintenance of the neoplastic phenotype and uncontrolled cell cycle [78]. As a result, different strategies have been employed to investigate the interruption of the activity of these oncoproteins: siRNA, antisenseRNA, ribozymes and peptide aptamers [79]. However, the major progress has been made in the case of E6.

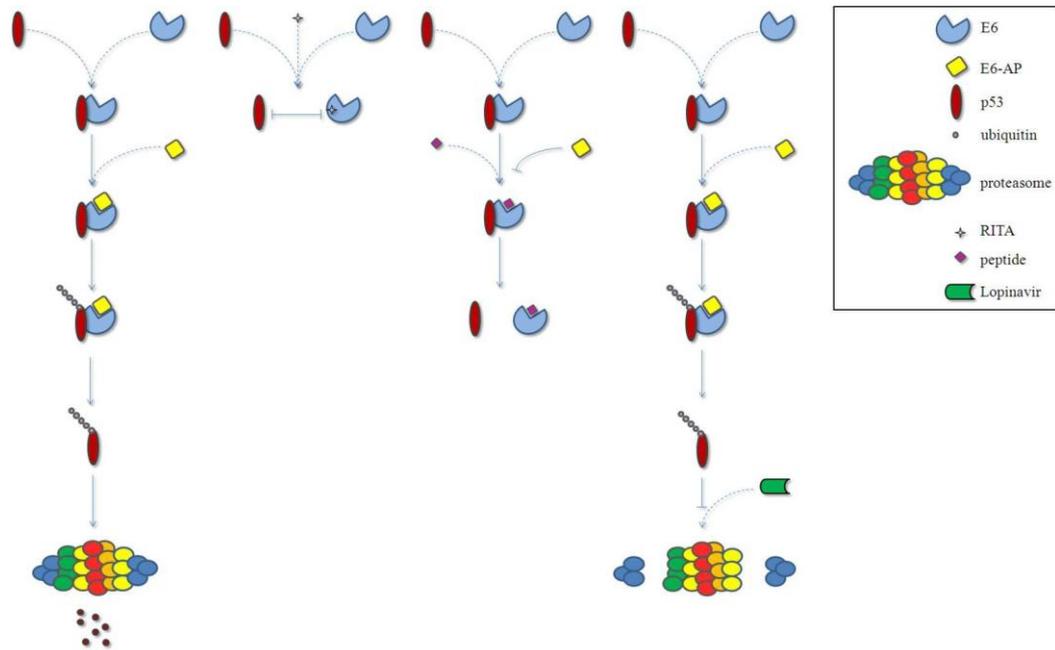


Figura 3. HPV E6 protein as antiviral target. (A) The interaction of p53 with E6 forms a stable complex that recruits the E6/AP ubiquitin ligase. The p53 protein is then ubiquitinated and signaled for degradation via proteasome. (B) The p53 reactivation and induction of apoptosis (RITA) can be achieved in cervical cancer cells through the use of small molecule inhibitors capable of interacting directly with E6 and preventing its binding to p53. (C) The inhibition of p53-mediated degradation by E6 has also been achieved through the use of small peptides capable of binding to E6 and preventing its interaction with E6-AP, which results in p53 reactivation and subsequently promotion of apoptosis. (D) The degradation of p53 in cervical carcinoma cells can be achieved through the use of Lopinavir, which is a protease inhibitor molecule used in anti-HIV therapy due to its ability to block the viral proteasome activation.

The deregulation of the cell cycle caused by HPV is due, in part, to the E6-mediated degradation of p53. After interacting with p53, the E6 oncoprotein recruits ubiquitin ligase E6/AP, which ubiquitinates the complex and signals to proteolytic degradation [80]. Three different molecular strategies have been employed to prevent E6-mediated degradation: (i) interference with the direct p53-E6 interaction; (ii) interference with the binding of E6/AP to E6; (iii) selective inhibition of proteasome. These molecular strategies are illustrated in the figure 3. With regard to the first alternative, cervical cancer cells can be suppressed *in vitro* by small molecules that cause the reactivation of p53 and induction of apoptosis (RITA) [81]. RITA interacts with p53, by blocking the binding of this molecule to E6 and its subsequent ubiquitination [2]. In the second strategy, small peptides that are capable of inhibiting the formation of E6/AP-E6 complex, were developed in parallel and have been shown to promote cell cycle arrest and/or apoptosis by p53 reactivation [82, 83], but these studies are still in an early stage of evaluation [2].

The third strategy probably represents the most practical alternative from the standpoint of clinical viability. The use of Lopinavir, an antiretroviral protease used in anti-HIV therapy, is able to block the activation of proteasome caused by HIV, stabilize p53 and induce apoptosis of HPV-infected cells *in vitro* [84-86]. The effectiveness of Lopinavir in the clearance of lesions caused by HPV was evaluated without success [87], but it is worth noting that the concentration of the drug used in *in vitro* assays is greater than that achieved by oral administration [84]. The cervico-vaginal concentration of the drug was probably suboptimal. Lopinavir is a licensed drug and thus the formulation of topical

preparations for anti-HPV therapeutics may be used in clinical trials within a few years [2], since their efficacy and safety have already been proven.

Immunotherapy

Both the HPV vaccines that are currently available have proved to be effective against the HPV types that were targeted by each vaccine in clinical trials. The vaccines are targeted at adolescent girls but their precise ages vary from country to country. In spite of these differences, vaccination should ideally be performed before the onset of sexual activity, since neither vaccine has demonstrated therapeutic activity for preexisting infections [88].

However, vaccination with these prophylactic vaccines could support the treatment of HPV-related diseases. The use of quadrivalent HPV vaccine has been linked to a reduced incidence of subsequent cervical, vulvar and vaginal intraepithelial neoplasia and genital warts in women who had been diagnosed and treated for cervical and vulvar or vaginal disease [89]. Those women who had been given prior vaccination, had a significantly reduced risk (64.9%) of subsequent high-grade cervical lesions, as well as a reduced risk (35.2%) of developing any subsequent disease related to the HPV vaccine types (-6, -11, -16 and -18), in comparison with the placebo recipients. Although the exact underlying mechanism is not fully known, these observed reduction rates are clinically significant [89].

Despite the effectiveness of prophylactic vaccines, anti-HPV therapeutic interventions based on immunotherapy could make it possible to treat unapparent infections and/or diseases. As the regression of HPV-caused diseases is the result of a Th1 cellular response [16], the more attractive immunotherapeutic approaches have explored the immunization with E6 and E7 antigens, which are essential for the progression and maintenance of the malignant phenotype and are constitutively expressed in all the cervical intraepithelial lesions [2, 12].

Although studies of immunization with HPV-16 and -18 E6 and E7 have shown they are successful against HPV-expressing cancers in mice, the same results have not been observed in humans [90]. All the vaccines tested in human clinical trials have proved to be safe and capable of inducing antigen-specific cellular immune response, but cancers and high-grade lesions induced by HPV have been highly refractory to the same immunotherapies explored in the mouse model [91]. The attempts that are currently being employed to circumvent these problems have investigated immunomodulators and/or adjuvants that are capable of enhancing the immunogenicity of therapeutic vaccines and/or manipulating the local immunity [2]. Some discrete, but significant, advances have been made in this direction [91- 93].

FINAL CONSIDERATIONS

Despite the advances in prevention strategies against cervical cancer, the 'unknowns' regarding the mechanisms for the viral evasion of the host immunity, impose significant challenges for the development of antiviral therapeutic approaches. For this reason, even though several alternatives are available for the treatment of cervical lesions, they are all limited in regard to the clearance of the diseases caused by HPV.

Great progress has been made in carrying out various programs to identify and characterize both molecular targets and antagonist molecules for HPV proteins. However, marketing considerations have prevented the pharmaceutical companies from making progress in producing antiviral drugs and improving chemotherapy for the treatment of cervical cancer. These companies have been afraid that these drugs would have reduced market face to the prophylactic vaccines that have recently been licensed. Despite their proven effectiveness, the optimistic forecasts and the amount of lobbying for the currently available HPV vaccines, the success of immunization is below expectations. The reality is that over the next two or three decades a large section of the public will remain unvaccinated, and it is necessary to develop appropriate treatment for these people, either by antiviral drugs and/or immunotherapy.

REFERENCES

- [1] De Martel C, Ferlay J, Franceschi S, Vignat J, Bray F, Forman D, et al. The global burden of cancers attributable to infections in the year 2008: a review and synthetic analysis. *Lancet Oncol* 2012;13:607-15.
- [2] Stanley MA. Genital human papillomavirus infections: current and prospective therapies. *J Gen Virol* 2012;93:681–691.
- [3] Paavonen J, Naud P, Salmeron J, Wheeler CM, Chow SN, Apter D, et al. Efficacy of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by oncogenic HPV types (PATRICIA): final analysis of a double-blind, randomised study in young women. *Lancet* 2009;374:301–314.
- [4] Kjaer SK, Sigurdsson K, Iversen OE, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, Perez G, et al. A pooled analysis of continued prophylactic efficacy of quadrivalent human papillomavirus (types 6/11/16/18) vaccine against high-grade cervical and external genital lesions. *Cancer Prev Res* 2009;2:868–878.
- [5] WHO/ICO. Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre). Human papillomavirus and related cancers in world. Summary Report. [09/26/2011]. Available in: <www.who.int/hpvcentre>, 2010.
- [6] Kaufmann AM, Scheneider A. New paradigm for prevention of cervical cancer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2007;130:25-29.

- [7] Maluf M, Perin PM. HPV e gestação. In: Rosenblatt C, editor. *HPV na pratica clinica*. Atheneu: Brazil Press; 2005. p. 193–225.
- [8] zur Hausen H, de Villiers EM, Gissmann L. Papillomavirus infections and human genital cancer. *Gynecol Oncol* 1981;12:S124–S128.
- [9] Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer *Clin Sci* 2006;110:525–541.
- [10] Schwartz S. HPV-16 RNA processing. *Front Biosci* 2008;13:5880–5891.
- [11] Meyers C, Mayer TJ, Ozburn MA. Synthesis of infectious human papillomavirus type 18 in differentiating epithelium transfected with viral DNA. *J Virol* 1997;71:7381–7386.
- [12] Venuti A, Paolini F, Nasir L, Corteggio A, Roperto S, Campo MS, et al. Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions. *Mol Cancer* 2011;10:140.
- [13] Lehtinen M, Rantala I, Toivonen A, Luoto H, Aine R, Lauslahti K, et al. Depletion of Langerhans cells in cervical HPV infection is associated with replication of the virus. *APMIS* 1993;101:833–837.
- [14] Connor JP, Ferrer K, Kane JP, Goldberg JM. Evaluation of Langerhans' cells in the cervical epithelium of women with cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol* 1999;75:130-135.
- [15] Kupper TS, Fuhlbrigge RC. Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. *Nat Rev Immunol* 2004;4:211–222.
- [16] Stanley M. Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine* 2006;24:S16–22.
- [17] Matthews K, Leong CM, Baxter L, Inglis E, Yun K, Bäckström BT, et al. Depletion of Langerhans cells in human papillomavirus type 16-infected skin is associated with E6-mediated down regulation of E-cadherin. *J Virol* 2003;15:8378–85.
- [18] Schapiro F, Sparkowski J, Adduci A, Schlegel R, Grinstein S. Golgi alkalization by the papillomavirus E5 oncoprotein. *J Cell Biol* 2000;148:305–315.
- [19] Ashrafi GH, Haghshenas MR, Marchetti B, O'Brien PM, Campo MS. The E5 protein of human papillomavirus type 16 selectively down-regulates surface HLA class. *Int J Cancer* 2005;113:276–283.
- [20] Ashrafi GH, Haghshenas M, Marchetti B, Campo MS. E5 protein of human papillomavirus 16 downregulates HLA class I and interacts with the heavy chain via its first hydrophobic domain. *Int J Cancer* 2006;119:2105–2112
- [21] Stanley MA, Pett MR, Coleman N. HPV: from infection to cancer. *Biochem Soc Trans* 2007;35:1456–1460.
- [22] Bottley G, Watherston OG, Hiew YL, Norrild B, Cook GP, Blair GE. High-risk human PV E7 expression reduces cell-surface MHC class I molecules and increases susceptibility to natural killer cells. *Oncogene* 2008;27:1794–1799.
- [23] Kim SH, Oh JM, No JH, Bang YJ, Juhn YS, Song YS. Involvement of NF-kappaB and AP-1 in COX-2 upregulation by human papillomavirus 16 E5 oncoprotein. *Carcinogenesis* 2009;30:753–757.
- [24] Herdman MT, Pett MR., Roberts I, Alazawi WO, Teschendorff AE, Zhang XY, et al. Interferon-beta treatment of cervical keratinocytes naturally infected with human PV 16 episomes promotes rapid reduction in episome numbers and emergence of latent integrants. *Carcinogenesis* 2006;27:2341–2353.
- [25] Maglennon GA, McIntosh P, Doorbar J. Persistence of viral DNA in the epithelial basal layer suggests a model for papillomavirus latency following immune regression. *Virology* 2011;414:153–163.

- [26] Schmook T, Nindl I, Ulrich C, Meyer T, Sterry W, Stockfleth E. Viral warts in organ transplant recipients: new aspects in therapy. *Brit J Dermatol* 2003;149:20–24.
- [27] Abramson AL, Nouri M, Mullooly V, Fisch G, Steinberg BM. Latent human papillomavirus infection is comparable in the larynx and trachea. *J Med Virol* 2004;72:473–477.
- [28] Gravitt PE. The known unknowns of HPV natural history. *J Clin Invest* 2011;121:4593–4599.
- [29] Syrjänen KJ. Natural history of genital HPV infections. *Papillomavirus Rep* 1990;1:1-5.
- [30] Syrjänen KJ, Syrjänen S. *Papillomavirus infections in human pathology*. Winchester: John Wiley & Sons; 2000.
- [31] de Carvalho JJM. Tratamento. In: Rosenblatt C, editor. *HPV na pratica clinica*. Atheneu: Brazil Press; 2005. p. 105-115.
- [32] Viera MH, Amini S, Huo R, Konda S, Block S, Berman B. Herpes simplex virus and human papillomavirus genital infections: new and investigational therapeutic options. *Int J Dermatol* 2010;49:733–749.
- [33] Moher LM, Maurer SA. Podophyllum toxicity: case report and literature review. *J Fam Pract* 1979;9:237–240.
- [34] Leslie KO, Shitamoto B. The bone marrow in systemic podophyllin toxicity. *Am J Clin Pathol* 1982;77:478–480.
- [35] Petersen CS, Weismann K. Quercetin and kaempferol: an argument against the use of podophyllin? *Genitourin Med* 1995;71:92–93.
- [36] von Krogh G, Lacey CJ, Gross G, Barrasso R, Schneider A. European course on HPV associated pathology: guidelines for primary care physicians for the diagnosis and management of anogenital warts. *Sex Transm Infect* 2000;76:162–168.
- [37] Sonnex C, Lacey CJ. The treatment of human papillomavirus lesions of the lower genital tract. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2001;15:801–816.
- [38] Maw R. Critical appraisal of commonly used treatment for genital warts. *Int J STD AIDS* 2004;15:357–364.
- [39] Jones RW. Vulval intraepithelial neoplasia: current perspectives. *Eur J Gynaecol Oncol* 2001;22:393–402.
- [40] Yang GY, Liao J, Kim K, Yurkow EJ, Yang C S. Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by tea polyphenols. *Carcinogenesis* 1998;19:611–616.
- [41] Beltz LA, Bayer DK, Moss AL, Simet IM. Mechanisms of cancer prevention by green and black tea polyphenols. *Anticancer Agents Med Chem* 2006;6:389–406.
- [42] Stanley MA. Imiquimod and the imidazoquinolones: mechanism of action and therapeutic potential. *Clin Exp Dermatol* 2002;27:571–577.
- [43] Arany I, Tyring SK, Brysk MM, Stanley MA, Tomai MA, Miller RL, et al. Correlation between pretreatment levels of interferon response genes and clinical responses to an immune response modifier (Imiquimod) in genital warts. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:1869–1873.
- [44] Wagstaff AJ, Perry CM. Topical imiquimod: a review of its use in the management of anogenital warts, actinic keratoses, basal cell carcinoma and other skin lesions. *Drugs* 2007;67:2187–2210.
- [45] Beutner KR, Tyring SK, Trofatter KF Jr, Douglas JM Jr, Spruance S, Owens ML, et al. Imiquimod, a patient-applied immune response modifier for treatment of external genital warts. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:789–794.
- [46] Pett MR, Herdman MT, Palmer RD, Yeo GS, Shivji MK, Stanley MA, et al. Selection of cervical keratinocytes containing integrated HPV16 associates with episome loss and an endogenous antiviral response. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:3822–3827.

- [47] Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted diseases treatment guidelines . *MMWR* 2010;59(RR12):69–78.
- [48] Carrasco D, Straten M, Tyring SK. Treatment of anogenital warts with imiquimod 5% cream followed by surgical excision of residual lesions. *J Am Acad Dermatol* 2002;4:S212–6.
- [49] Hoyme UB, Hagedorn M, Schindler AE, Schneede P, Hopfenmüller W, Schorn K, et al. Effect of adjuvant imiquimod 5% cream on sustained clearance of anogenital warts following laser treatment. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2002;2:79–88.
- [50] Sherrard J, Riddell L. Comparison of the effectiveness of commonly used clinic-based treatments for external genital warts. *Int J STD AIDS* 2007;18:365–368.
- [51] Parellada CI, Pereyra EAG. Novas terapêuticas. In: Rosenblatt C, editor. *HPV na prática clínica*. Atheneu: Brazil Press; 2005. p. 117-130.
- [52] Chen YH, Huang LH, Chen TM. Differential effects of progestins and estrogens on long control regions of human papillomavirus types 16 and 18. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 224:651-9.
- [53] Gloss B, Bernard HU, Seedorf K, Klock G. The upstream regulatory region of the human papilloma virus-16 contains an E2 protein-independent enhancer which is specific for cervical carcinoma cells and regulated by glucocorticoid hormones. *EMBO J* 1987; 6:3735-43.
- [54] Michelin D, Gissmann L, Street D, Potkul RK, Fisher S, Kaufmann AM, et al. Regulation of human papillomavirus type 18 in vivo: effects of estrogen and progesterone in transgenic mice. *Gynecol Oncol* 1997; 66:202-8.
- [55] Mittal R, Tsutsumi K, Pater A, Pater MM. Human papillomavirus type 16 expression in cervical keratinocytes: role of progesterone and glucocorticoid hormones. *Obstet Gynecol* 1993; 81:5-12.
- [56] Ferenczy A. Treating genital condyloma during pregnancy with the carbon dioxide laser. *Am J Obstet Gynecol* 1984;148:9–12.
- [57] Chamberlain MJ, Reynolds AL, Yeoman WB. Toxic effect of podophyllum application in pregnancy. *Br Med J* 1972;3:391–392.
- [58] Silverberg MJ, Ahdieh L, Munoz A, Anastos K, Burk RD, Cu-Uvin S, et al. The impact of HIV infection and immunodeficiency on human papillomavirus type 6 or 11 infection and on genital warts. *Sex Transm Dis* 2002;29:427–435
- [59] De Panfilis G, Melzani G, Mori G, Ghidini A, Graifemberghi S. Relapses after treatment of external genital warts are more frequent in HIV-positive patients than in HIV-negative controls. *Sex Transm Dis* 2002; 29: 121–125.
- [60] Conant MA. Immunomodulatory therapy in the management of viral infections in patients with HIV infection. *J Am Acad Dermatol* 2000;43:S27–30.
- [61] Gayed SL. Topical imiquimod cream 5% for resistant perianal warts in a renal transplant patient. *Int J STD AIDS* 2002;13:501–503.
- [62] Gilson RJ, Shupack JL, Friedman-Kien AE, Conant MA, Weber JN, Nayagam AT, et al. A randomized, controlled, safety study using imiquimod for the topical treatment of anogenital warts in HIV-infected patients. Imiquimod Study Group. *Int J STD AIDS* 1999;13:2397–2404.
- [63] Hagman JH, Bianchi L, Marulli GC, Soda R, Chimenti S. Successful treatment of multiple filiform facial warts with imiquimod 5% cream in a patient infected by human immunodeficiency virus. *Clin Exp Dermatol* 2003;28:260–261.
- [64] Yang L, Li R, Mohr IJ, Clark R, Botchan MR. Activation of BPV-1 replication in vitro by the transcription factor E2. *Nature* 1991;353:628–632.

- [65] Chiang CM, Ustav M, Stenlund A, Ho TF, Broker TR, Chow LT. Viral E1 and E2 proteins support replication of homologous and heterologous papillomaviral origins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:5799–5803.
- [66] Sanders CM, Stenlund A. Recruitment and loading of the E1 initiator protein: an ATP-dependent process catalysed by a transcription factor. *EMBO J* 1998;17:7044–7055.
- [67] Masterson PJ, Stanley M A, Lewis AP, Romanos MA. A C-terminal helicase domain of the human papillomavirus E1 protein binds E2 and the DNA polymerase alpha-primase p68 subunit. *J Virol* 1998;72:7407–7419.
- [68] Titolo S, Pelletier A, Sauvé F, Brault K, Wardrop E, White PW, et al. Role of the ATP-binding domain of the human papillomavirus type 11 E1 helicase in E2-dependent binding to the origin. *J Virol* 1999;73:5282–5293.
- [69] White PW, Faucher AM, Goudreau N. Small molecule inhibitors of the human papillomavirus E1-E2 interaction. *Curr Top Microbiol Immunol* 2011;348:61–88.
- [70] White PW, Faucher AM, Massariol MJ, Welchner E, Rancourt J, Cartier M, et al. Biphenylsulfonacetic acid inhibitors of the human papillomavirus type 6 E1 helicase inhibit ATP hydrolysis by an allosteric mechanism involving tyrosine 486. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:4834–4842.
- [71] Faucher AM, White PW, Brochu C, et al. Discovery of small molecule inhibitors of the ATPase activity of human papillomavirus E1 helicase. *J Med Chem* 2004; 47: 18-21.
- [72] Yoakim C, Ogilvie WW, Goudreau N, Naud J, Haché B, O’Meara JA, et al. Discovery of the first series of inhibitors of human papillomavirus type 11: inhibition of the assembly of the E1-E2-origin DNA complex. *Bioorg Med Chem Lett* 2003;13:2539–2541.
- [73] Gagnon D, Joubert S, Senechal H, Fradet-Turcotte A, Torre S, Archambault J. Proteasomal degradation of the papillomavirus E2 protein is inhibited by overexpression of bromodomain containing protein 4. *J Virol* 2009;83:4127–4139.
- [74] Smith JA, White EA, Sowa ME, Powell ML, Ottinger M, Harper JW et al. Genome-wide siRNA screen identifies SMCX, EP400, and Brd4 as E2-dependent regulators of human papillomavirus oncogene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:3752–3757.
- [75] McBride AA, McPhillips MG, Oliveira JG. Brd4: tethering, segregation and beyond. *Trends Microbiol* 2004;12:527–529.
- [76] Abbate EA, Voitenleitner C, Botchan MR. Structure of the papillomavirus DNA-tethering complex E2:Brd4 and a peptide that ablates HPV chromosomal association. *Mol Cell* 2006;24:877–889.
- [77] Filippakopoulos P, Qi J, Picaud S, Shen Y, Smith WB, Fedorov O, et al. Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature* 2010;468:1067–1073.
- [78] Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer* 2010;10:550–560.
- [79] Govan VA. Strategies for human papillomavirus therapeutic vaccines and other therapies based on the E6 and E7 oncogenes. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1056:328–343.
- [80] Talis AL, Huibregtse JM, Howley PM. The role of E6AP in the regulation of p53 protein levels in human papillomavirus (HPV)-positive and HPV-negative cells. *J Biol Chem* 1998;273:6439–6445.
- [81] Zhao CY, Szekely L, Bao W, Selivanova G. Rescue of p53 function by small-molecule RITA in cervical carcinoma by blocking E6-mediated degradation. *Cancer Res* 2010;70:3372–3381.

- [82] Be X, Hong Y, Wei J, Androphy EJ, Chen JJ, Baleja JD. Solution structure determination and mutational analysis of the papillomavirus E6 interacting peptide of E6AP. *Biochemistry* 2001;40:1293–1299.
- [83] Liu Y, Liu Z, Androphy E, Chen J, Baleja JD. Design and characterization of helical peptides that inhibit the E6 protein of papillomavirus. *Biochemistry* 2004;43:7421–7431.
- [84] Hampson L, Kitchener HC, Hampson IN. Specific HIV protease inhibitors inhibit the ability of HPV16 E6 to degrade p53 and selectively kill E6-dependent cervical carcinoma cells in vitro. *Antivir Ther* 2006;11:813–825.
- [85] Kim DH, Jarvis RM, Xu Y, Oliver AW, Allwood JW, Hampson L, et al. Combining metabolic fingerprinting and footprinting to understand the phenotypic response of HPV16 E6 expressing cervical carcinoma cells exposed to the HIV anti-viral drug lopinavir. *Analyst (Lond)* 2010;135:1235–1244.
- [86] Batman G, Oliver AW, Zehbe I, Richard C, Hampson L, Hampson IN. Lopinavir up-regulates expression of the antiviral protein ribonuclease L in human papillomavirus-positive cervical carcinoma cells. *Antivir Ther* 2011;16:515–525.
- [87] De Vuyst H, Lillo F, Broutet N, Smith JS. HIV, human papillomavirus, and cervical neoplasia and cancer in the era of highly active antiretroviral therapy. *Eur J Cancer Prev* 2008;17:545–554.
- [88] Campo MS, Roden RBS. Papillomavirus Prophylactic Vaccines: Established Successes, New Approaches. *J Virol* 2010;84:1214.
- [89] Joura EA, Garland SM, Paavonen J, Ferris DG, Perez G, Ault KA, et al. Effect of the human papillomavirus (HPV) quadrivalent vaccine in a subgroup of women with cervical and vulvar disease: retrospective pooled analysis of trial data. *BMJ* 2012;344:1401.
- [90] Su JH, Wu A, Scotney E, Ma B, Monie A, Hung CF, et al. Immunotherapy for cervical cancer: research status and clinical potential. *BioDrugs* 2010;24:109–129.
- [91] Trimble CL, Frazer IH. Development of therapeutic HPV vaccines. *Lancet Oncol* 2009;10:975–980.
- [92] Kenter GG, Welters MJ, Valentijn AR, Lowik MJ, Berends-van der Meer DM, Vloon AP, et al. Vaccination against HPV-16 oncoproteins for vulvar intraepithelial neoplasia. *N Engl J Med* 2009;361:1838–1847.
- [93] Daayana S, Elkord E, Winters U, Pawlita M, Roden R, Stern PL, et al. Phase II trial of imiquimod and HPV therapeutic vaccination in patients with vulvar intraepithelial neoplasia. *Br J Cancer* 2010;102:1129–1136.
- [94] American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. Web site available at: <http://www.asccp.org/PracticeManagement/Vulva/HPVInfectionsandVIN/HPVTreatments/tabid/7457/Default.aspx>. Accessed April 29, 2013.