

**Otto Luiz Dutra Cerqueira**

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES SISTEMAS DE IMUNIZAÇÃO QUE  
EMPREGAM A ONCOPROTEINA E7 DO VÍRUS PAPILOMA HUMANO  
TIPO 16 (HPV 16) GENETICAMENTE FUSIONADA À FLAGELINA  
FliCd DE *Salmonella enterica* sv. Muenchen.**

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Ciências Biomédicas da Universidade de São  
Paulo para obtenção do Título de Mestre em  
Ciências (Microbiologia).

**SÃO PAULO  
2009**

**Otto Luiz Dutra Cerqueira**

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES SISTEMAS DE IMUNIZAÇÃO QUE  
EMPREGAM A ONCOPROTEINA E7 DO VÍRUS PAPILOMA HUMANO  
TIPO 16 (HPV 16) GENETICAMENTE FUSIONADA À FLAGELINA  
FliCd DE *Salmonella enterica* sv. Muenchen.**

**Dissertação apresentada ao Instituto de  
Ciências Biomédicas da Universidade de São  
Paulo para obtenção do Título de Mestre em  
Microbiologia.**

Área de concentração: Microbiologia

**Orientador: Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira**

**SÃO PAULO  
2009**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do  
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Cerqueira, Otto Luiz Dutra.

Avaliação de diferentes sistemas de imunização que empregam a oncoproteína E7 do vírus do Papiloma humano tipo 16 (HPV 16) geneticamente fusionada à flagelina fliCd de *Salmonella enterica* sv. muenchen / Otto Luiz Dutra Cerqueira. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Luís Carlos de Souza Ferreira.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Vacinas terapêuticas contra tumores induzidos pelo HPV.

Versão do título para o inglês: Evaluation of different immunization systems that use the oncoprotein E7 of the human Papiloma virus type 16 (HPV 16) genetically fused to the flagellin of the *Salmonella enterica* sv. muenchen.

Descritores: 1. Células T CD8<sup>+</sup> 2. Flagelina 3. Vacinas terapêuticas I. Ferreira, Luís Carlos de Souza II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

ICB/SBIB3/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Otto Luiz Dutra Cerqueira.

Título da Dissertação: Avaliação de diferentes sistemas de imunização que empregam a oncoproteína E7 do vírus do Papiloma humano tipo 16 (HPV 16) geneticamente fusionada à flagelina fliCd de *Salmonella entérica* sv. muenchen.

Orientador(a): Luís Carlos de Souza Ferreira.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,  
em sessão pública realizada a ...../...../.....,

**Aprovado(a)**

**Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

## **DEDICATÓRIA**

**“Aos meus pais pela dedicação e por me ensinar a ter gosto pelos estudos”.**

Este trabalho foi realizado sob orientação do Prof. Luís Carlos de Souza Ferreira, no Centro de Vacinas e Terapias Gênicas III (CEVAT-GENE III) do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com auxílio financeiro da CAPES, CNPq e Ministério da Saúde.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho, seja uma idéia ou auxílio técnico; ou mesmo apoio amigo.

À Bruna Maldonado pela boa amizade, incentivo sempre nas horas mais difíceis do percurso e pela confluência de idéias. Pelos ensaios em conjunto, principalmente aqueles que envolveram a proteína E7Δ.

À Mariana Diniz pela minha recepção no laboratório, que gerou uma crescente amizade repleta de eventos. Pelo apoio em técnicas de biologia molecular e ensaios imunológicos.

Às amigas Juliana Falcão e Catarina Braga, pela boa e divertida amizade.

À amiga Priscila Dal Pozo por compartilhar horários noturnos, pelo coleguismo e pelo apelido.

Aos amigos Hugo Izabel, Rafael Ciro, Robert Leonard e Domingos Botte, pela parceria e as boas gargalhadas compartilhadas.

À Beth Sbrogio pela sua disposição em ensinar e ajudar o manuseio de animais de laboratório. Agradeço também a convivência alegre no laboratório, com direito a ramos de Arruda.

Aos colegas de laboratório Jaime, Renata, Vinicius, Cariri, Elisa, Sabrina, “Juliano dentista”, Milene, Roberto, Cristiane, Eduardo, Fabiano, Liliane, Luana, Bruno Timtim, , Wilson, Juliano, Natalia, Natalie, Marcelo, Camila pela convivência.

Aos amigos Roger Chaca, Cleverson Bigode, Alexandre Lobete, Marlio Urteg, Thiago Nietzsche e Saulo Docyn por ajudarem a tornar a moradia estudantil no CRUSP uma coisa agradável.

Aos Maracangalhanos e amigos da Bahia por tão bem me receberem nos merecidos momentos de descontração.

Aos colegas do laboratório do Menck, Luís, Queromim, Carol Berra, Carol Q., Melissa, Dani, Esthefano, Ricardo, Tomaz, André, Lu, Tati por terem me ajudado no aprendizado e manuseio de culturas celulares, transfecções e microscopia de fluorescência.

Aos amigos do ICB, Cassiano Carromeu, Joselma, Frank, Camila Romano, Carol Lego pelas boas conversas e discussões.

À Professora Dra Rita Café Ferreira pela amizade e as conversas iniciais, que me encorajaram a procurar os prof. Luís.

À Dra. Nathalie Cella por me oferecer boas perspectivas de continuar fazendo pesquisa científica.

Ao professor Dr. Carlos Menck pela disposição em ajudar neste trabalho cedendo o espaço físico do laboratório. Por me dedicar tempo e oferecer a ajuda de seus alunos. Pela confiança a mim conferida.

Ao professor Dr. Luís Carlos Ferreira pela enérgica orientação. Por acolher na academia após longo período de tempo no mercado. Por me proporcionar inúmeras oportunidades de amadurecimento científico.

À minha namorada Elaine Cardoso por seu companheirismo e incentivo. Por trazer amor, paz e alegria em meu viver.

À César Cerqueira, meu pai, pelo exemplo de força, persistência, honestidade e longevidade.

À Rosa Maria Cerqueira, minha mãe, pelo amor materno incondicional que sempre me impulsiona a evoluir.

Às Universidades públicas e de qualidade em nosso país.



**“Não existe causa alguma, extrínseca ou intrínseca a Deus, que o incite a agir, além da perfeição de sua própria natureza”.**

**Baruch de Espinosa  
Ética**

## RESUMO

Cerqueira, OLD. Avaliação de diferentes sistemas de imunização que empregam a oncoproteína E7 do vírus papiloma humano tipo 16 (HPV 16) geneticamente fusionada à flagelina flicd de *Salmonella enterica* sv. Muenchen. [Dissertação (Mestrado em Microbiologia)] São Paulo; Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2009.

O câncer cervical é o segundo maior responsável por mortes atribuídas a câncer em mulheres e dados epidemiológicos tem demonstrado a associação entre a infecção do HPV e o desenvolvimento da neoplasia. Sabe-se que num dado momento da infecção pelo HPV, ocorre integração do genoma viral ao genoma da célula hospedeira e consequente hiperexpressão de dois oncogenes virais, E6 e E7, o que contribui fortemente para a transformação celular. O presente trabalho propõe o uso de vacinas terapêuticas expressando a oncoproteína E7 do HPV-16 geneticamente fusionada à porção amino terminal da flagelina FliCd de *Salmonella enterica* sv müenchen; e verificação de seu possível papel adjuvante. Vacinas de DNA foram construídas de modo a direcionar as proteínas híbridas ao espaço intracitoplasmático. A verificação da expressão *in vitro* foi feita utilizando transfecções de culturas celulares, seguida de imunofluorescência e imunodeteção. Em seguida, essas construções vacinais foram administradas em camundongos C57BL6. Ensaio de ELISPOT foram feitos para mensuração o nível de linfócitos T secretores de IFN-g. Os dados de imunofluorescência e imunodeteção demonstraram a correta expressão da proteína. Ensaio de proteção realizados com  $5 \times 10^6$  células TC-1 administrada por via subcutânea mostraram 80% de proteção em camundongos que haviam recebido previamente 4 doses das vacinas de DNA por biobalística. Ensaio de ELISPOT mostraram em média 9 células do baço secretoras de IFN- $\gamma$  por  $10^6$  células do baço (INF- $\gamma^+$ / $10^6$ ) responsivas ao peptídeo CD8 / E7 de forma específica. Nossos dados sugerem que a formulação vacinal possui um efeito terapêutico significativo frente ao desafio com as células tumorais TC-1. Em paralelo, foi construída a cepa de salmonela vacinal SL FlaE7 que não mostrou efeito protetor frente ao desafio com células TC-1.

**Palavras chave:** Papillomavírus. Vacinas terapêuticas. Imunização. Oncoproteínas, Células T CD8<sup>+</sup>. Flagelina.

## ABSTRACT

Cerqueira, OLD. Evaluation of different immunization systems that use the oncoprotein E7 of the human papilloma-virus type 16 (HPV 16) genetically fused to the flagelin flicd of *Salmonella enterica* sv. muenchen. Master tesis (Microbiology) Instituto de Ciências Biomédicas; São Paulo; Universidade de São Paulo,2009.

The cervical cancer is the second major responsible for deaths attributed to cancer in women and epidemiologic data have been demonstrating the association between the infection of HPV and the development of this illness. It is known that in a certain moment of the infection with HPV, occurs the integration of the viral genome in the genome of the host cell and consequent over expression of two oncogenes, E6 and E7, it strongly contributes to the transformation of that cell. The present work proposes the use of DNA vaccines expressing the oncoprotein E7 of HPV-16 genetically fused to the portion A-terminal of the flagellin FliC<sub>d</sub> of *Salmonella enterica* sv muencheun and verification of your possible performance as adjuvant. The DNA vaccines were constructed in expression vector for eukaryotic to address the hybrid proteins to the intracitoplasmatic space. The verification of the expression in vitro was made using transfections of cellular cultures (COS-7) followed by immunofluorescence and western blot analyses. Soon after, those vaccines were injected in mice C57BL6 that were challenged then with  $5 \times 10^5$  tumor cells TC-1 subcutaneous. ELISPOT assays were performed for measure the level of spleen cells secreting interferon  $\gamma$ . The immunofluorescence and Western blot data are complementary demonstrating the correct expression of the protein. Protection assays showed 80% of protection in mice that had previously received 4 doses of the DNA vaccines in gene gun form. Assays of ELISPOT show 9 cells of the spleen secreting of IFN-  $\gamma$  (average) for  $10^6$  cells of the spleen (INF- $\gamma$  / $10^6$ ). Our data suggest that the formulation of vaccines possesses a significant therapeutic effect front to the challenge with the tumor cells TC-1 accompanist splenocyte IFN-  $\gamma$  secretory.

Keywords: Papillomavirus. Therapeutic Vaccines. Immunization. Oncoproteins, T CD8<sup>+</sup> cells. Flagelin.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Ciclo do HPV .....	23
Figura 2. Organização estrutural e funcional das flagelinas bacterianas.....	27
Figura 3. Representação esquemática dos vetores de expressão em procariotos.....	34
Figura 4. Esquema representativo da fusão gênica por SOEing.....	36
Figura 5. Representação esquemática das seqüências expressas pelas vias de DNA.....	38
Figura 6. Esquemas de imunização em camundongos com as vacinas de DNA e as salmonelas vacinais .....	44
Figura 7. Esquemas de imunização terapêutica feitas em camundongos com as vacinas de DNA pFla, pFlaE7 e pFlaE7 $\Delta$ .....	46
Figura 8. Detecção de FlaE7 expressa em cepas de salmonelas vacinais.....	49
Figura 9. Detecção de FlaE7 expressa em cepa salmonela vacinal.....	50
Figura 10. Desafio com células TC-1 em animais imunizados com salmonelas vacinais.....	51
Figura 11. Demonstração da fusão dos fragmentos N-terminal da flagelina e E7, completa ou truncada pela metodologia SOEing .....	53
Figura 12. Padronização de técnicas de transfecção frente a diferentes linhagens celulares .....	54
Figura 13. Demonstração da expressão <i>in vitro</i> das vacinas de DNA pFla, pFlaE7 e pFlaE7 $\Delta$ ; por imunofluorescência .....	56
Figura 14. Detecção das proteínas expressas pelas construções vacinais pFla, pFlaE7 e pFlaE7 $\Delta$ .....	57
Figura 15. Avaliação dos níveis de morte celular mediante a transfecção com as vacinas de DNA pFla, pFlaE7 e pFlaE7 $\Delta$ .....	59
Figura 16. Desafio com células TC-1 em animais imunizados com as vacinas DNA pFla, pFlaE7 e pFlaE7 $\Delta$ .....	61
Figura 17. Desafio com células tumorais TC-1 em animais imunizados com diferentes doses da vacina de DNA pFlaE7 .....	62
Figura 18. Desafio com células TC-1 em animais imunizados com as vacinas DNA pFla, pFlaE7 e pFlaE7 $\Delta$ – II .....	63

Figura 19. Perfil de células do baço secretoras de INF- $\gamma$ em animais imunizados com as vacinas de DNA pFla, pFlaE7 e pFlaE7 $\Delta$ .....	65
Figura 20. Desafio com células TC-1 em animais imunizados de maneira terapêutica com as vacinas de DNA pFla, pFlaE7 e pFlaE7 $\Delta$ .....	67

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos fragmentos a serem fusionados pela técnica de SOEing .....	35
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>APC</b>	Célula apresentadora de antígeno
<b>CD</b>	<i>Cluster of differentiation</i>
<b>CDRD</b>	Domínio de agrupamento e ativação de caspases
<b>CEEA</b>	Comissão de ética experimental animal
<b>CHO 9</b>	Linhagem celular de ovário de hamister chinês
<b>COBEA</b>	Colégio brasileiro de experimentação animal
<b>COPV</b>	Canine oral papiloma vírus
<b>COS-7</b>	Fibroblastos de rim de macaco verde
<b>CRPV</b>	Cottontail rabbit papiloma vírus
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>EGFR</b>	Receptor do fator de crescimento epidermal
<b>Elisa</b>	Ensaio imunoenzimático
<b>GG</b>	Genegun
<b>HEK</b>	Células renais embrionárias humanas
<b>HPV</b>	Human papiloma vírus
<b>HSP</b>	Heat shock proteins
<b>ID</b>	Intra-dérmica
<b>IFN</b>	Interferon
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IM</b>	Intra-muscular
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>Ipaf</b>	Fator ativador de interferon alpha
<b>LAMP</b>	lisosome associated membrane protein
<b>LCR</b>	Long control region
<b>LSIH</b>	Lesões Intra-epitelial de alto grau
<b>LSIL</b>	Lesões Intra-epitelial de baixo grau
<b>MHC</b>	Complexo principal de Histocompatibilidade
<b>MRC5</b>	linhagem celular de fibroblasto pulmonar humano
<b>NF-KB</b>	Fator nuclear kappa B
<b>NIC</b>	Neoplásia Intra-Epitelial Cervical
<b>NLR</b>	Nucleotíde oligomerization like receptor
<b>PABA</b>	Ácido paraaminobenzóico
<b>PAMP</b>	Pathogen associated molecular patterns
<b>PBS</b>	Solução salina tamponada com fosfato
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>PI</b>	Iodeto de propídio
<b>PLS408</b>	Construção transformada de <i>Salmonella enterica</i> sv Dublin
<b>PLS408-E7</b>	Construção transformada de <i>Salmonella enterica</i> sv Dublin mais E7
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>SL5928</b>	<i>Salmonella enterica</i> sv Dublin
<b>T CD4<sup>+</sup></b>	Linfócito TCD4
<b>T CD8<sup>+</sup></b>	Linfócito TCD8
<b>TC-1</b>	Células de epitélio pulmonar modificados de murinos
<b>TGF</b>	Fator transformador de crescimento
<b>Th1</b>	Linfócito T helper, do sub tipo 1
<b>Th2</b>	Linfócito T helper, do sub tipo 2
<b>TLR</b>	Toll Like receptor
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral
<b>UFC</b>	Unidade formadora de colônia
<b>URR</b>	Upstream regulatory region

## LISTA DE SÍMBOLOS

### AMINOÁCIDOS

Alanina.....	A
Arginina.....	R
Asparagina.....	N
Histidina.....	H
Isoleucina.....	I
Fenilalanina.....	F
Tirosina.....	Y
Triptofano.....	T
Valina.....	V

### BASES NITROGENADAS DOS NUCLEOTÍDEOS

Adenina.....	A
Citosina.....	C
Guanina.....	G
Timina.....	T



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>2 OBJETIVO</b> .....	31
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	32
3.1 Linhagens bacterianas e cultura de células eucariontes .....	32
3.2 Animais utilizados .....	33
3.3 Construção das salmonelas vacinais .....	33
3.4 Construção das vacinas de DNA .....	35
3.5 Verificação da expressão dos antígenos pelas vacinas construídas .....	39
3.5.1 Vacinas de DNA .....	39
3.5.1.1 Transfecção e imunofluorescência .....	39
3.5.1.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida com duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e <i>imunoblot</i> .....	40
3.5.1.3 Verificação da taxa de morte celular .....	41
3.5.2 Salmonelas vacinais .....	41
3.5.2.1 SDS-PAGE e <i>imunoblot</i> .....	41
3.6. Regime de imunização profilática .....	42
3.6.1 Vacinas de DNA .....	42
3.6.2 Salmonelas vacinais .....	43
3.7 Regime de imunização terapêutica .....	45
3.8 Ensaio de desafio com células TC-1 .....	45
3.9 Coleta e processamento das amostras .....	47
3.10 ELISPOT .....	47
<b>4 RESULTADOS</b> .....	48
4.1 Salmonelas vacinais .....	48
4.1.1 Construção do vetor pLSE7 e linhagem de salmonela vacinal .....	48
4.1.2 Detecção da flagelina híbrida expressa por cepas de salmonelas vacinais.....	48
4.1.3 Avaliação das respostas imunológicas geradas em animais imunizados com a linhagem SL FlaE7 e proteção vacinal frente a desafios com células TC-1.....	51
4.2 Vacinas de DNA.....	52
4.2.1 Construção das vacinas de DNA.....	52
4.2.2 Células transfectadas com as vacinas de DNA são capazes de expressar as	

proteínas híbridas FlaE7 e FlaE7 $\Delta$ .....	53
4.2.3 Vacina de DNA expressando FlaE7 confere significativa proteção ao desafio com células TC-1 em modelos de imunização profilática .....	60
4.2.4 Ensaios imunológicos demonstram geração de esplenócitos responsivos a E7 de forma específica, em animais imunizados com a vacina de DNA que expressa FlaE7 .....	63
4.2.5 Esquema vacinal terapêutico e proteção ao desafio com células TC-1 .....	66
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	68
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	75
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	77

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer do colo uterino é o segundo tipo de câncer mais comum entre as mulheres, com aproximadamente 500 mil novos casos mundiais por ano, sendo responsável pelo óbito anual de, aproximadamente, 230 mil mulheres (Zur-Hausen 2006; Wu, 2007). A incidência desta patologia é aproximadamente duas vezes maior em países menos desenvolvidos quando comparados a países desenvolvidos. A faixa etária de maior acometimento está entre 20 a 29 anos, sendo que o risco aumenta, paulatinamente, até a faixa etária entre 45 a 49 anos. (Mahdavi e Monk, 2005). Conforme dados estimados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), em 2008, no Brasil, o número já ultrapassa 18.680 com um risco estimado de 19 casos a cada 100 mil mulheres.

Os primeiros relatos de câncer cervical foram identificados por Schauenstein (1908) e Rubin (1910) que relataram lesões histológicas pré-cancerosas do colo uterino. A análise foi feita a partir da comparação das propriedades morfológicas de epitélios normais, contra alterações presentes em lesões pré-cancerosas. Tal critério ainda é utilizado em exames anatomopatológicos (Schnider et al. 2000). Em 1950, Gagnon observa a ausência de câncer cervical entre religiosas no Canadá (Gagnon, 1950). Corroborando com este estudo, Boyd e Doll (1964) sugeriram que fatores de risco como atividade sexual iniciada de maneira precoce, mulheres de múltiplos parceiros, diversas gestações ou mesmo aquelas que possuíam outras doenças sexualmente transmissíveis; apresentavam estatisticamente mais chances de desenvolverem câncer cervical (Boyd-Doll, 1964). Cada vez mais surgiam evidências que um componente transmissível sexualmente estava intimamente relacionado com o câncer cervical, no entanto, o agente etiológico ainda permanecia desconhecido.

Em 1974, Harald zur Hausen detectou seqüências específicas de DNA do vírus HPV em biopsias de câncer cervical por captura híbrida. (Zur Hausen, 1974). Atualmente, dados epidemiológicos indicam que 99% dos casos de câncer cervical estão associados à presença do DNA do vírus HPV (Walboomers et al., 1999; Roden et al, 2004). Meisels e Fortin (1976) reportaram a existência de um efeito citopático em esfregaços cérvico-vaginais provenientes de lesões displásicas, e o correlacionaram com a presença do vírus HPV no epitélio (Meisels e Fortin, 1976). Os exames citológicos cérvico-vaginais podem identificá-los pela demonstração de um halo claro em volta do núcleo, apelidado de “olho de coruja”, além de freqüente binucleação e discariose (Meisel, 1981). Além disso, o exame citológico cervico-vaginal pode identificar lesões precursoras ao carcinoma cervical, as quais, de acordo com uma

escala proposta inicialmente por Richart, em 1967, são classificadas em Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) de Grau I, II ou III que corresponde às progressivas alterações morfológicas apresentadas pelas células do esfregaço amostral (Richart, 1964). O sistema Bethesda, proposto em 1991, tentou simplificar esta classificação agrupando as lesões em de baixo grau (NIC I) e as de alto grau (NIC II e NIC III) como pode ser ilustrado na figura 1. Além disso, propõe diferenciação de carcinoma *in situ* e carcinoma invasor, onde ocorre a disseminação de metástases (Koss, 1993).

Trabalhos mostram certa pluralidade das famílias de HPV (Gissman et al., 1977; Orth et al., 1977). Atualmente, mais de 200 tipos de HPV foram descritos (Bibbo & Filho et al., 1998; Viliers et al., 2004). Com isso os HPVs podem ser agrupados em de baixo risco e alto risco. Os HPVs de baixo risco estão associados a lesões intraepiteliais de baixo grau (LSIL) e em verrugas anogenitais benignas. Os HPVs de alto risco estão relacionados a lesões intraepiteliais de alto grau (HSIL) no colo uterino, vagina, vulva e pênis (Stevens et al., 2002), e carcinoma de cabeça e pescoço (Badaracco et al., 2000; Smith et al., 2000; Rouwley et al., 1998; Paz et al., 1998; Thonsom et al., 1997, Riviere et al., 2001). Dentre os HPV's de alto risco, destacam-se os do tipo 16 e 18, que juntos perfazem mais de 70% de todos os casos de câncer cervical. (Zur Hausen, 2002; Govan, 2008). O HPV do tipo 16 perfaz mais de 50% dos casos de câncer cervical (Zur Hausen, 2006).

Os vírus de papilomas enquadram-se na família Papovaviridae, são vírus de simetria icosaédrica, não envelopados, que possuem especificidades extrínsecas aos seus hospedeiros. Assim, CRPV (*Cottontail rabbit papillomavirus*) infectam apenas coelhos, enquanto que BPV (*Bovine Papillomavirus*) relaciona-se com bovinos, COPV (*Canine Oral Papillomavirus*) tem afinidade pela mucosa oral de cães e HPV (*Human Papillomavirus*) infecta humanos (Breitburd e Coursaget, 1999, Staley, 2003). Além de serem específicos aos hospedeiros, também apresentam tropismo a determinados tipos de epitélios, sendo classificados como mucosotrópicos, os quais acometem mucosas ou cutâneotrópicos que infecta o epitélio queratinizado (Govan, 2008). A especificidade destes microorganismos está relacionada com o *attachment* da partícula viral à célula alvo, que se deve a proteína do capsídeo (L1). Os receptores para L1 são cadeirinas existentes nas células das camadas basais do epitélio. Tal fato pode explicar a especificidade do hospedeiro e o tropismo tecidual, devido à acentuada variação polimórfica existente tanto em cadeirinas, quanto na proteína L1 que permitem especificidade local (Walsh e Doherty, 1993; Staley et al., 2007).

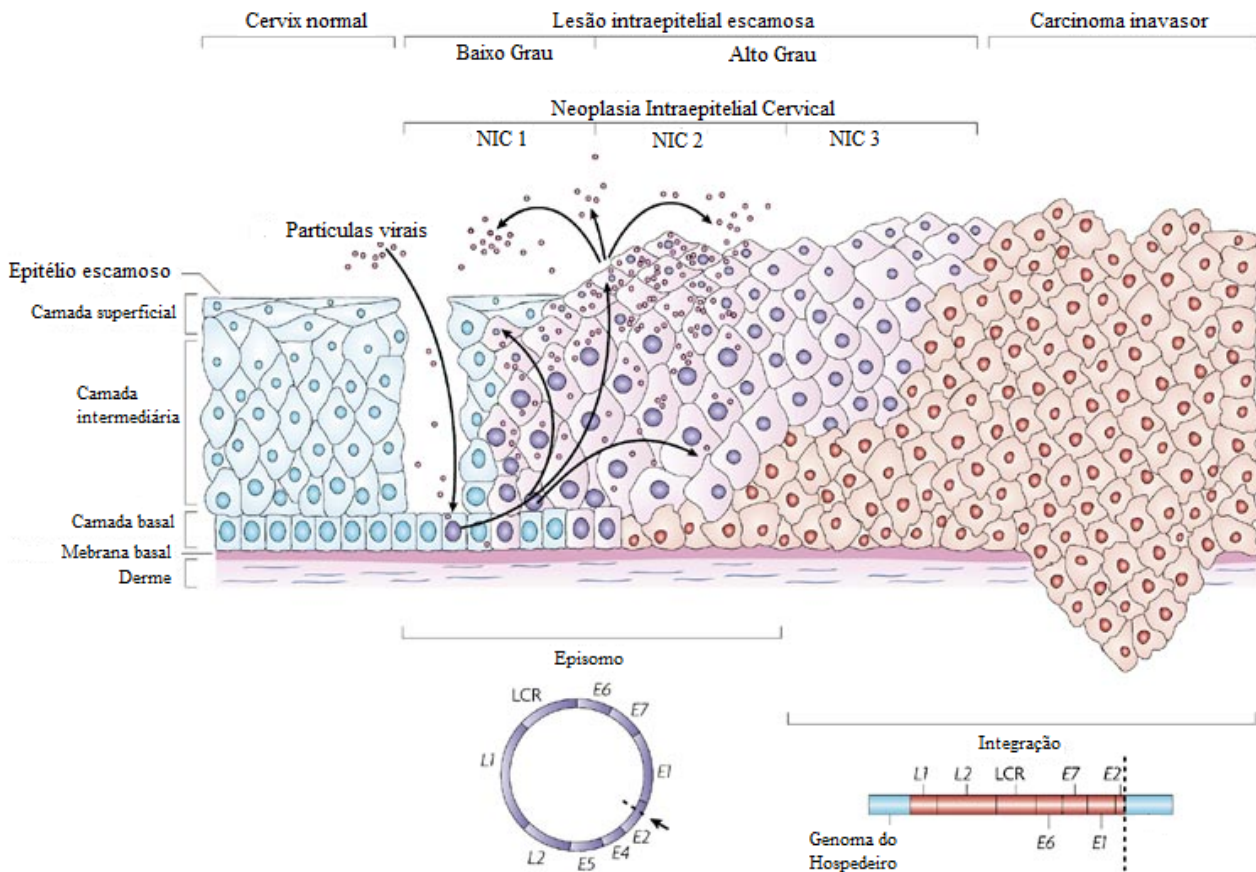
A proteína L1 é o alvo de vacinas profiláticas, como a Gardasil, licenciada para uso em humanos, (Merck Sharpe and Domme) cujo objetivo é a produção de altos títulos de anticorpos contra esta proteína, prevenindo assim infecções por HPV (Govan, 2007; Suzik et al, 1995). A produção da vacina consiste em expressar os monômeros de L1 *in vitro*, que se agregam autonomamente, constituindo estruturas semelhantes às partículas virais (*Virus like-particles*), porém, isentos de informação genética do vírus (Govan, 2007). Entretanto, a ausência de proteção cruzada entre as diferentes L1 existentes nos mais de 200 tipos de HPV descritos, incide na maior dificuldade de estratégia vacinal (Breitburd, 1999). Conseqüentemente, trabalhos recentes procuram formular uma vacina em que a resposta imune montada seja cruzada entre os tipos de HPV, para isto começou-se a empregar L2 ao invés de L1 (Zur Hausen, 2007).

O genoma do HPV é formado por uma única molécula de DNA de dupla fita circular, de aproximadamente 8.000 pares de bases. Pode ser dividido em duas regiões codificantes e uma região reguladora, conforme indicado na figura 1. A região denominada URR (*Upstream Regulatory Region*) ou LCR (*Long Control Region*), não possui seqüências codificantes (*Open Reading Frames - ORF's*). É formada essencialmente de seqüências reguladoras e origem de replicação. As regiões codificantes são; a Região Precoce (*Early Region*) e a Região Tardia (*Late Region*), que são assim determinadas devido à fase do ciclo viral em que seus genes são expressos. (Zeng et al., 2006). A região tardia possui apenas dois genes e são responsáveis pela formação das proteínas do capsídeo, que são L1 e L2. A região precoce possui os genes E1, E2, E4, E5, E6 e E7, e como o próprio nome prevê, são expressas em momentos iniciais do ciclo viral (Zeng et al., 2006).

Após a infecção, o genoma viral é liberado no citoplasma das células hospedeiras. Inicia-se a fase epissomal (Fig. 1), em que as cópias do genoma viral permanecem circulares e com baixo número de cópias por célula. A expressão gênica do vírus depende do grau de diferenciação da célula hospedeira. A proteína E1 está relacionada à replicação do DNA viral, funciona como uma helicase que ajuda a desenrolar o DNA viral (Staley et al., 2007). O gene E2 codifica uma proteína que é responsável pelo controle da transcrição dos demais genes virais. A proteína E2 possui conformação estrutural específica para o reconhecimento de seqüências palindrômicas, ACCN<sub>6</sub>GGT, localizadas na região reguladora do genoma viral (LCR). (Silva et al., 2002; Lasaro et al., 2004; Zur et al., 2005). De acordo com sua concentração no interior da célula, a proteína E2, controla a expressão dos demais genes virais, estimulando ou inibindo sua transcrição destes (Lasaro et al, 2004). A proteína E5 estimula a

proliferação celular através da interação com várias proteínas celulares, entre elas, o receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR), reduzindo sua degradação. Além disso, pode induzir um estado de ativação mesmo na ausência do agonista. Isso estimula a expressão de vários proto-oncogenes e fatores estimulantes da divisão celular. Possui importância crucial nos estágios precoces da transformação celular, mas não é mais expresso em estágios tardios no ciclo viral. (Crusius et al., 1997; Staley et al., 2007, Zur et al., 2000). A proteína E4 é expressa somente em extratos mais superiores do epitélio infectado, a qual é responsável por modificações no citoesqueleto que facilitam a montagem e liberação das partículas virais. Paralelamente, L1 e L2 estão sendo expressas, as partículas virais são montadas pela agregação de L1 e L2 que aprisionam uma cópia do genoma viral na forma de plasmídeo (Middleton et al., 2003). Partículas virais infectantes são formadas apenas durante a fase episomal.

A maioria das infecções por HPV é transiente e assintomática. (Moscicki et al., 2004). Em mulheres jovens e imunocompetentes, a infecção pode persistir por até 18 meses, até serem eliminadas espontaneamente pelo sistema imune (Nassiel et al., 1986; Syrjanen et al., 1996; Duggan et al., 1998, Roden et al., 2004). Entretanto, se a infecção viral persistir pode ocorrer à integração do genoma viral ao genoma da célula hospedeira. Tal processo ocorre a partir da linearização do genoma viral e posterior inserção do mesmo. O ponto de ruptura do DNA viral acontece justamente na região reguladora E2, porém ficam intactas as regiões codificantes de E6 e E7. Logo, o efeito regulador de E2 deixa de existir, permitindo que os genes E6 e E7 sejam expressos de maneira exacerbada, corroborando para o progresso da malignização celular (Zur et al., 2000; Laimins et al., 2005; Lasaro et al., 2004). No entanto, evidências apontam que somente a ação das proteínas E6 e E7, não são suficientes para a progressão do tumor (Zur Hausen, 2000). A infecção viral é necessária, mas não determinante para a formação do câncer cervical (Moore et al., 2004). Fatores genéticos intrínsecos ao hospedeiro e o tipo do HPV influenciam bastante o curso da transformação do epitélio infectado (Moscicki et al., 2004).



Nature Reviews | Cancer

**Figura 1. Ciclo do HPV.** Representação esquemática mostrando a infecção de camadas basais do epitélio escamoso pelo HPV e início da fase episomal com produção de novas partículas virais infectantes. Quando a infecção pelo HPV torna-se persistente, há risco de integração do genoma viral ao genoma da célula hospedeira, que ocorre pela quebra do genoma viral. A expressão das oncoproteínas E6 e E7, contribuem para a transformação do epitélio. Conforme indicado acima, a lesão neoplásica decorrente pode ser classificada de acordo com sua gravidade. (Figura retirada de Zur Hausen 2006).

As proteínas E6 e E7, com suas características pleiotrópicas, atuam sinergicamente favorecendo eventos que levam a uma crescente instabilidade genômica na célula infectada (Zur et al., 2000; Laimins et al., 2005). O principal alvo da proteína E6 é a proteína supressora de tumores p53. A formação de um complexo inativo entre E6 e p53 favorece sua degradação pelo sistema proteolítico ubiquitina. Isso tem como consequência, reduzidos níveis basais de p53. Sabe-se que a proteína supressora de tumor p53 está envolvida na regulação do ciclo celular (Oren et al., 2003; Slee et al., 2004). Em resposta a danos no DNA e/ou outros fatores de stress celular, a p53 induz a expressão de vários reguladores que impedirão a divisão da célula e induzindo-a a entrar em apoptose. (Laimins et al., 2005). Reduzidos níveis intracitoplasmáticos de p53, tornam a célula vulnerável a danos mutacionais, integração de DNA exógeno ao genoma hospedeiro e instabilidade cromossomal (Laimins et al., 2005; Zur et al., 2000; Lasaro et al., 2004). A proteína E6 também ativa a telomerase aumentando a sobrevivência de células infectadas (Klingelutz et al., 1996). A principal ação da proteína E7 é ligar-se à proteína supressora de tumor retinoblastoma (pRb), liberando o fator de transcrição E2F. Uma vez livre, o E2F ativa a expressão de vários genes indutores da proliferação celular. Entre eles estão Timidina kinase, c-myc, diidrofolato redutase e DNA polimerase alfa. (Zur et al., 2000). A proteína E7 é uma fosfoproteína com uma região ligadora de zinco (dedo de zinco), que possui aproximadamente 98 resíduos de aminoácidos (Zur et al., 2000; Laimins et al., 2005).

Os mecanismos de escape dos vírus sobre sistema imune constituem uma importante estratégia para a persistência da infecção. Com relação ao HPV, isto se transpõe à célula infectada que poderá se transformar numa célula tumoral. As oncoproteínas E6 e E7 além de suas ações no controle do ciclo celular, modulam o sistema imune de forma que as células infectadas tornam-se pouco imunogênicas. A proteína E7 pode modular negativamente a expressão de genes induzidos por IFN- $\alpha$  (Bernard et al., 2000), inibir a ativação do promotor IFN- $\beta$  (Park et al., 2000) e favorecer menor expressão de moléculas co-estimuladoras, como CD80 e CD86, nas células infectadas pelo HPV. Tal processo acarretaria na tolerância dos antígenos tumorais apresentados por estas células, principalmente, E6 e E7 (Tindle, 2001).

A literatura mostra que o mecanismo de tolerância em pacientes com lesões de alto grau para carcinoma cervical relacionado ao HPV já está estabelecido, pois nestes indivíduos observa-se pobre resposta celular, mediadas por células T CD8<sup>+</sup>, às proteínas virais, e em alguns casos, desvio para respostas Th2 (al-Saleh et al., 1998; Clerici et al., 1997). Logo, as vacinas terapêuticas podem ser uma importante estratégia para subverter a evasão do sistema



imune, podendo trazer como consequência o controle da progressão tumoral. A etiologia viral do câncer cervical reforça o uso de estratégias vacinais para sua contenção. As oncoproteínas virais, E6 e E7 não são expressas em células que não estão infectadas, isso as faz potenciais alvos de respostas imunes adaptativas, sobretudo de linfócitos T CD8<sup>+</sup> específicos. Diante disso, o emprego destes antígenos em vacinas terapêuticas exige estratégias que favoreçam a geração da resposta imune desejada e na intensidade eficaz.

Entretanto, a proteína E7 em sua forma isolada é pouco imunogênica (Natale et al., 2000). Dados na literatura reportam o uso de E7 associado a vários adjuvantes diferentes, como *Heat-Shock proteins (HSP)* (Chen et al., 2000), moléculas que influenciam o fluxo intracitoplasmático de antígenos como a calreticulina (Cheng et al., 2001), *Lysosomae-associated membrane protein (LAMP)*(Ji et al., 1999), exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* (Hung et al., 2001),  $\gamma$ -tubulina (Hung et al., 2003) e a fusão de E7 aos 80 primeiros aminoácidos da moléculas de MHC-I (Brulet et al., 2007). Ao contrário de vacinas profiláticas, nenhuma vacina terapêutica está disponível para o uso em humanos ainda. A possibilidade de usar adjuvantes, como estímulos pró-inflamatórios, repercutiria na montagem de resposta imune na qual se observa a maturação de células apresentadoras de antígenos e produção de citocinas pró inflamatórias que viabilizam um microambiente favorável a respostas efectoras ao invés de tolerigênicas (Frazer et al., 2001).

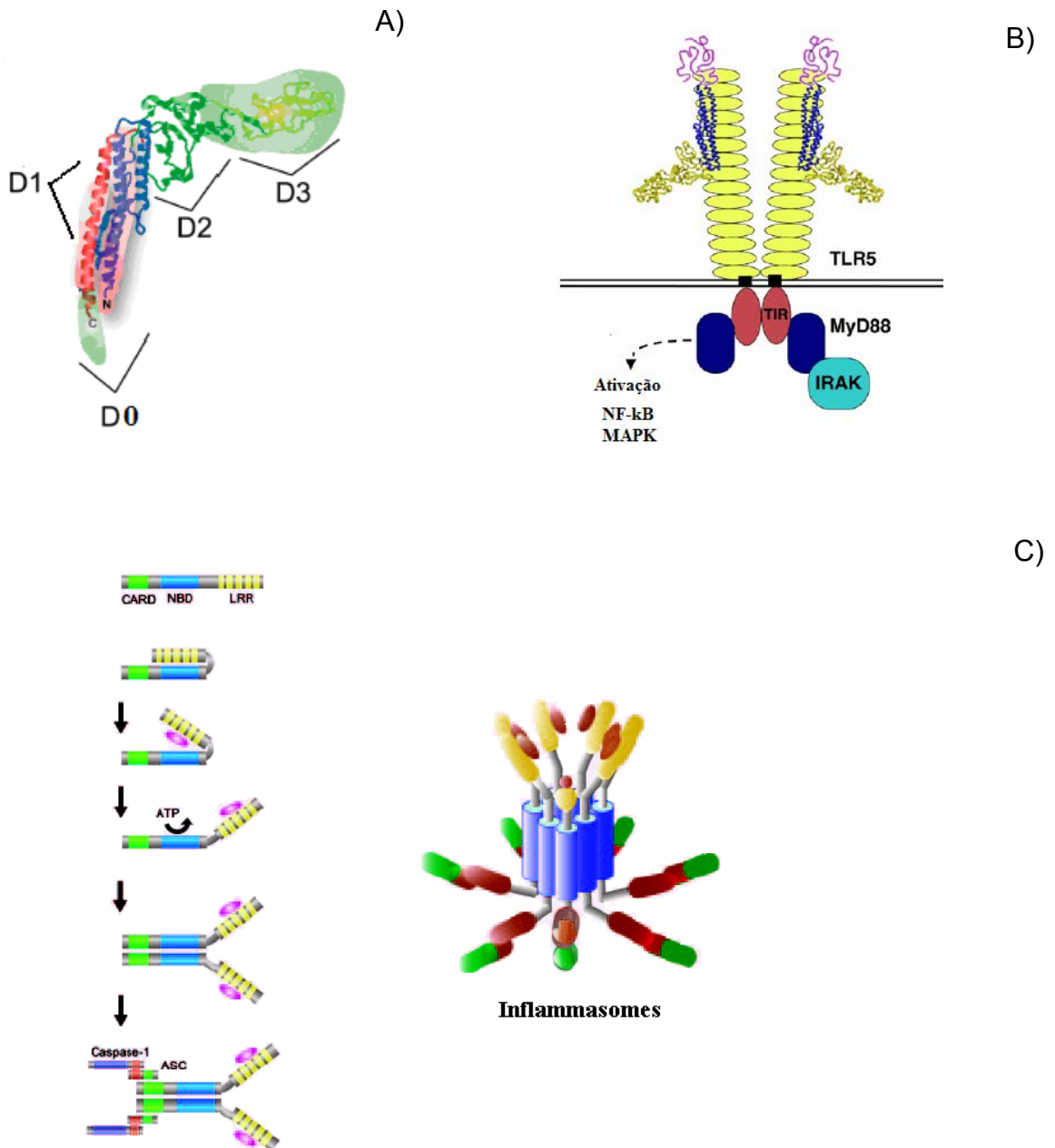
Os adjuvantes são componentes importantes à formulação de vacinas (O'Hagan e Valiante, 2003) que podem ter ações imunomoduladoras ou atuar como sistemas de entrega dos antígenos vacinais. (Lima et al., 2004). A propriedade de modular o sistema imune, deve-se em parte, a capacidade de interação com receptores de padrões moleculares associados à patógenos (*Pathogen-associated molecular patterns, PAMP*). Como exemplo pode-se citar os receptores semelhantes à *Toll (Toll like receptors, TLR)* (Akira, 2004) e a família dos receptores *Nod-like (Nucleotide oligomerization domain)*. (Inohara et al., 2005). A possibilidade de sinergia quando diferentes receptores inatos são estimulados podem intensificar a resposta imune adaptativa elaborada (Trinchieri et al., 2007). O presente trabalho elegeu a flagelina como adjuvante devido à sua interação com os receptores *TLR* do tipo 5 (TLR 5), quando reconhecida no ambiente extracelular, e receptores *NLR* do tipo Ipaf, quando no ambiente intracitoplasmático.

A flagelina é a unidade monomérica que polimerizada em cadeia, forma a haste principal do filamento flagelar da bactérias (fig. 2A). Em geral, são necessárias em torno de 200.000 unidades de flagelina polimerizadas para a formação do filamento flagelar (Newton et al,

1991). O flagelo bacteriano é uma complexa organela, composta de corpo basal, gancho, motor e o filamento flagelar, propriamente dito. Confere a bactéria mobilidade, capacidade de adesão e invasão nas células do hospedeiro, bem como propriedades quimiotáticas e imunomoduladoras (Mizel et al., 2003). Dentre as bactérias patogênicas que possuem flagelo, pode-se citar os agentes causais de pneumonia como *Pseudomonas*, *Burkholderia* e *Legionella* e os agentes de gastroenterites como as do gênero *Escherichia*, *Campylobacter* e *Salmonella*. A flagelina utilizada neste trabalho foi a FliCd de 495 resíduos de aminoácidos proveniente de *Salmonella enterica* sv Muenchen (número de acesso AAL20871) (Steiner et al., 2007).

Apesar da grande diversidade existente entre diferentes flagelos de espécies distintas, a estrutura da flagelina mostra regiões de seqüências altamente conservadas, localizadas em ambas as extremidades, amino e carboxi terminais. Estas regiões são conservadas por serem primordiais para a função; como estruturação do flagelo e interação com receptores moleculares do hospedeiro. As regiões conservadas possuem domínios formados por motivos de  $\alpha$ -hélice que podem ser divididos em D0 e D1. O Domínio D0 é responsável pela polimerização de outros monômeros, enquanto que D1 está envolvido na sinalização imunológica inerente à flagelina (Mizel et al., 2003; Yonekura et al., 2003) (Fig. 2a).

Na região central da flagelina, existe uma região bastante variável, sobretudo em relação ao tamanho e seqüência dos aminoácidos, intitulada de região hipervariável (Mizel et al., 2003). É formada por domínios, D2 e D3, de motivos  $\beta$ -pregueados que são expostos na superfície externa do filamento flagelar (Fig. 2 A) (Mizel et al., 2005; Yonekura et al., 2003). Essa região é responsável pelo polimorfismo existente entre flagelinas de espécies diferentes. Numa mesma espécie, essa divergência pode chegar a 30%. Nesta região residem os epítomos B que são a base para a sorotipagem H. (Yonekura et al., 2003; Ramos et al., 2004; Murthy et al., 2004; Flynn et al., 1990).



**Figura 2. Organização estrutural e funcional das flagelinas bacterianas.** Em A, é demonstrada a conformação estrutural da flagelina e sua divisão em domínios D0, D1, D2 e D3. Em B, está ilustrado a interação da flagelina com receptores TLR5, e a consequente a ativação de NF-kB e Map-kinases. Em C, a organização geral dos receptores *NOD-like* e sua divisão em domínios ricos leucina (*LLR*), na região central os domínios de oligomerização ligante-nucleotídio (*NBD* ou *NOD*) e domínio de recrutamento e ativação de caspases (*CARD*). Quando ligada a flagelina, na figura representada em vermelho, assume conformação oligomérica e converte pro-caspase-1 em caspase 1. (Em A, figura adaptada de Smith et al., 2003; em B figura retirada de Ramos et al., 2004 e em C, figura retirada de Carneiro et al., 2008).

Na região hipervariável, antígenos podem ser fusionados de forma a serem carregados para apresentação ao sistema imune adaptativo. Isso tem importância reforçada, pelo fato de que, as regiões conservadas da flagelina permanecem intactas no que diz respeito à estrutura e função, continuando assim a sinalização do sistema imune inato, que é mediado pelas regiões conservadas D1 amino e carboxi terminal (Murthy et al., 2004; Newton et al., 1991, Verma et al. 2005).

A flagelina possui potente atividade imunoindutora, pois tem a propriedade de interagir-se com TLR-5 (Fig. 2 B). Os TLR-5 são expressos na membrana citoplasmática e reconhecem a flagelina no ambiente extracelular, estes receptores estão expressos na mucosa do trato gastrointestinal. Smith e colaboradores (2003) demonstraram especificamente que as regiões da flagelina, entre os resíduos 78-173 da porção amino-terminal D1 e os resíduos 395-444 da porção carboxi-terminal D1, é que estão envolvidas na interação com TLR5. A interação da flagelina com este tipo de receptor resulta na constituição de resposta imune pró-inflamatória, no sítio da infecção (Mizel et al., 2005; Ramos et al., 2004), pois se ativa a via de sinalização NF-kB, resultando na produção de várias citocinas pró-inflamatórias importantes, entre elas NO, IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), atraindo para o sítio infeccioso macrófagos, células dendríticas e linfócitos B. Estas células favorecem a apresentação de antígenos aos linfócitos TCD8+ possibilitando a constituição de resposta T citotóxica específica, elevando a resposta imune adaptativa.

No entanto, é importante salientar que as células apresentadoras de antígenos (APCs) em situações de infecção, são potenciais alvos para a invasão bacteriana, pois podem viabilizar a entrada do microorganismo no hospedeiro devido às estratégias de escape apresentadas pelo patógeno. Assim, existe um delicado balanço entre a reação inflamatória desencadeada pela flagelina e propagação da infecção do patógeno o qual ela está associada (Steiner et al., 2207).

Uma vez no ambiente intra-citoplasmático, as bactérias induzem morte da célula hospedeira e posteriormente ocorre a liberação da progênie bacteriana. Brennan e colaboradores (2000) demonstraram que a morte de macrófagos infectados com *Salmonella Typhimurium* era mediada por caspase-1. No entanto, a fragmentação do DNA resultante deste mecanismo exhibe padrões difusos bem distintos de quando comparado a apoptose induzida por compostos químicos. Boise e colins (2001) sugeriram que a morte induzida por flagelina é um fenômeno que não pode ser classificado como apoptose clássica e nem como necrose, pois os eventos celulares disparados não se enquadram especificamente em nenhuma das duas vias. O termo *pyroptosis* foi então sugerido posteriormente por Cookson e Brenam (2001). Estes

autores afirmaram também que este fenômeno, seria fundamental para a promoção da doença, atraindo macrófagos, infectando-os e espalhando a infecção para órgãos como fígado e baço. Estratégia tal que aparenta ser provocada deliberadamente pelo patógeno. Trabalhos independentes demonstraram o envolvimento direto de sistemas de secreção do tipo III (T3SS) na translocação de flagelina de *S. enterica* para o citoplasma de células do hospedeiro. (Schlumberger et al., 2005; Sun et al., 2007). Por outro lado, *Legionella pneumophila* utiliza o sistema de secreção tipo IV (T4SS) para a translocação de flagelina para o ambiente citoplasmático (Miao et al., 2007).

O reconhecimento de padrões moleculares associados à patógenos no ambiente intracitoplasmático é realizado por outra classe de moléculas do sistema imune inato, as *NOD like receptors* (Inohara et al. 2005; Carneiro et al., 2008; Wilmanski et al., 2008). No caso da flagelina, os receptores intracelulares envolvidos em seu reconhecimento são Ipaf (NLRC4) e Naip5 (Birc1) (Amer et al., 2006; Franchi et al., 2006; Miao et al., 2006; Lighfield et al., 2008) (Fig. 2 c). Quando estimulados, esses receptores ativam a via de NF- $\kappa$ B, da mesma forma que os receptores *Toll like* o fazem. (Franchi et al., 2008). Porém, o reconhecimento da flagelina por Ipaf e/ou Naip5 leva à ativação de caspase-1, evento chave para o desencadeamento do *inflammation*. Neste fenômeno subunidades NLR assumem conformação oligomérica ativa, responsável pela proteólise enzimática do precursor pro-caspase 1 (Franchi et al., 2007). Quando ativada, a caspase-1 induz uma cascata de sinalização, que leva à clivagem do DNA genômico e eventos adicionais de morte celular programada. Além disso, ocorre a maturação proteolítica de IL-1 $\beta$  e IL-18, que são secretados (Sutterwala et al., 2007).

Diversas estratégias vacinais podem ser empregadas para entrega de antígenos. O regime vacinal, número de doses, dosagem, via de administração, adjuvante empregado são variáveis que influenciam diretamente o tipo e a intensidade da resposta imunológica gerada. As vacinas de DNA são utilizadas desde 1990, quando Wolff e colaboradores reportaram a habilidade de plasmídios (anéis circulares de DNA extracromossômicos) em expressar proteínas quando injetados diretamente em mamífero (Wolff, 1990). Mais tarde, alguns pesquisadores utilizaram vacinas de DNA capazes de codificar antígenos de influenza e verificaram a geração de linfócitos T CD8<sup>+</sup> específicos. Posteriormente, ensaios de proteção foram realizados e demonstraram a proteção de animais imunizados frente à dose letal de influenza (Ulmer et al., 1993). Outra vantagem com relação às moléculas de DNA, reside no fato de serem passíveis a manipulações pela tecnologia do DNA recombinante, o que acarreta numa série de facilidades como a geração de proteínas heterólogas e endereçamento de

proteínas para compartimentos específicos no citoplasma. Possuem ainda algumas vantagens adicionais, entre as quais se destacam a facilidade de produção e conseqüente redução de custos. Além disso, possui boa estabilidade, o que permite seu transporte na ausência de “cadeia fria” facilitando sua logística de distribuição (Liu, 2003).

A utilização de vetores vacinais bacterianos baseados em cepas de salmonelas vivas atenuadas são sistemas de entrega de epítomos vacinais bem sucedidos. Esta estratégia traz vantagens inerentes, como a possibilidade de ativação do sistema imune inato por uma diversidade de agonistas presentes em patógenos como *Salmonellas enterica*. Além disso, soma-se o fato de que a entrega desses antígenos ocorrerá em órgãos linfóides secundários associados a mucosas. Entretanto, antes de usar cepas bacterianas potencialmente patogênicas como vacinas, é preciso utilizar algum mecanismo de atenuação de sua patogenicidade (Mastroeni et al., 2000). A cepa SL5928 é um mutante auxotrófico incapaz para a biossíntese compostos relacionados ao ácido para-aminobenzóico (PABA) (Mastroeni et al., 2000). Mutações no gene *AroA* foram responsáveis por esse fenótipo. Como não consegue obter esses metabólitos dos tecidos do hospedeiro, sua permanência é transiente. Logo, a utilização de vetores vacinais bacterianos como sistemas de entrega de antígeno é uma estratégia vantajosa tanto no âmbito biológico quanto econômico. Diante deste cenário, o presente trabalho buscou estabelecer instrumentos os quais viabilizassem o processo de imunização, trazendo como conseqüência uma resposta imunológica específica eficaz e efetiva frente a neoplasia induzida pelo HPV. Vislumbrou-se a perspectiva da utilização das propriedades imunológicas inerentes à flagelina, como modulador do sistema imune e avaliar se existe algum potencial anti-tumoral.

## 2 OBJETIVO

O objetivo principal do trabalho foi testar diferentes estratégias vacinais contra tumores induzidos pelo HPV-16 envolvendo imunização parenteral com vacinas de DNA que codificam a oncoproteína E7 geneticamente fusionada à flagelina de *S. enterica* e imunizações por via oral com linhagens vacinais de *S. Dublin* capazes de expressar as mesmas flagelinas recombinantes fusionadas à oncoproteína E7 do HPV-16.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Linhagens bacterianas e cultura de células eucariontes

A cepa de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  foi utilizada para clonagens e purificação das vacinas de DNA construídas. (Maniarts et al., 2005). A cepa de *S. enterica* sv Dublin SL5928 é desprovida de genes que codificam flagelina, sendo desta forma incapaz de montar a estrutura flagelar (Mastroeni et al. 2000). Esta foi utilizada para a construção dos vetores vacinais bacterianos aqui empregados. Ambas as cepas foram cultivadas em meio Luria-Bertani a 37 °C sob agitação de 120 rpm em *shacker* durante 12 horas. Durante a construção das salmonelas vacinais utilizou-se o antibiótico de seleção ampicilina na concentração final de 100  $\mu$ g/mL. As clonagens e propagações dos vetores baseados no vetor pPoly utilizou-se canamicina como antibiótico de seleção na concentração de 50  $\mu$ g / mL.

Células das linhagens MRC5, CHO, HEK e COS7 foram cultivadas em meio DMEM (Gibco-BRL) com 10% de soro fetal bovino (Cultlab), incubadas a 37 °C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Foram utilizadas em experimentos que avaliaram a expressão *in vitro* das vacinas de DNA. Células de linhagem TC-1, cultivadas sob as mesmas condições, foram inoculadas em camundongos C57 BL6 cujo objetivo foi a formação de tumores, tornando possível a avaliação da eficácia do modelo vacinal proposto. Foi adicionada ao meio gentamicina, na concentração final de 10 $\mu$ g/mL em caráter profilático. Exceções ao uso desse antibiótico aconteceram quando foi necessária a padronização de transfecções, onde recomendações dos fabricantes sugeriam a possibilidade de interferência ou queda na eficiência de expressão.



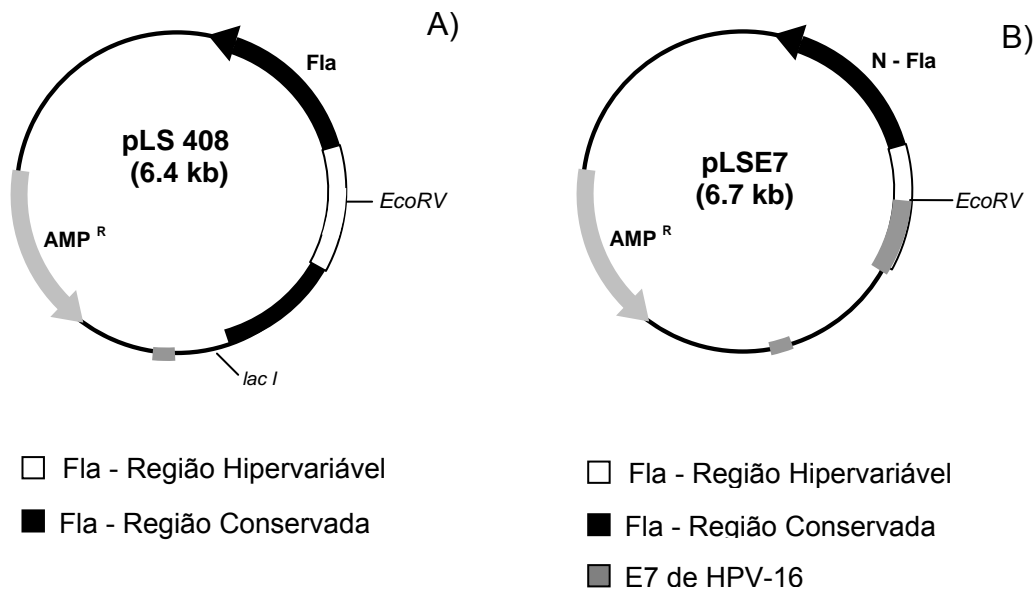
### **3.2 Animais utilizados**

Camundongos machos e fêmeas da linhagem C57BL6 de 8 a 12 semanas fornecidos pelo biotério da parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas II da Universidade de São Paulo (São Paulo – SP), foram mantidos em condições padronizadas, receberam ração autoclavada e suplementação nutricional com Vitagold®. Os protocolos de experimentação foram devidamente analisados e aprovados pela comissão de ética em experimentação animal (CEEA) de maneira prévia à condução dos experimentos e seguem os padrões propostos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

### **3.3 Construção das salmonelas vacinais**

A cepa SL5928, proveniente de *S. enterica* sv Dublin, serviu de plataforma para a construção das cepas SL5930 e SL FliE7, que foram transformadas com os plasmídeos construções pLS408 e pLS-408 E7c respectivamente (Fig. 3). O método adotado foi a eletroporação, que foi realizada em cubetas apropriadas, num eletroporador (Eppendorff) sob 200 Ohms e capacitância de 25µF e 2500V. A cepa SL5930 possui o gene codificante para a flagelina, porém não possui o gene codificante para E7. Como controle adicional, foi utilizada a cepa SL5928 que não expressa flagelina e nem E7, mas conserva fatores intrínsecos a estrutura bacteriana que são potenciais ativadores de sistema imune inato como LPS, CpG e outros. A cepa SL5928 não é capaz de expressar flagelina e montar o flagelo. Logo, esta não possui mobilidade própria e assim é incapaz de migrar em ágar semi-sólido.

Conforme Verna e colaboradores (2005), a verificação da mobilidade, pode ser feita em placas com meio semi-sólido onde foi feito um inóculo de forma pontual no centro da placa. Depois de 12 horas de incubação, verifica se há a presença da bactéria apenas no local do inóculo ou sua dispersão ao longo da placa. Isto possibilita conferir a propriedade do microorganismo de montar um flagelo funcional. A extração de flagelina é um procedimento que consiste romper os flagelos bacterianos por força mecânica.



**Figura 3. Representação esquemática dos vetores de expressão em procariotos.** O plasmídeo pLS408 transporta o gene da flagelina *FliC<sub>d</sub>* (1482pb), aqui abreviado por *Fla*, possui uma região hipervariável flanqueada por regiões conservadas. Na região hipervariável, encontra-se o sítio de restrição para *EcoRV* (A). O plasmídeo pLSE7 (B) codifica a fusão de E7 do HPV-16 na porção hipervariável da flagelina, conservando a porção N-terminal. Ambos os vetores foram construídos para expressão em cepas de salmonelas vacinais.

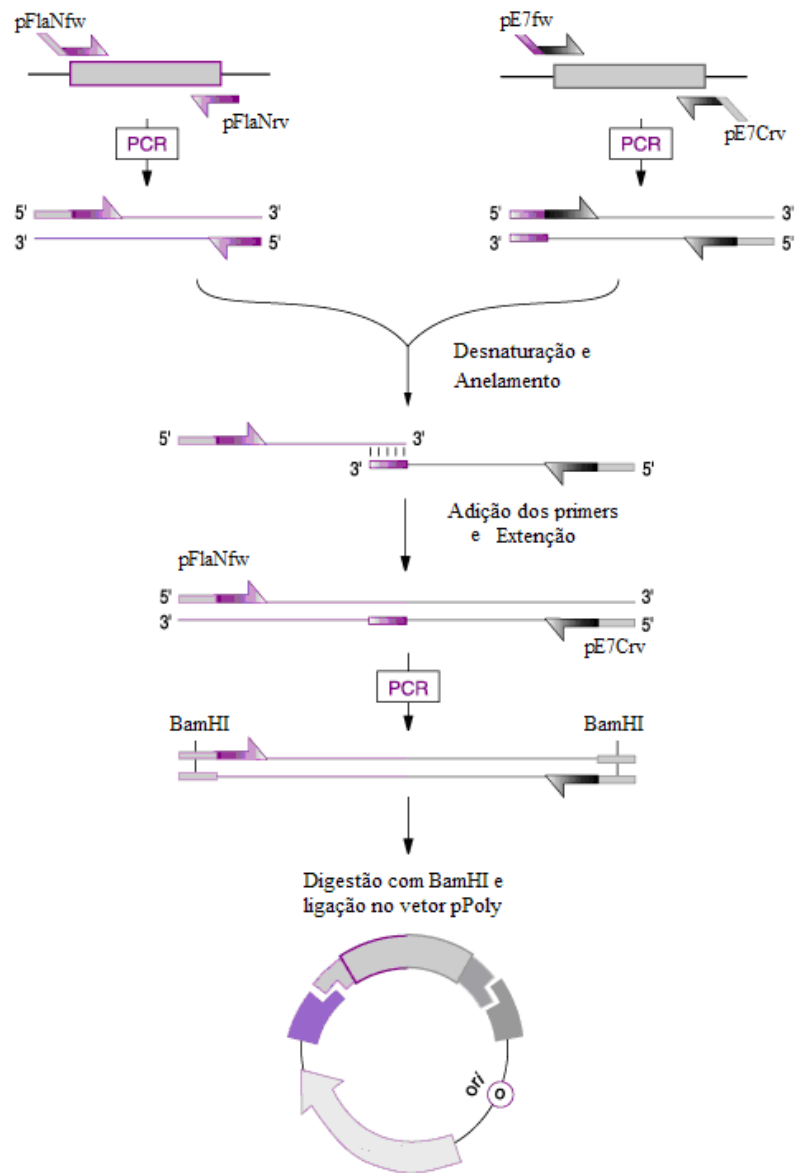
### 3.4 Construção das vacinas de DNA

A sequência aberta de leitura completa da oncoproteína E7 foi amplificada por PCR tendo como molde o DNA genômico do vírus HPV-16. Para isso foram utilizados os inicializadores *pE7fw* (3) e *pE7Crv* (4) listados na tabela 1. Paralelamente, o fragmento relativo à expressão dos primeiros 60 aminoácidos de E7 foram amplificados com os inicializadores *pE7fw* (3) e *pE7Δrv* (5). O ciclo de temperatura do PCR foi: 95°C por 1 minuto, 60°C (TM) por 1,5 minutos e 72°C por 1 minuto. O termociclador foi programado com 30 ciclos, precedidos de 5 minutos a 95°C e finalizando com 72°C por 10 minutos. A porção N-terminal da flagelina foi amplificada a partir do plasmídio pLS 408 utilizando os inicializadores *pFlaNfw* (1) e *pFlaNrv* (2), mostrados na tabela 1. Este fragmento possui uma região de complementaridade com E7c e E7Δ de 21 nucleotídeos onde ocorrerá a sobreposição dos fragmentos. O esquema de *SOEing* é mostrado na figura 4.

**Tabela 1:** Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos fragmentos a serem fusionados pela técnica *SOEing*.

Oligonucleotídeo	Sequência
1 pFlaNfw	attattctgggatccaaggaaaagatcatggca
2 pFlaNrv	acatccacatagaggtacgtatagtcataacgagacccgaca*
3 pE7fw	*acagcccagagcaataactgatatgcatggagatacacctaca
4 pE7Crv	aactggtagaaatttaaactagaacgttgtttccaatgtataa
5 pE7Δrv	aactggtagaaatttaaactaaccaagactcttgtctacccgt

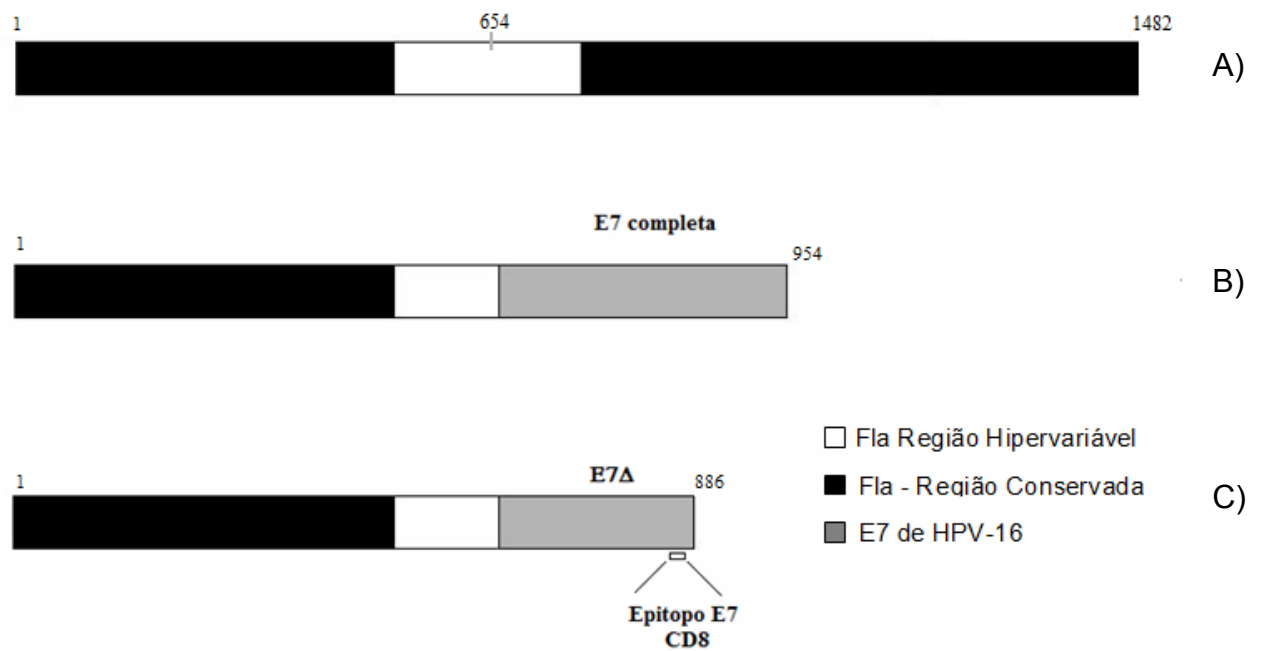
\* As bases em negrito correspondem a regiões de complementaridade desenhadas de forma a permitir o anelamento de fragmentos N-terminal da flagelina e E7 provenientes de ampliações distintas. Todos os oligonucleotídeos estão colocados na disposição 5'→3'.



**Figura 4. Esquema representativo da fusão gênica por SOEing.** A amplificação de fragmentos individualizados é feita numa etapa preliminar. Posteriormente, os fragmentos são unidos e submetidos a ciclos de fusão sem a presença dos inicializadores. Finalmente, os inicializadores externos aos genes são adicionados e um novo ciclo de PCR é aplicado. Os fragmentos resultantes são digeridos e clonados no vetor vacinal (Figura adaptada de Horton et al., 2000).

Para a construção de pFlaE7 (Fig. 5 b), 30ng do fragmento N-terminal FliCd foi colocado com quantidade equimolares do fragmento E7c e uma reação de PCR foi realizada, porém sem a adição dos inicializadores por 3 ciclos considerando o TM de 60 °C. Terminada essa reação inicial, foram adicionados os inicializadores *pFlaNfw* (1) e *pE7Crv* (4) para a completa amplificação de FliCd\_E7c. Quantidades adicionais de Taq polimerase e seu tampão específico foram reajustadas e um novo programa de PCR foi iniciado com a mesma TM de 60 °C e 30 ciclos de reação. Para a construção de pFlaE7Δ (Fig. 5 c), o procedimento foi o similar, porém a sequência fusionada à Fla foi a E7Δ e os inicializadores foram *pFlaNfw* (1) e *pE7Δrv* (5).

Uma vez gerados os fragmentos híbridos FlaE7 e FlaE7Δ, ambos foram clonados em sítios permissíveis *BamHI* do vetor pPoly (pkCMVintPoly; Vical inc) (Alves et al., 1999). O vetor pPoly (pkCMVintPoly) possui promotor e intron do Citomegalovírus Humano (HCMV), o sinal de poliadenilação do SV40, o gene de resistência a canamicina e a origem de replicação pUC18. As proteínas expressas por esse vetor, são direcionadas ao compartimento intracitoplasmático. Adicionalmente, foi construído pFLa que possui o gene da flagelina completa para ser utilizado como controle negativo (Fig 5 a).



**Figura 5. Representação esquemática das seqüências expressas pelas vacinas de DNA.** As clonagens a seguir foram feitas em sítios permissíveis *BamHI* contidas no sitio múltiplo de clonagem do vetor pPoly. Em A, é representado o gene da flagelina completa, amplificado a partir do pLS408, este plasmídeo foi denominado pFla. Em B, o plasmídeo pFlaE7 que codifica a porção N-terminal da flagelina fusionada à E7 completa. Em C, o fragmento FlaE7Δ é mostrado com apenas os 180 primeiros nucleotídeos de E7 fusionados à porção N-terminal da flagelina, mas conservando o epítipo CD8 de E7.

### **3.5 Verificação da expressão dos antígenos pelas vacinas construídas**

#### 3.5.1 Vacinas de DNA

##### 3.5.1.1 Transfecção e imunofluorescência

As linhagens celulares MRC 5, CHO 9, HEK 293 e COS 7 foram submetidas a diferentes técnicas de transfecções. O plasmídeo pEGFP (BD-Biosciences) foi empregado por expressar proteína GFP, quando presente em células eucariontes. Isso confere fluorescência às células transfectadas sem a necessidade de imunomarcção, possibilitando fácil identificação visual num microscópio de imunofluorescência.

A técnica de transfecção ExGen 500 (Fermentas) utiliza um polímero PEI que forma um complexo com o DNA conferindo-lhe características lipofílicas que o permite atravessar a membrana citoplasmática liberando o DNA no espaço intracitoplasmático. O GeneJuice (Novagen) emprega uma proteína celular não tóxica acoplada a motivos de poliamina, que complexa com o DNA transportando-o ao interior da célula. Por último, a Lipofectamina 2000 (Invitrogen), que utiliza lipídios catiônicos não formadores de micelas, para complexarem-se ao DNA, carregando-o ao citoplasma de células eucariontes. Em todas as técnicas as condições de ensaio foram seguidas estritamente pelas recomendações do fabricante. As células foram incubadas e analisadas em microscópio de imunofluorescência para determinação da eficiência de transfecção passadas 24 e 48 horas de ensaio.

Posteriormente as vacinas de DNA pFla, pFlaE7 e pFlaE7 $\Delta$  foram utilizadas com a combinação técnica de transfecção e linhagem celular que mostrou maior eficiência de transfecção. As culturas transfectadas foram submetidas a imunofluorescência. Inicialmente fixadas com metanol absoluto a -20 °C por 10 minutos, lavadas com PBS e incubadas com o anticorpo policlonal, produzido em camundongos, específico contra a flagelina (anti-fla) na diluição de 1:100 em PBS. A reação antígeno-anticorpo foi visualizada com o anticorpo secundário, anti-mouse-IgG marcado com FitC (Molecular Probes). O mesmo foi feito, num experimento paralelo, com anticorpo monoclonal direcionado contra a proteína viral E7 (anti-E7) de HPV16 (InvitroGen). As lâminas assim obtidas foram analisadas em microscópio de imunofluorescência AxioVert 2000 (Zeiss) e as imagens foram capturadas com o software AxioVision Rel. 4.6.

### 3.5.1.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida com duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e “Imunoblot”

Extratos de células COS-7 transfectadas ou não com os plasmídios vacinais, foram lisadas com tampão RIPA (10mM Tris HCl pH 7,4; 5mM de EDTA, 150mM NaCl, 1% v/v Triton X-100, 1% deoxicolato de sódio, 0,1% SDS) acrescido de PMSF (100mM) e do coquetel de inibidores de proteases da Calbiochem. As proteínas assim obtidas foram quantificadas pelo método BCA (Pierce) e alíquotas desses extratos foram fervidas 5 minutos em tampão de amostra (Tris 0,625M, pH 6.8, glicerol 10%, SDS 2% e Mercaptoetanol 5% em água destilada) e aplicadas em géis de acrilamida de 12,5%. Os géis foram corados com azul de Coomassie (0,25 de Coomassie Brilliant Blue R250; 90ml de metanol:H<sub>2</sub>O 1:1 v/v; e 10mL de ácido acético glacial). Para *imunoblot* as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (0,45µm, Sigma) sob corrente de 60mA por 1 hora num aparelho de transferência semi-seco (Amersham biosciences). Uma vez bloqueada em solução de leite desnatado a 3% em PBS-tween 0,05%, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário, *anti-fla*, na diluição 1:3000 por 1 hora a temperatura ambiente. Após lavagens com PBS, incubou-se o anticorpo secundário, anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma Inc.) sob as mesmas condições. A membrana foi revelada por quimioluminescência (Pierce) e exposta num filme fotográfico Kodak x Omat por 30 minutos.



### 3.5.1.3 Verificação da taxa de morte celular

Para verificar se as células transfectadas com as construções vacinais pFla, pFlaE7 e pFlaE7 $\Delta$  permaneciam viáveis, foram empregados ensaios com Iodeto de propídio (PI), que permite marcação do DNA nuclear. Quando a célula morre, seja por apoptose, necrose, ou mesmo piroptose, o DNA nuclear fragmenta-se e difunde-se aleatoriamente. Isso diminui a intensidade de coloração ao PI, quando contrastadas com células viáveis normais (Nicoletti et al., 1991). As células foram transfectadas com as vacinas de DNA pFla, pFlaE7 e pFlaE7 $\Delta$ , e em seguida foram tripsinizadas e coletas juntamente com o sobrenadante da cultura, fixadas com etanol 70 °GL a -20 °C, tratadas com RNase (Fermentas) (10mg/mL) e acrescidas de solução de PI (50 $\mu$ g/mL) em gelo sob abrigo da luz. As amostras assim tratadas foram analisadas em citômetro de fluxo (FACScalibur BD biosciences). O histograma resultante foi montado na forma de gráfico de barras expondo o percentual de células mortas em cada uma das construções vacinais utilizadas.

## 3.5.2 Salmonelas vacinais

### 3.5.2.1 SDS-PAGE e “Imunoblot”

Géis de poliacrilamida na concentração de 12,5% (Maniarts et al., 2005) foram utilizados para a eletroforese dos extratos totais das salmonelas vacinais, flagelina purificada e amostras de E7 purificada (fração protéica dos 60 primeiros aminoácidos). As membranas foram incubadas com anticorpos anti-fla ou anticorpos anti-E7, para verificar a presença de ambos epítomos, de forma concomitante, na proteína heteróloga construída. As condições de eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e imunodeteção as mesmas descritas no subitem 4.5.1.2.

### 3.6 Regime de imunização profilática

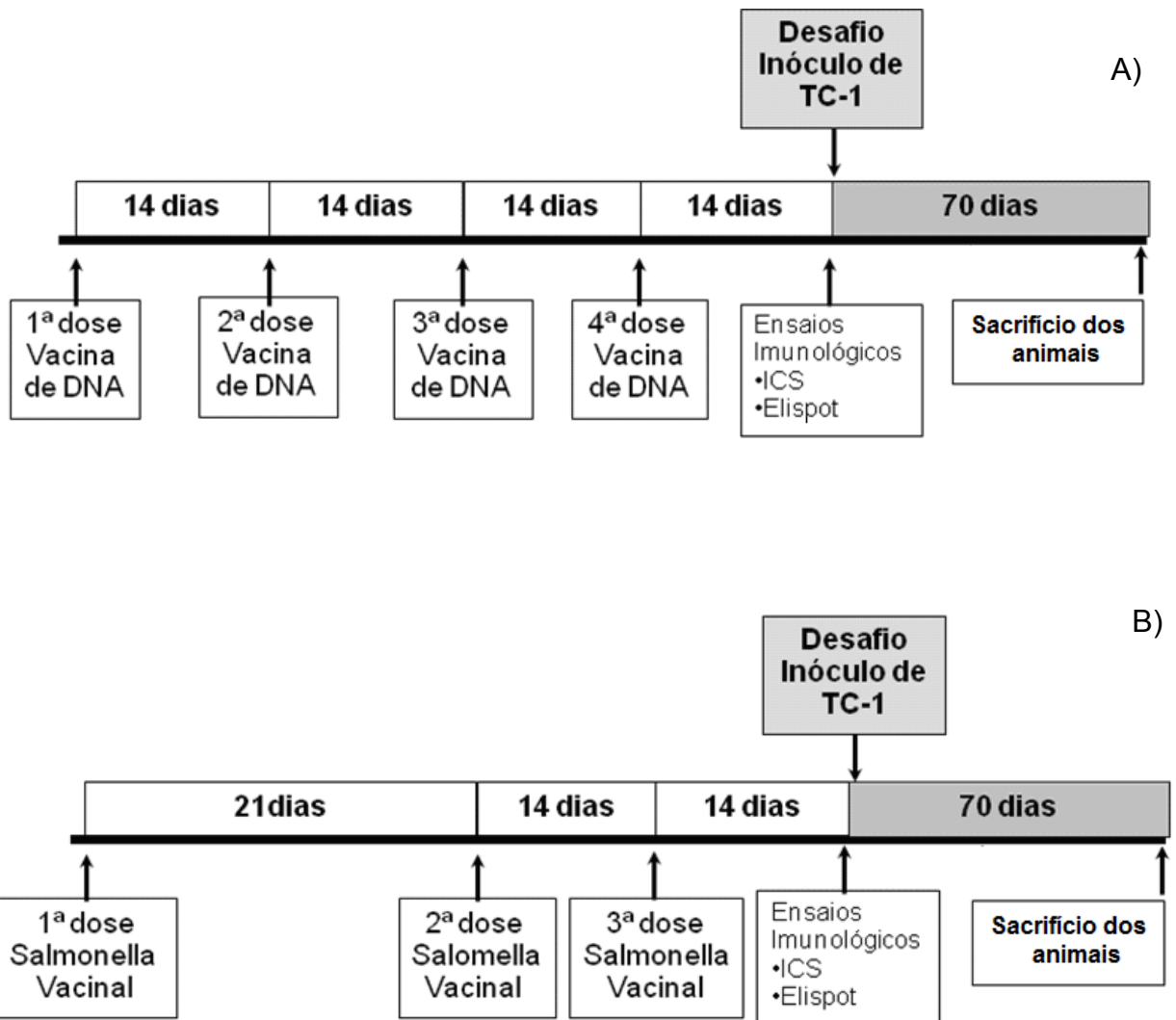
#### 3.6.1 Vacinas de DNA

As vacinas de DNA foram administradas em 4 doses com intervalos de 14 dias entre cada dose (Fig. 6 A). Duas vias foram testadas, a intramuscular (IM) e intradérmica (ID) por meio da biobalística (*Genegun* - GG). Por via intramuscular, os camundongos receberam 100µg de DNA diluídos em PBS num volume final de 100 µL, sendo inoculados 50µL no músculo tibial esquerdo e os outros 50µL no músculo tibial direito.

Para administração pela via intradérmica (ID) por biobalística, a partir de agora chamada de GG, o DNA foi adsorvido em partículas de ouro (Biorad). Para isso, 10mg de ouro são pesados e adicionados a 20µL de solução do DNA a ser empregado, numa concentração de 1µg/µL. A seguir 80µL de solução CaCl<sub>2</sub> (2,5 M) é adicionada a mistura sob constante agitação. Após 10 dez minutos de incubação em bancada, a mistura ouro mais DNA é centrifugada e lavada com etanol absoluto por 3 vezes. Na última lavagem, o precipitado é ressuspenso em 200 µL solução de espermidina (Sigma S -0266) a 0,1 M, e rapidamente transferido para tubos de teflon (Biorad). A espermidina faz com que as partículas de ouro ganhem afinidade por plástico. Após 10 minutos em repouso ocorre a sedimentação do ouro, que então é seco com influxo de gás inerte (hélio analítico 5.0) no interior do tudo. Seguindo essas proporções de reagentes, cada centímetro de tudo contem 1 µg de DNA adsorvido. A pistola de biobalística foi carregada com as balas relativas à cada construção vacinais de acordo com os respectivos grupos, e submetida à pressão de 50psi de gás hélio 5.0 analítico (White Martins). Quando realizado o disparo, ocorre a liberação do gás que arrasta consigo as micropartículas de ouro revestidas com o DNA fazendo com penetrem na derme do animal. Os camundongos destinados a imunização pela via GG, tiveram a região abdominal depilada com creme Veet<sup>®</sup>.

### 3.6.2 Salmonelas vacinais

As imunizações com as salmonelas vacinais foram feitas em 3 doses num intervalo de 0, 21 e 35 dias (fig. 6 B), por via oral (VO). Cada dose foi preparada a partir de culturas em fase exponencial, confirmadas por medição em  $A_{600nm}$  num valor de 0,5. Após 3 lavagens com PBS, o precipitado bacteriano foi ressuspenso em salina estéril. Durante a imunização, utilizou-se como dose  $10^{10}$  unidades formadoras de colônias (UFC) diluídas em 0,5mL de salina estéril por animal. A amostra foi administrada utilizando seringas de 1mL acopladas a agulhas de gavagem específicas (Popper & Sons, Inc). Antes da administração de salmonelas, os animais recebem 0,5  $\mu$ L de solução de bicarbonato de sódio (3M).



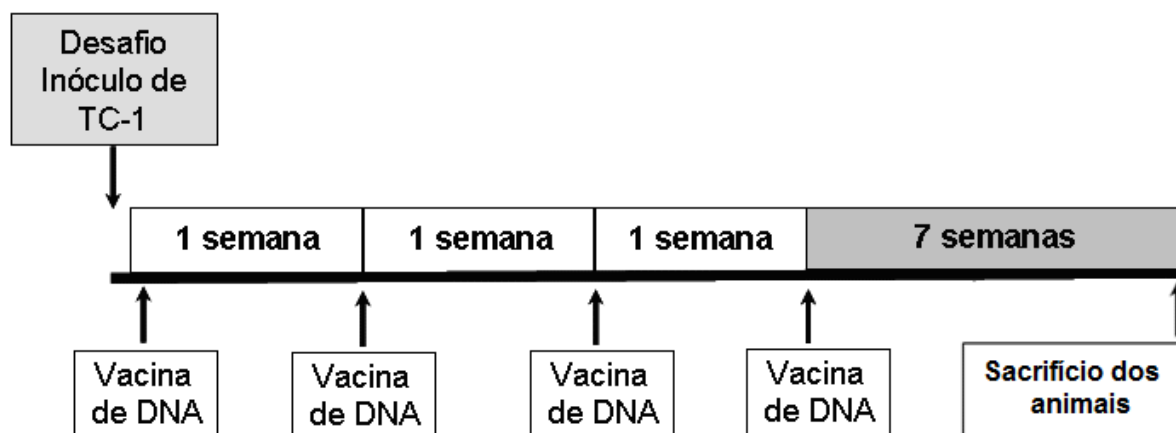
**Figura 6. Esquemas de imunização feitas em camundongos com as vacinas de DNA e as salmonelas vacinais.** Em A, é mostrado o esquema para imunizações com vacinas de DNA, tanto por via intramuscular; quanto pro via intradérmica. Em B, o esquema de imunização com salmonelas vacinais. A via de administração adotada neste caso foi a oral. Está indicado o dia da coleta das amostras para os ensaios imunológicos, o desafio com as células TC-1, o período de acompanhamento da progressão tumoral e o dia do sacrifício.

### **3.7 Regime de imunização terapêutica**

A concepção de um modelo mais próximo do que acontece em condições naturais, implica em administrar células TC-1 previamente à administração das vacinas, como mostrado na figura 7. Desta maneira, o inóculo de células TC-1 precedeu 4 doses de 1µg de DNA por via ID com intervalos de 1 semana. O acompanhamento do crescimento da massa tumoral foi feito uma vez a cada dois dias por inspeção visual e palpação. Nesta abordagem, utilizou-se uma combinação diferente das vacinas de DNA. A construção pFla foi administrada em conjunto as construções vacinais que expressam E7 numa mesma dose. Objetivou-se com isso a verificação das propriedades adjuvantes da flagelina completa concomitante às construções vacinais pFlaE7c e pFlaE7Δ. Para isso, foi administrada 1µg de pFla adicional a cada imunização exposta em 3.6.1.

### **3.8 Ensaios de desafio com células TC-1**

Os camundongos submetidos aos regimes vacinais foram desafiados com as células TC-1. Cultivadas em garrafas de plástico (TTP), as células foram lavadas 2 vezes com PBS pH 7.4 e em seguida tratadas com tripsina + EDTA (CultLab). A seguir foram ressuspensas em meio DMEM completo e coletadas em frascos de tipo Falcon de 15mL. Em seguida foram centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos, sendo as células ressuspensas em meio DMEM sem soro fetal bovino. A concentração celular foi determinada em câmara de “Newbauer”. Dessa suspensão de células, inoculou-se  $5 \times 10^6$  células TC-1 num volume final de 100µL por animal. O inóculo foi realizado no dorso de camundongos C57BL6. A inspeção do crescimento tumoral foi feita por apalpação e medição da massa tumoral, com o auxílio de um paquímetro, por 3 vezes por semana.



**Figura 7. Esquemas de imunização terapêutica feitas em camundongos com as vacinas de DNA pFla, pFlaE7 e pFlaE7Δ.** O inóculo de células TC-1 foi administrado 24 horas antes da primeira dose vacinal. Posteriormente, são administradas 4 doses de vacinas de DNA e acompanhamento do desenvolvimento tumorais por 7 semanas seguidos do sacrifício dos animais.

### 3.9 Coleta e processamento das amostras

A sangria dos camundongos foi realizada por punção na região retro-orbital duas semanas após a última dose, seja de vacinas de DNA ou salmonelas vacinais. Para fins comparativos foram também coletados sangue de animais não imunizados. Nos esquemas de imunização profilática que se seguiram, alguns animais foram destinados a ensaios de desafio com células TC-1. Outra parte foi destinada a ensaios imunológicos. Os baços foram retirados em condições assépticas, macerados e lavados com solução de Ack Lising Buffer (BioSource International) para lise de hemácias. Os esplenócitos foram ressuspensos em meio RPMI (Gibco-BRL) com 1% de soro fetal bovino e contadas em câmara de “NewBauer” em azul de tripan (1:10).

### 3.10 ELISPOT

Células do baço de animais imunizados foram submetidas a ensaios de ELISPOT (Enzyme-Linked immunospot assay) para quantificação de células secretoras de IFN- $\gamma$ . Como estímulo foi utilizado o peptídeo E7 (aminoácidos 49-57; RAHYNIVTF) (Chen, 2003; Peng, 2004; Feltkamp, 1993), que é específico a células T CD8<sup>+</sup>. Para isso, placas Maxisorp de 96 poços (Nunc) foram sensibilizadas com anticorpos anti-IFN- $\gamma$  de camundongo na diluição de 1:100 em PBS e incubadas a 4 °C durante 12 horas. Após lavagens com PBS (pH 7.2), as placas foram bloqueadas com BSA 1%. Posteriormente, foram depositadas  $5 \times 10^5$  células por poço, com ou sem o estímulo (peptídeo E7), e incubadas a 37 °C numa atmosfera de 5% do CO<sub>2</sub>. Utilizou-se como controle positivo concanavalina A (Merck inc.). As placas foram lavadas com PBS e anticorpos anti-IFN- $\gamma$  de camundongos conjugados com biotina foram incubados numa concentração de 1:250 em PBS-Tween (PBS-T) a 4 °C durante 12 horas. Em seguida, as placas foram lavadas por 3 vezes com PBS-T e incubadas com streptoavidina conjugada à fosfatase alcalina (Sigma) diluída em PBS-T a 1:1000 por 1 hora a 37 °C. Em paralelo, preparou-se a solução reveladora (11mg DAB, 11mL Tris-HCl 50mM pH 7,5). Após lavagens com PBS-T, a solução reveladora foi adicionada às placas, que foram mantidas sob abrigo da luz a temperatura ambiente por 20 minutos. Após lavagens com água corrente as placas foram secas à temperatura ambiente e a contagem dos pontos (*spots*) realizada com auxílio de uma lupa. Os dados assim obtidos foram montados num gráfico de barras.

## 4 RESULTADOS

O trabalho realizado pode ser dividido em duas frentes, uma que estudou salmonelas vacinais, e outra que estudou vacinas de DNA. Porém, em ambas as estratégias, três etapas foram seguidas: Construção das vacinas, verificação da expressão *in vitro*, ensaios de proteção com desafios com células tumorais e avaliação das respostas imunológicas geradas.

### 4.1 Salmonelas vacinais

#### 4.1.1 Construção vetor pLSE7 e linhagem de salmonela vacinal

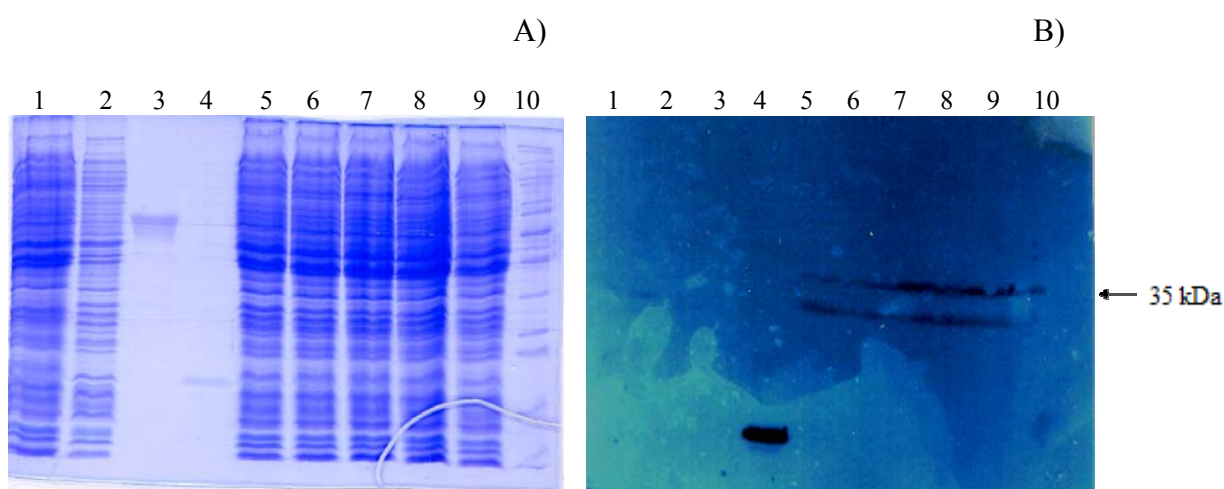
O vetor pLSE7 foi construído a partir da inserção de E7 em sítio permissível de *EcoRV* existente no vetor pLS408 (Fig. 3). A sequência final de E7 possui um códon de parada e interrompe a tradução da flagelina híbrida no final de E7 (número de aminoácidos da flagelina e E7?). A confirmação foi feita por análise de restrição e sequenciamento (dados não mostrados). A seguir, as construções foram utilizadas para transformar a cepa de salmonela atenuada SL5928. Dessa forma foram geradas as cepas SL5930 e SLFlaE7 com os plasmídios pLS408 e SLFlaE7 respectivamente. A triagem dos clones transformantes foi feita inicialmente pelo uso de antibióticos de seleção, que nesse foi a ampicilina. Posteriormente o DNA plasmidial foi extraído e submetido à análise de restrição e reações de PCR que confirmaram a presença dos respectivos plasmídios (dados não mostrados).

#### 4.1.2 Detecção da flagelina híbrida expressa por cepas de salmonelas vacinais

Conforme indicado na figura 8, a linhagem SL FlaE7 transformada com o vetor pLSE7 expressou uma banda com peso molecular de 35 kDa que foi reconhecida por anticorpos anti-E7 (Calbiochem) em ensaios de imunodeteção. O peso molecular encontrado corresponde ao previsto para a proteína heteróloga resultante da fusão de N-terminal da flagelina a E7. A presença de uma banda com peso molecular ligeiramente inferior a 35 kDa, também foi reconhecida pelo anticorpo anti-E7 e provavelmente reflete um produto de degradação

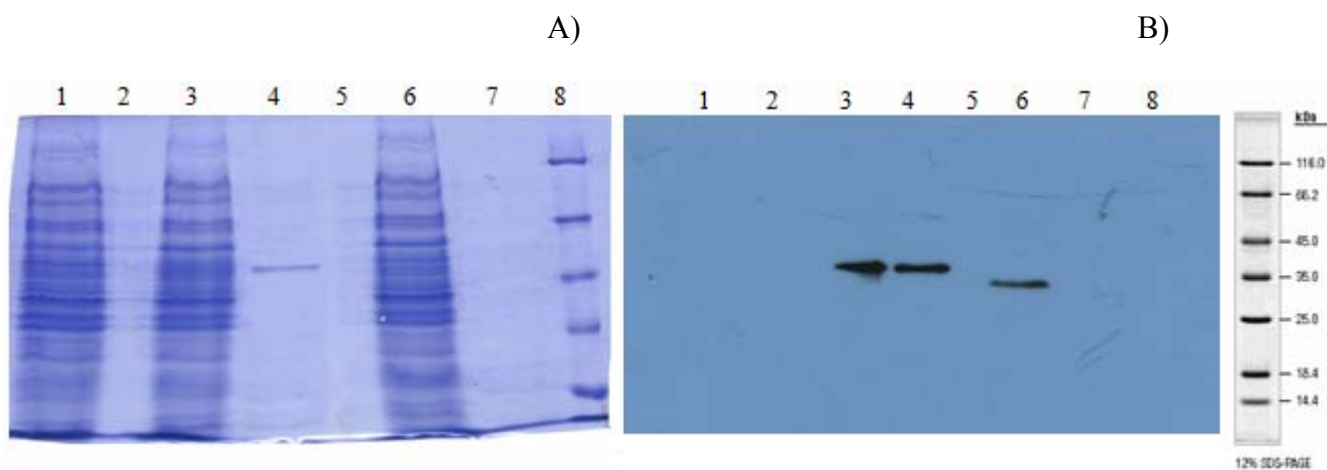


detectável no ensaio. Como controle positivo foi utilizada a proteína E7 $\Delta$  purificada, que mostrou peso molecular de 18 kDa e foi reconhecida por anticorpos anti-E7. No mesmo ensaio, a flagelina purificada e as cepas SL5928 e SL5930 foram utilizadas como controles negativos não mostrando bandas reconhecíveis pelo anticorpo anti-E7 empregado.



**Figura 8. Detecção de FlaE7 expressa em cepas de salmonelas vacinais.** Em A, o gel corado com comassie blue. Em B, a imunodeteccção da proteína FlaE7 empregando anticorpos anti-E7. No poço 1 e 2, foram aplicados extratos totais da cepa SL5928; no poço 3 foi aplicada FliC<sub>d</sub> purificada; no poço 4, foi aplicada a proteína E7 purificada; nos poços 5,6,7,8 e 9 extratos totais relativos a cepas de SL FliE7 e no poço 10 foi aplicado o padrão de peso molecular.

Na figura 9, observa-se a presença da proteína FlaE7 em cepas SL FlaE7 como demonstrado por imunodeteção com anticorpos policlonais anti-fla gerados em nosso laboratório. De maneira concordante a figura 8, a proteína FlaE7 registrou peso molecular de 35 kDa. Não foi detectada por extrações flagelares, sendo detectada apenas no extrato total. A cepa SL5930 foi utilizada como controle positivo mostrando a presença da flagelina tanto no extrato total, como na extração flagelar. Um controle negativo adicional utilizou a cepa SL5928 que não expressa flagelina.

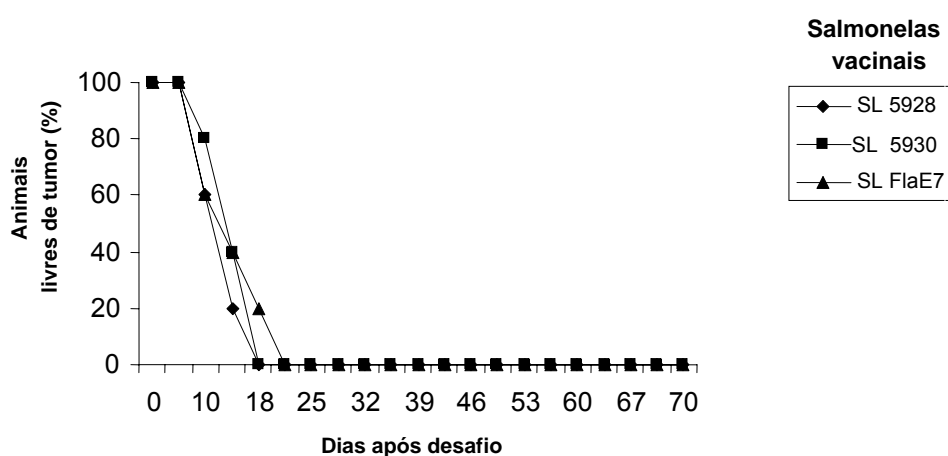


**Figura 9. Detecção de FlaE7 expressa em cepa salmonela vacinal.** Gel de poliacrilamida corado com azul de Coomassie (A) e immunoblot de salmonelas vacinais (B). No poço 1, foi aplicado extrato total da cepa SL5928, como controle negativo; no poço 2, nada foi aplicado; no poço 3, extrato total de SL5930; no poço 4, extração de flagelina da cepa SL5930; no poço 5, nada foi aplicado; no poço 6, extrato total da cepa vacinal FliE7; no poço 7, extração de flagelina da cepa FliE7 e no poço 8, padrão de peso molecular.

#### 4.1.3 Avaliação das respostas imunológicas geradas em animais imunizados com a linhagem SLFlaE7 e proteção vacinal a desafios com células tumorais TC-1.

Animais C57 BL6 foram imunizados com as cepas de salmonelas vacinais segundo esquema de vacinação proposto na figura 6. Nenhum dos animais que receberam a salmonela vacinal Fla-E7 resistiu ao desafio com células TC-1, como se pode observar na figura 10. As cepas SL5928 e SL5930 foram utilizadas como controles negativos e ambas apresentaram 0% de proteção ao desafio com células tumorais TC-1.

A resposta imune gerada foi monitorada por ELISPOT e ICS, ambas empregadas para detecção de linfócitos T  $CD8^+$  /  $IFN-\gamma^+$ . Os animais submetidos aos ensaios imunológicos não mostraram variações estatisticamente significantes entre os grupos controle SL5928 e SL5930; e o grupo que recebeu a salmonela vacinal SL FLaE7.



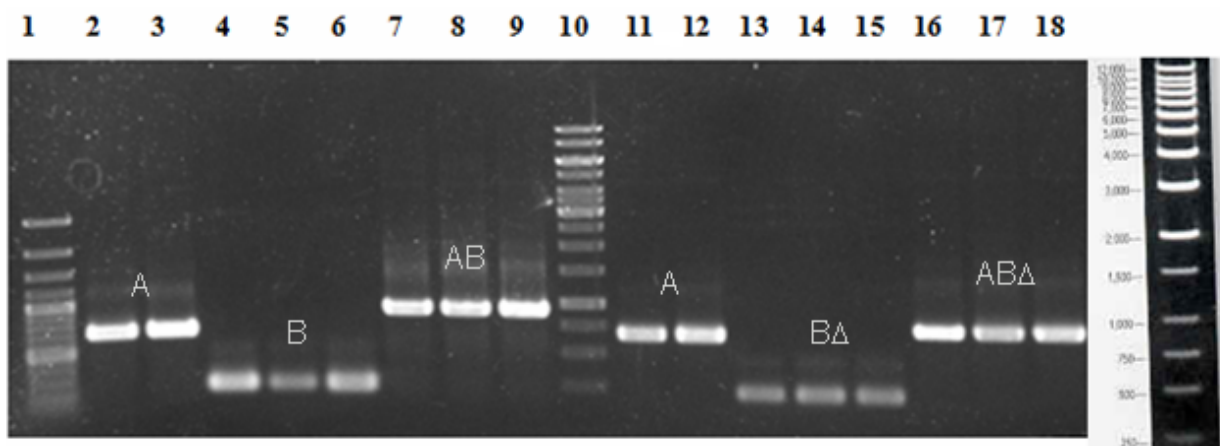
**Figura 10. Desafio com células TC-1 em animais imunizados com salmonelas vacinais.** A cepa Fla-E7, marcada por triângulos, não demonstrou capacidade de proteção ao desafio com células TC-1. As cepas SL5928 e SL5930, marcadas com losangos e quadrados, respectivamente foram utilizadas como controle negativo mostrando ausência de proteção ao desafio com células tumorais TC-1.

## 4.2 Vacinas de DNA

### 4.2.1 Construção das vacinas de DNA

Conforme indicado na figura 11, as reações de PCR com sobreposição de seqüências (*SOEing*) fusionaram fragmentos da porção N-terminal da flagelina à *ORF* E7 completa resultando em fragmentos de peso molecular equivalente a 954 pares de bases. Estão indicadas na figura 11, do lado esquerdo, como AB. Paralelamente, outra fusão foi feita, porém utilizando a E7 truncada, o que gerou em fragmentos de peso molecular equivalente a 886 pares de bases. Estão indicadas na figura 11, do lado direito, como AB $\Delta$ .

Os fragmentos AB e AB $\Delta$  foram posteriormente clonados no sítio permissível *BamHI* no vetor de expressão em eucariontes pPoly, gerando as construções pFlaE7 e pFlaE7 $\Delta$ , respectivamente. As construções foram devidamente sequenciadas tendo a orientação de inserção confirmada. A ausência de mutações verificada no sequenciamento permitiu a validação das vacinas de DNA empregadas. Como controle negativo, foi construída pFla, que possui clonado no mesmo sítio *BamHI* o gene completo para a flagelina.

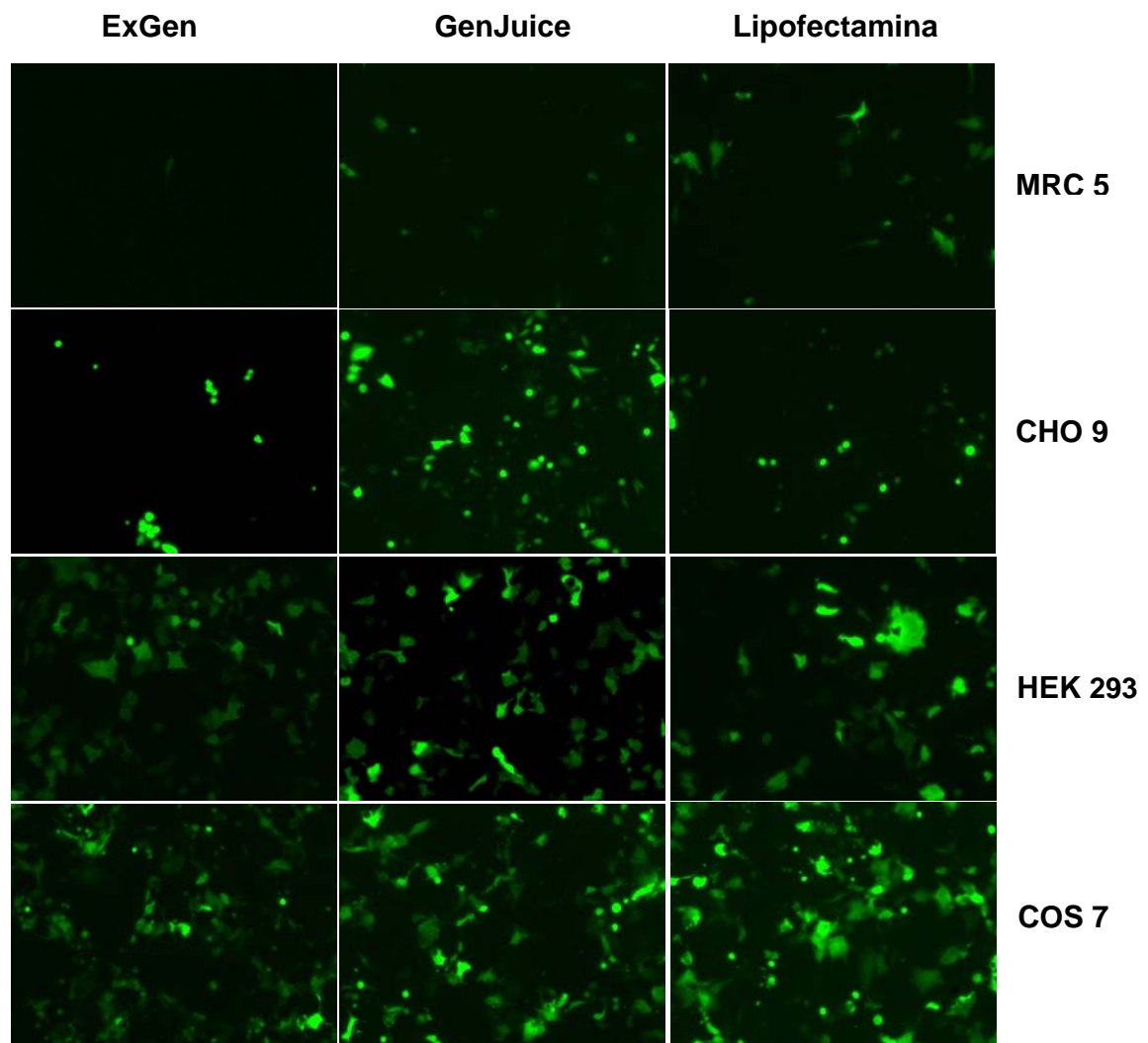


**Figura 11. Fusão dos fragmentos N-terminal da flagelina e E7, completa ou truncada, pela metodologia *SOEing*.** O gel de agarose a 1,5% dispõe as amostras na seguinte ordem; poço 1, padrão de peso molecular de 100pb; nos poços 2 e 3, fragmento N-terminal da flagelina (A) de peso molecular (p.m.) de 654pb; nos poços 4, 5 e 6, fragmento E7 completo (B) com p.m. de 300pb; nos poços 7, 8 e 9, observa-se a fusão dos fragmentos AB resultando numa banda de p.m. de 954pb; no poço 10 foi aplicado o padrão de peso molecular de 1kb ilustrado à direita do gel; nos poços 11 e 12, o fragmento relativo a porção N-terminal da flagelina (A) com p.m. de 654; nos poços 13, 14 e 15, o fragmento correspondente a E7 truncada (B $\Delta$ ) com p.m. de 232pb e nos poços 16, 17 e 18, o fragmento resultante da fusão AB $\Delta$  com p.m. de 886pb.

4.2.2 Células transfectadas com as vacinas de DNA são capazes de expressar as proteínas híbridas FlaE7 e FlaE7 $\Delta$ .

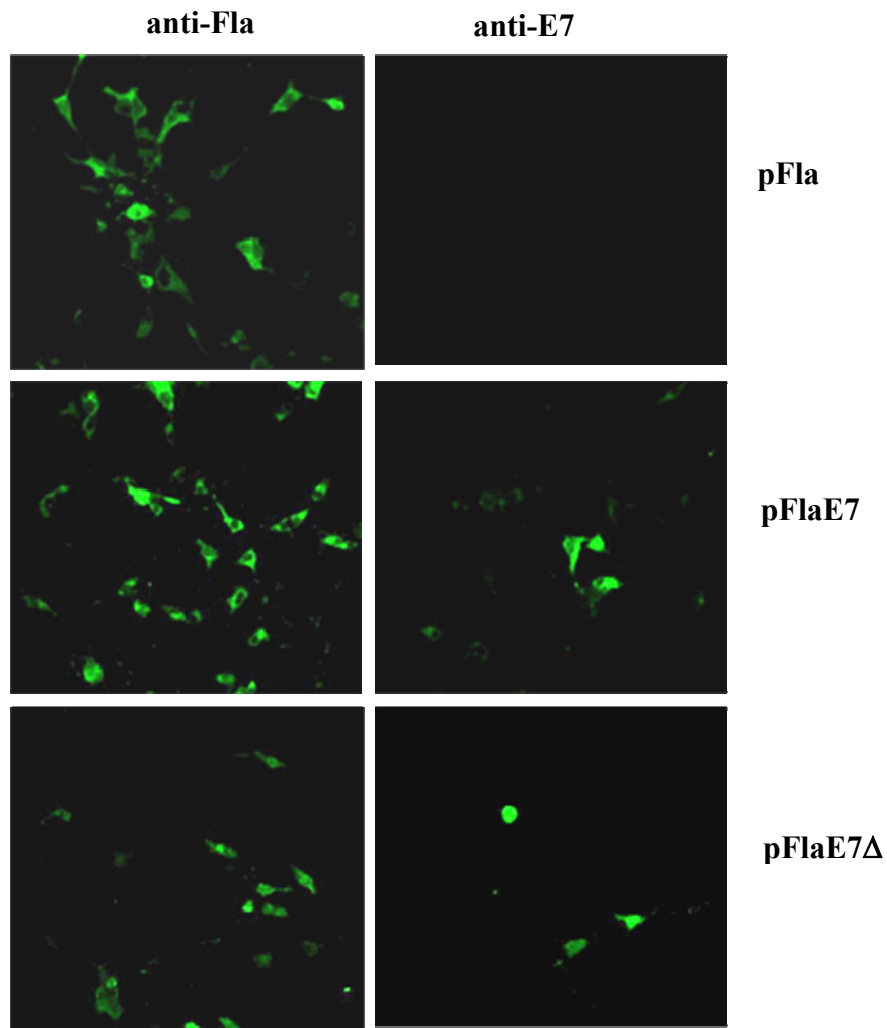
A figura 12 mostra os resultados da padronização da técnica de transfecção para diferentes linhagens celulares. Como se pode observar, a técnica de transfecção com Lipofectamina 2000, utilizada em células da linhagem COS 7, apresentou melhor eficiência de transfecção (quanto?) comparada às demais testadas. Diferentes imagens(?) desta combinação foram posteriormente analisadas revelando 60% de eficiência. Outras técnicas também foram eficientes para transfectar células COS 7, embora nenhuma tenha superado a Lipofectamina2000.

A linhagem HEK 293 apresentou sensibilidade a todas as técnicas de transfecção sendo a técnica ExGen mais eficiente ao transfectar 40% das células. Já a linhagem celular CHO, mostrou-se sensível apenas a técnica de transfecção GeneJuice com 30% de eficiência. Por último, a linhagem MRC 5 mostrou baixa sensibilidade à transfecção em todas as técnicas utilizadas. Como controle negativo, foi utilizado células que receberam as respectivas soluções de transfecção, porém sem DNA.



**Figura 12. Padronização de técnicas de transfecção com diferentes linhagens celulares.** A construção pEFGP, que expressa GFP, foi transfectada em linhagens celulares MRC 5, CHO 9, HEK 293 e COS 7. Três técnicas de transfecções diferentes foram ensaiadas: ExGen 500 500 (Fermentas), GeneJuice (Novagen) e Lipofectamina2000 (Invitrogen). As células foram incubadas por 48h e analisadas em microscópio de imunofluorescência para determinação da eficiência de transfecção.

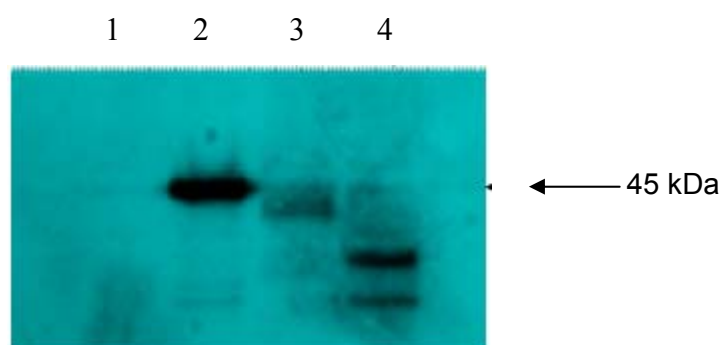
O ensaio de imunofluorescência exposto na figura 13 mostra as vacinas de DNA pFlaE7 e pFlaE7 $\Delta$  expressando suas respectivas proteínas, FlaE7 e FlaE7 $\Delta$ , que foram reconhecidas tanto por anticorpos anti-E7 quanto por anti-Fla. Isto demonstra a natureza híbrida das proteínas expressas. Como controle negativo, foi usada a construção pFla que expressou flagelina detectada por anticorpos anti-Fla. Como é possível perceber, existe diferença na sensibilidade de detecção dos epítomos Fla e E7. Isto deve-se a natureza dos anticorpos utilizados, visto que os anticorpos anti-Fla são policlonais e os anti-E7 são monoclonais. As imagens de imunofluorescência mostradas na figura 13, sugerem que as proteínas expressas pelos plasmídios pFla, pFlaE7 e pFlaE7 $\Delta$  encontram-se dispersas pelo citoplasma das células transfectadas. O sobrenadante dessas culturas foi coletado e suas proteínas foram precipitadas com acetona pura. Nenhum dos produtos codificados pelos plasmídios pFla, pFlaE7 e pFlaE7 $\Delta$ ; foi detectado no sobrenadante quando submetidos à imunodetecção com o anticorpos anti-Fla (dados não mostrados).



**Figura 13. Expressão *in vitro* das vacinas de DNA pFla, pFlaE7 e pFlaE7Δ; como demonstrado por imunofluorescência.** As vacinas de DNA foram transfectadas em células COS-7 utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen). Na coluna Anti-FliCd, as células transfectadas foram expostas ao anticorpo policlonal anti-Fla e mostram parcela significativa das células expressando as construções pFla, pFlaE7 e pFlaE7Δ. Em paralelo, a coluna intitulada como anti-E7 mostra células transfectadas exposta ao anticorpo monoclonal contra E7. Apenas as construções pFlaE7 e pFlaE7Δ apresentam tais marcações. Ambos os anticorpos primários foram gerados em camundongos. Como anticorpo secundário foi utilizado anti-IgG de camundongo (Calbiochem).



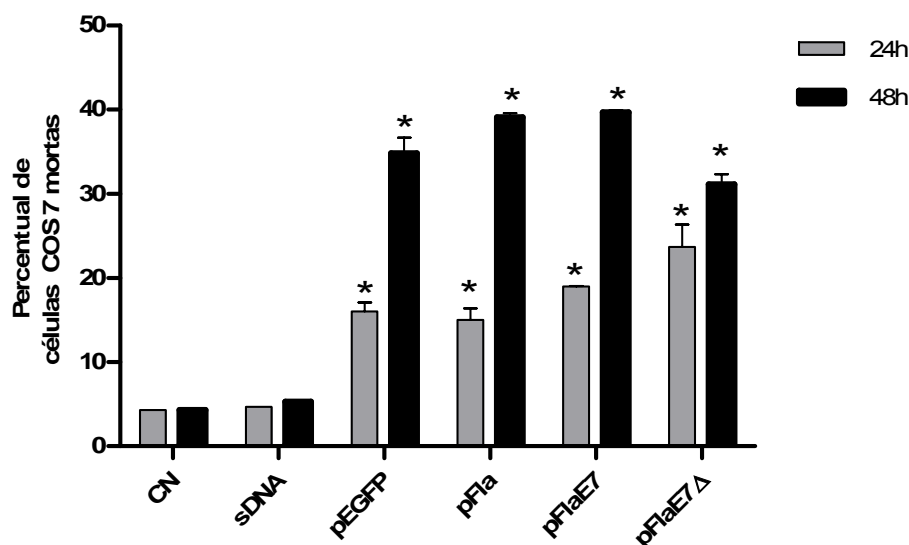
A imunodeteccção mostrada na figura 14 demonstra a expressão de flegelina, FlaE7 e FlaE7 $\Delta$ ; em culturas de células transfectadas com os plasmídios pFla, pFlaE7 e pFlaE7 $\Delta$ , respectivamente. A flagelina mostrou peso molecular de 45 kDa conforme previsto . A construção pFlaE7 mostrou banda de peso molecular aproximado em 35 kDa com intensidade visivelmente inferior a flagelina. A construção pFlaE7 $\Delta$  expressou uma banda de peso molecular aproximado em 30 kDa de intensidade um pouco inferior ao da flagelina. É conveniente lembrar que a mesma quantidade do extrato total de células transfectadas foi aplicada de cada amostra.



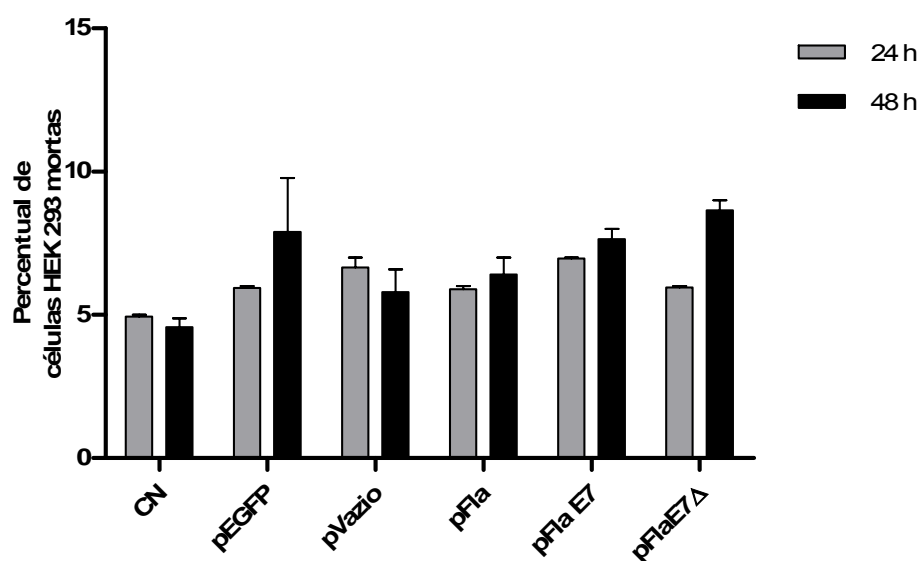
**Figura 14. Detecção das proteínas expressas pelas construções vacinais pFla, pFlaE7 e pFlaE7 $\Delta$ .** Transfecções de células COS-7 foram realizadas com Lipofectamine 2000; em seguida as células foram coletas e lisadas com tampão RIPA e devidos inibidores de proteases. A imunodeteccção identificou as proteínas expressas Fla, FlaE7 e FlaE7 $\Delta$ . Em 1 foi colocado células COS-7 que receberam a solução de transfecção sem DNA. Em 2, foi aplicada células transfectadas com pFla. Em 3, foi aplicado pFlaE7 e em 4, foi aplicado pFlaE7 $\Delta$ .

A seguir foram realizados ensaios para quantificação nos níveis de morte celular em células que expressavam flagelina intracitoplasmaticamente. A partir dos resultados observados na figura 15 A, pode-se perceber uma taxa de morte celular significativa em todas as construções, inclusive pEGFP que foi utilizada neste ensaio como controle negativo por não expressar flagelina. Em todas as construções testadas o índice de morte celular aproximou-se de 20% com 24 horas de transfecção e dobrou nas 24 horas seguintes. Posteriormente, foi usada a técnica de transfecção com ExGen e células Hek293 (Fig 15 B) que mostrou uma significativa redução nos índices de morte celular em todas as construções, que de uma maneira geral não exibiram mais do que 8% mesmo após 48 horas de cultivo após a transfecção.

A)



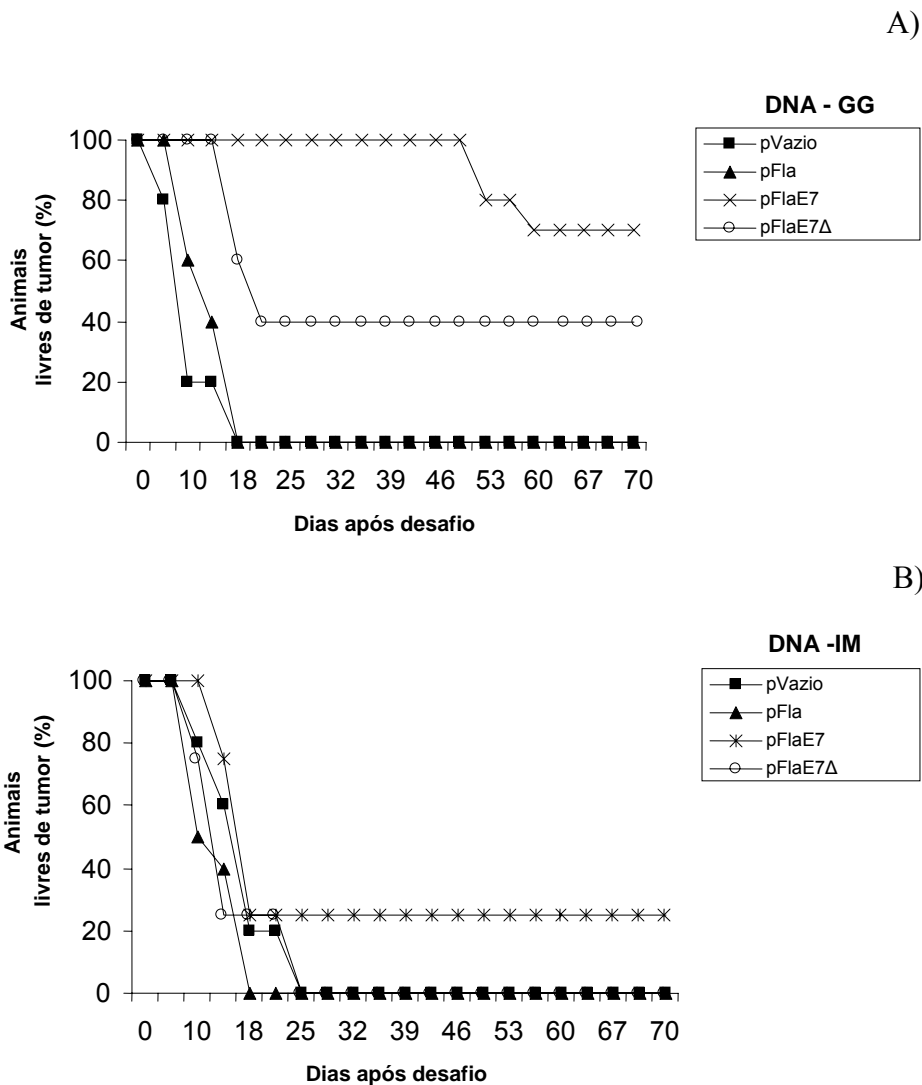
B)



**Figura 15. Avaliação dos níveis de morte celular mediante a transfecções com as vacinas de DNA pFla, pFlaE7 e pFlaE7Δ.** Após 24 ou 48 horas, as células foram coletadas e tratadas com PI e, em seguida analisadas no citômetro. Em A, a transfecção foi realizada em células Cos7 utilizando Lipofectamina 2000. Os níveis de morte celular encontrados nas transfecções das construções vacinais foram comparáveis ao controle utilizado neste experimento, que foi o pEGFP. Nesta figura observa-se que ocorreu diferença estatística, representada pelo símbolo \*, entre os períodos de 24 e 48 horas, no qual  $p \leq 0,05$ . Em B, as células HEK 293 foram transfectadas com as construções vacinais utilizando ExGen. Dessa vez foi utilizado o vetor pPoly Vazio. Os níveis de morte celular em todas as construções vacinais foram inferiores a 8%.

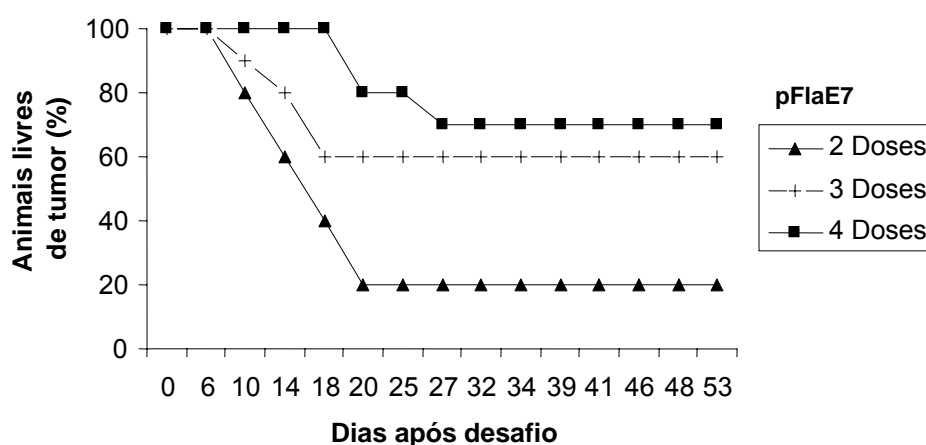
#### 4.2.3 Vacinas de DNA expressando FlaE7 conferem proteção ao desafio de células TC-1 em modelos de imunização profilática.

Os ensaios de desafio profiláticos apresentados aqui mostram que animais imunizados com a construção pFlaE7 por via “Genegun” possuem 70% de proteção ao desafio com células TC-1 (Fig. 16 A). Enquanto que a mesma construção apresentou 25% de proteção quando administrada sob a via intramuscular (Fig. 13 b). Já a construção pFlaE7 $\Delta$ , quando administrada pela via “Genegun” mostrou 40% de proteção ao desafio com células TC-1 (Fig. 16 A) e quando administrada via intramuscular não mostrou proteção, pois todos os animais foram acometidos por crescimento tumoral significativo, que os levou a morte (Fig.16 B). Ambas as vias de administração empregou controles negativos que foram animais que receberam o vetor vazio e pFla, além de animais que receberam placebo e todos esses grupos quando receberam células TC-1 apresentaram 100% de crescimento tumoral ( 0% de proteção) (Fig 16 A a B).



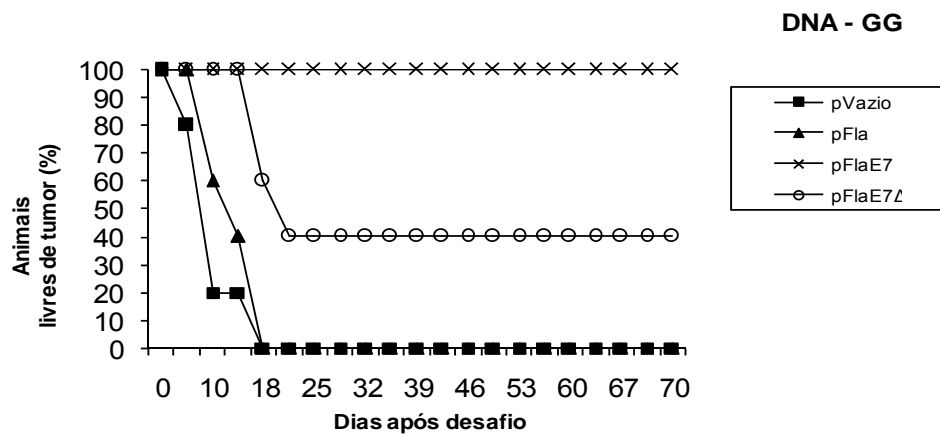
**Figura 16. Desafio com células TC-1 em animais imunizados com as vacinas de DNA pFla, pFlaE7 e pFlaE7Δ.** Ensaio realizados nos moldes propostos pela fig. 6, com desafio de  $5 \times 10^6$  células TC-1 por animal. Em A, é demonstrado a sobrevivência de animais imunizados com as vacinas de DNA por via “Genegun”; Em B, as mesmas construções. Notar níveis de proteção superiores quando as vacinas de DNA são administradas por via “Genegun” quando comparada a via intramuscular.

A figura 17 mostra os níveis de proteção relativos diferentes número de doses de vacinação. Como pode se observar 4, 3 e 2 doses exibem níveis de proteção 70%, 60% e 20%; respectivamente.



**Figura 17. Desafio com células tumorais TC-1 em animais imunizados com diferentes número de doses da vacina de DNA pFlaE7.** O regime de imunização foi seguido de maneira semelhante à fig. 4, com mesma dose de DNA (1µg) via “Genegun” e o desafio com  $5 \times 10^6$  células TC-1 por animal. O grau de proteção conferido aos animais imunizados mostrou-se proporcional ao número de doses da formulação vacinal previamente administrada.

Posteriormente outro ensaio de proteção foi realizado com 4 doses de 1µg DNA administrado pela via ID com os mesmos intervalos de tempo indicados na figura 4. Porém desta vez, foi empregado um número menor de células tumorais TC-1 ( $10^5$  células), ou seja, cinquenta vezes inferior ao ensaio anterior. Os animais assim imunizados com a construção pFlaE7 exibiram 100% de proteção ao desafio (Fig. 18). Resultado superior ao encontrado pela mesma construção no desafio que empregou  $5 \times 10^6$  células TC-1, que foi 70% de proteção (Fig. 16 A e 17). Já a construção pFlaE7Δ, mostrou 40% de proteção ao desafio de  $10^5$  células (Fig. 18), que foi o mesmo encontrado em ensaios anteriores que empregaram  $5 \times 10^6$  células TC-1.



**Figura 18. Desafio com células TC-1 em animais imunizados com as vacinas de DNA pFla, pFlaE7 e pFlaE7Δ.** Neste ensaio houve uma mudança metodológica com a diminuição do número de células TC-1 que passou a ser de  $10^5$  células por animal, onde é mostrada a sobrevivência de animais imunizados com as vacinas de DNA via “Genegun”.

#### 4.2.4 Ensaio imunológico em animais imunizados com as vacinas de DNA expressando FlaE7

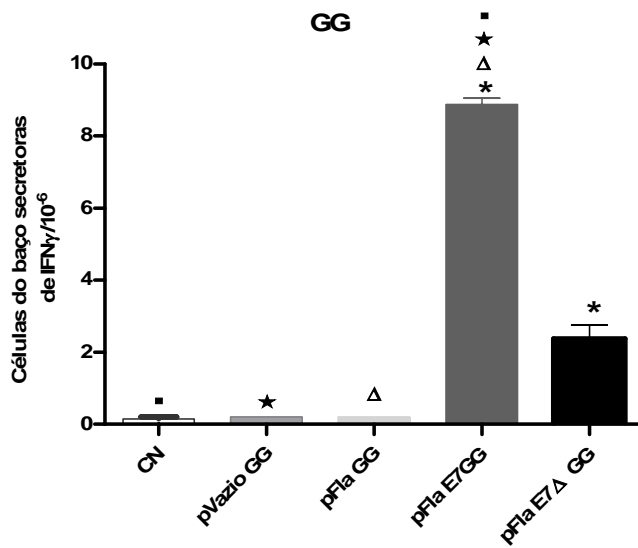
Os animais imunizados com as vacinas de DNA, tanto por via intramuscular quanto por via ID, tiveram seus baços coletados em condições asépticas e submetidos a ensaios de ELISPOT. Como mostrado na figura 19, grupos experimentais de camundongos apresentaram diferenças significativas no número de células do baço produtoras de IFN- $\gamma$  quando estimuladas com o peptídeo específico de E7. Os grupos PBS, pVazio, e pFla foram definidos como controle, e o pFla especificamente serviu de ponto de corte, onde seriam descontados os “spots” inespecíficos do ensaio. Assim, os camundongos imunizados com a construção pFlaE7, tiveram um número 8 vezes superior, que o controle negativo pFla. Já a construção pFlaE7 $\Delta$  teve um aumento de 2 vezes quando comparada ao mesmo controle.

As mesmas construções administradas pela via intramuscular mostraram resultados divergentes. Os experimentos foram feitos de maneira concomitante e as mesmas padronizações foram seguidas. A construção pFlaE7 mostrou um número de células do baço secretoras de IFN- $\gamma$  2 vezes maior que o controle Poly-FliCd. Dessa vez, a construção pFlaE7 $\Delta$  não apresentou um número de células do baço secretoras de IFN- $\gamma$  superior a pFla.

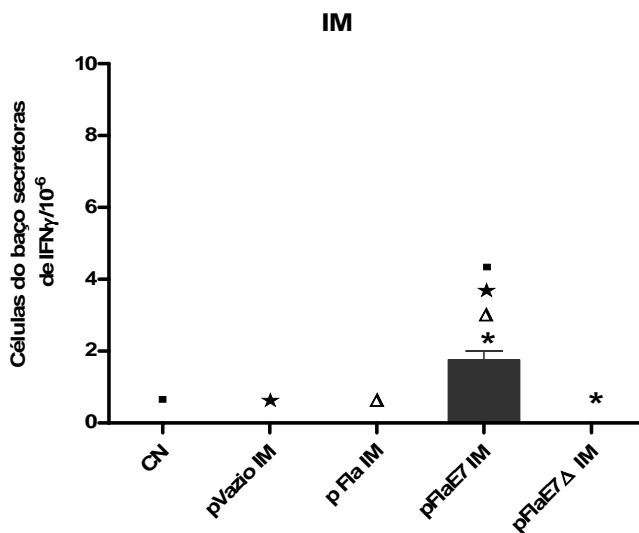
Quando comparadas, as mesmas construções administradas por diferentes vias, nota-se um considerável aumento nas células do baço secretoras de IFN- $\gamma$  é visto quando a via ID é utilizada. Em pFlaE7, ocorre um aumento de 4 vezes. A construção pFlaE7 $\Delta$  não apresentou células de baço secretoras de IFN- $\gamma$ .



A)



B)



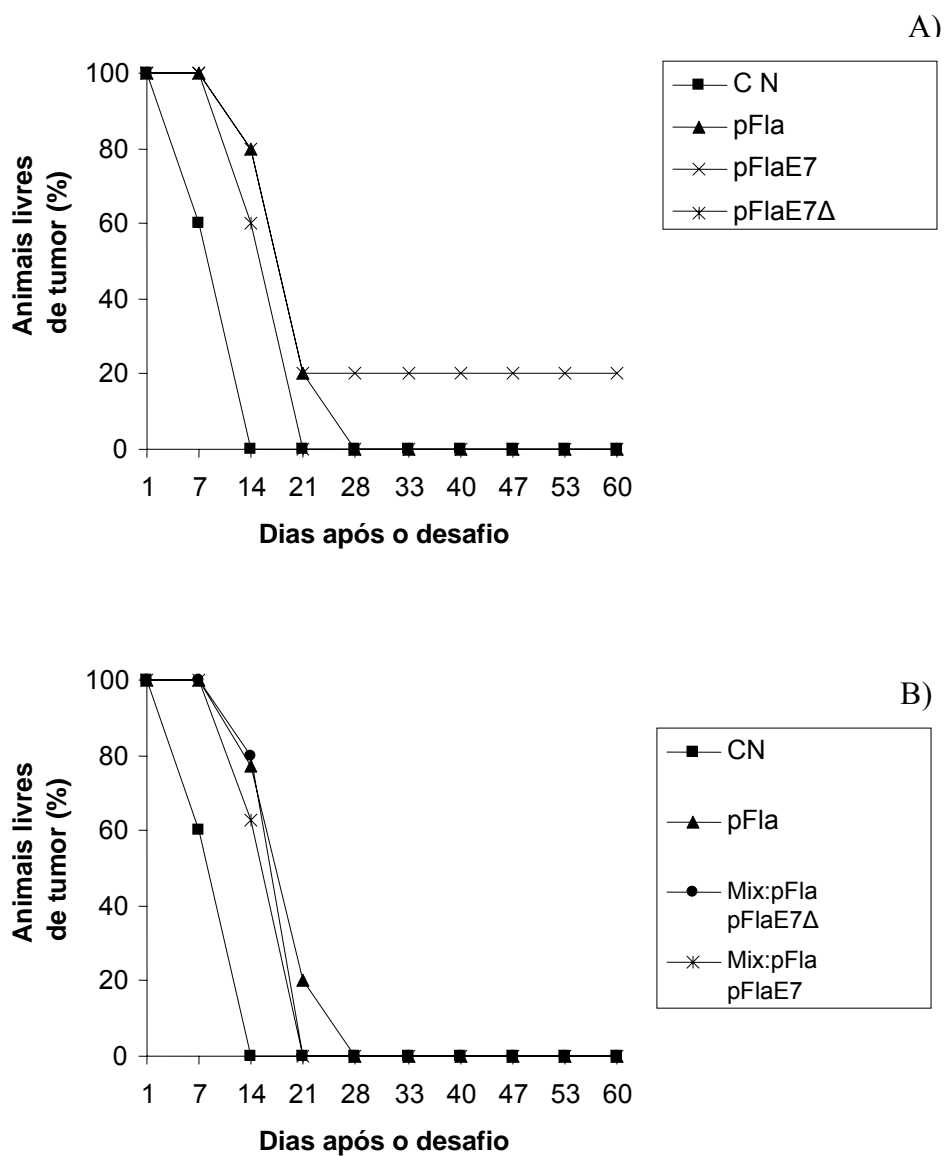
**Figura 19. Perfil de células do baço secretoras de IFN- $\gamma$ , em animais imunizados com as vacinas de DNA pFla, pFlaE7 e pFlaE7 $\Delta$ .** ELISPOT para determinação do número de células secretoras de IFN- $\gamma$  por 10 $^6$  células do baço. Pode-se notar apenas os grupos pFlaE7 e pFlaE7 $\Delta$ , em imunizações com “Gene Gun” mostraram células secretoras de IFN- $\gamma$ . A construção pFlaE7, quando administrada por via intramuscular, também mostrou células secretoras de IFN- $\gamma$ , porém numa intensidade 3 vezes inferior à mesma construção quando inoculada por via GG. Em A observa-se também que pFLAE7GG apresentou melhor resposta quando comparada aos demais grupos, onde  $p \leq 0,05$ , representado pelos símbolos  $\blacksquare$  = pFLAE7GG X CN;  $\star$  = pFLAE7GG X pVazioGG;  $\Delta$  = pFLAE7GG X pFLAGG e  $*$  = pFLAE7GG X pFLAE7 $\Delta$ GG. Em B, mesmo que a via intramuscular seja menos promissora, a estrutura pFLAE7IM apresentou melhor resposta quando comparada aos demais grupos, onde  $p \leq 0,05$ , representado pelos símbolos  $\blacksquare$  = pFLAE7IM X CN;  $\star$  = pFLAE7IM X pVazioIM;  $\Delta$  = pFLAE7IM X pFLAIM e  $*$  = pFLAE7IM X pFLAE7 $\Delta$ IM.

#### 4.2.5 Esquema vacinal terapêutico e proteção ao desafio com células TC-1.

Grupos de camundongos C57BL6 receberam células TC-1 e em seguida foram imunizados com o protocolo vacinal exposto na figura 5. Quando assim ensaiados, o grupo experimental que recebeu a construção pFla apresentou 20% de proteção ao crescimento tumoral. A construção pFlaE7 $\Delta$  não apresentou camundongos protegidos ao crescimento tumoral. (Fig. 20 A). As demais construções, pFla e o vetor Poly vazio, utilizadas como controle negativo, também não mostraram animais protegidos do crescimento tumoral.

Comparando a eficiência da vacina de DNA pFlaE7 em proteger animais de células tumorais TC-1, vê-se uma diferença significativa entre a abordagem profilática e a terapêutica (Fig. 16 A e Fig. 17). Se administradas de forma terapêutica, as vacinas protegem 20% dos animais; ao passo que administradas de forma profilática protegem 100% dos animais.

Uma segunda abordagem foi testada no ensaio vacinal de proteção terapêutica. Nesta abordagem empregamos a administração concomitante da construção pFla, que codifica a flagelina FliC<sub>d</sub> intacta, às construções que expressar<sup>7</sup> B) Isso permitiria a expressão de flagelina completa no citoplasma das células alvo em conjunto com a flagelina híbrida fusionada à proteína E7. Pode ser visto na figura 20 B, que nenhuma proteção adicional foi conferida com este tipo de abordagem. De fato, a co-administração do vetor pFla eliminou a proteção terapêutica conferida pelo vetor pFlaE7.



**Figura 20.** Desafio com células TC-1 em animais imunizados de maneira terapêutica com as vacinas de DNA pFla, pFlaE7 e pFlaE7Δ. Em A, é mostrado o nível de proteção dos animais tratados com as formulações vacinais de DNA via GG, uma vez que essa foi mais promissora em ensaios profiláticos. Pode-se observar que a formulação pFlaE7, mostrou 20% de proteção, diferindo significativamente de quando administrada na abordagem profilática. Em B, testes adicionais foram realizados, co-administrando a construção que expressa a flagelina FliC<sub>d</sub> completa às outras vacinas de DNA.

## 5 DISCUSSÃO

O uso de estratégias vacinais para contenção e eliminação do câncer é objeto de estudo de vários grupos de pesquisa em todo o mundo (Finn., 2003; Mocelin et al., 2004). A concepção de que células neoplásicas adaptam-se e podem evadir-se de respostas imunológicas antitumorais é convidativa para o desenvolvimento de imunoterapias que subvertam tais mecanismos de escape. Existem ainda vantagens em utilizar tais estratégias como sua baixa toxicidade, quando comparada às terapias tradicionais como a quimioterapia e a radioterapia. Diversos grupos tem gerado promissores resultados. (Barbuto et al., 2004; Avigan et al., 2004; Lu et al 2004; Adams et al. 2004).

Por conta da heterogeneidade humana, os testes clínicos preliminares são geralmente menos eficientes do que ensaios em laboratórios (Lewis, 2004). Por isso, não existem modelos ideais para o estudo de terapias imunes contra o câncer. Os testes realizados em humanos são frequentemente feitos em pacientes terminais, onde a patologia já se encontra bem avançada e possivelmente outras estratégias de contenção já foram exaustivamente empregadas (Mocelin et al., 2004). Os modelos animais, apesar de não substituírem os testes clínicos em humanos, podem ser ferramentas úteis para a otimização de sistemas de entrega vacinais, triagem de epítomos e de adjuvantes, elucidação de respostas imunes protetoras (Lewis, 2004). O modelo adotado por nosso trabalho é utilizado amplamente e baseia-se no uso de células provenientes do epitélio pulmonar de camundongos C57 BL6, transduzidas com vetores virais recombinantes, que inseriram os genes E6 e E7 do HPV-16, e uma cópia do gene c-ras mutado. Quando inoculadas em camundongos da mesma linhagem, é observado o crescimento de tumores que expressam as mesmas oncoproteínas E6 e E7 encontrada em lesões do colo uterino induzidas pelo HPV-16 em humanos. O que preserva a natureza dos antígenos a serem testados mesmo no modelo murino.

Muitos trabalhos demonstram o potencial adjuvante de agonistas dos receptores Toll-like em imunoterapia de câncer. Podem ser bactérias vivas, como *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG) que sendo utilizado a pelo menos 30 anos no tratamento de câncer de bexiga. Foi demonstrado posteriormente, que os bacillus BCG são potentes ativadores de TLR2 e TLR4 (Tsuji et al., 2000; Razak, 2007). Outra terapia utilizando bactérias liofilizadas, OK-432 (*Streptococcus* do grupo A) , é empregada no tratamento de câncer cervical, câncer gástrico e carcinoma oral de células escamosas (Hironaka et al., 2006). Além do uso de bactérias, os agonistas dos receptores Toll-like tem sido utilizados em sua

forma purificada ou combinada a antígenos tumorais (Rakoff-Nahoum e Medzhitov, 2009). Por exemplo, a administração de LPS para o tratamento de câncer coloretal e câncer de pulmão está em testes clínicos de fase II (Otto e al., 1996). Os agonistas do TLR9, DNA de origem bacteriana contendo citosina metilada (CpG), são utilizados para o tratamento de câncer no cérebro, câncer de pele, câncer renal e linfoma (Carpentier, 2006; Krieg, 2007). Nosso trabalho, envolveu diferentes agonistas dos receptores Toll-like. As cepas de salmonelas vacinais, possuem LPS, pois são gram negativas. Porém, como pode ser observado na figura 10, nenhum efeito anti-tumoral pode ser constatado, para a cepa SL5928 que contém LPS, mas não flagelina. As vacinas de DNA pFlaE7 e pFlaE7 $\Delta$  são extraídas de bactérias e possivelmente podem interagir com os receptores TLR9. No entanto, como mostra as figuras 16 e 18, somente o uso de DNA extraído de bactérias, como o plasmídeo pPoly vazio, não mostrou atividade antitumoral no modelo proposto.

A escolha da flagelina como adjuvante foi embasada em vários trabalhos que exploraram seu potencial vacinal frente à patógenos bacterianos e virais (Wu et al., 1989; Newton et al., 1991; Newton et al., 1995). Porém, pouco se sabia a respeito do papel anti-tumoral da flagelina. Investigações iniciais foram feitas por Sfondrini e colaboradores (2006), que exploraram a atividade pró-inflamatória da flagelina na imunoterapia do câncer em modelo murino. Verificaram que se a flagelina administrada 8 a 10 dias após a implantação do tumor promove significativa diminuição na taxa de crescimento tumoral. No entanto, se administrada ao mesmo tempo em que a implantação do tumor foi verificado um aumento na taxa de crescimento tumoral. Os ensaios imunológicos posteriores verificaram um caráter dual da flagelina, que era capaz de estimular respostas imunológicas tanto do tipo Th1, quanto do tipo Th2, e somente as respostas do tipo Th1 foram interessantes para a contenção do tumor (Sfondrini et al., 2006).

Atualmente, alguns trabalhos tem demonstrado o potencial de agonistas Toll-like como indutores ou facilitadores da tumorigênese (Rakoff-Nahoum e Medzhitov, 2009). É de se esperar que os estímulos pró-inflamatórios como a expressão de moléculas co-estimuladoras, atração e maturação de células apresentadoras de antígenos no microambiente tumoral e secreção de citocinas específicas venham de alguma maneira otimizar a imunoterapia tumoral (Smith et al., 2004) Contudo, achados recentes revelam que estímulos pró-inflamatórios gerados na estimulação dos receptores toll-like, incluem o estímulo da angiogênese, o que pode facilitar a progressão, migração e invasão de tecidos adjacentes (Pidgeon et al., 1999; Harmaey et al., 2002; Huang et al., 2007; ). Além disso, é necessário comentar que os receptores Toll-

like, quando estimulados, transduzem a sinalização via Myd88 (exceto TLR3). Esta sinalização pode ativar a via das MPAK e IRF, além de NF- $\kappa$ B. A via das MAPK em especial, pode induzir estímulos proliferativos e aumentar o crescimento tumoral (Rakoff-Nahoum e Medzhitov, 2009). Um estudo feito com camundongos *knock-out* para Myd88, num modelo de estudo para Polipose adenomatosa no cólon. Os resultados demonstraram que os camundongos deficientes em Myd88, apresentavam menor incidência e tamanho de tumores quando comparados a camundongos normais. Um dos agonistas Toll-like utilizados foi justamente a flagelina abordada por nosso trabalho (Rakoff-Nahoum e Medzhitov, 2007). Como assegurar que o adjuvante gerará apenas as condições benéficas no combate e contenção do desenvolvimento do tumor?

Inicialmente foi proposto que a porção N-terminal da flagelina fosse geneticamente fusionada à E7 para que formassem um complexo adjuvante-antígeno. Como sistema de entrega, o trabalho utilizou salmonelas vacinais e vacinas DNA. No momento da concepção deste projeto, não se conheciam quais eram as regiões da flagelina que interagem com o receptor *toll-like* do tipo 5 (TLR5). Menos ainda, se sabia quais eram os domínios da flagelina envolvidos na interação com os receptores intracelulares Ipaf e Naip5. Posteriormente, um trabalho correlacionou regiões na estrutura da flagelina FliCd à ligação aos receptores TLR 5 e puderam constatar que tanto regiões N-terminal, compreendidas entre os resíduos de aminoácidos 78-129 e 135-173 quanto região C-terminal, compreendidas 395-444, são responsáveis pela ligação ao receptor TLR 5 (Smith et al., 2004). Desse modo, ambas as construções, pFlaE7 e pFlaE7 $\Delta$ , não possuem o domínio C-terminal da flagelina necessário à interação com o receptor TLR5.

Existe ainda uma controvérsia a respeito de quais domínios conformacionais da flagelina seriam reconhecidos pelos receptores Ipaf e Naip5. Recentemente, Lightfield e colaboradores (2008), demonstraram que a região C-terminal da flagelina desencadeia o processo de piroptose, com a produção de caspase 1 e consequente morte celular. Apenas os 35 resíduos finais do domínio D0 C-terminal foram suficientes para ativação do receptor Naip5. Foi o primeiro trabalho a diferenciar os domínios da flagelina que interagem com TLR5 daqueles que interagem com Naip5. No entanto, não foi excluída a possibilidade de interação do domínio D0 da região N-terminal, pois o trabalho não a testou (Lightfield et al., 2008). O próprio trabalho comenta sobre grupos (Verma et al., 2005; Franchi et al., 2006) que sugeriram que a porção N-terminal da flagelina poderia contribuir com a ativação de Ipaf. Não há evidências na literatura, que apontam a ausência de interação da região N-terminal da flagelina

com receptores Ipaf e Naip5. Nosso trabalho explorou apenas a região N-terminal da flagelina, de modo que não há evidência direta de interação com Naip5 ou Ipaf. Como continuação do trabalho, seria importante testar se as flagelinas truncadas expressas pelos vetores pFlaE7 e pFlaE7 $\Delta$  podem interagir com os receptores.

A construção de salmonelas vacinais carregando o complexo adjuvante-antígeno iniciou-se com a transformação de cepas de salmonelas atenuadas SL5928 com o plasmídio pLS E7. Foi verificado que a cepa de salmonela vacinal SL FlaE7 não era capaz de montar flagelos, acumulando a proteína FlaE7 somente no citoplasma. A posterior imunização oral com a cepa SL FlaE7 não apresentou proteção ao desafio com células tumorais TC-1 (Fig. 10). Ensaio de ELISPOT também não verificaram a presença de células do baço secretoras de IFN- $\gamma$ . Inicialmente foi proposto utilizar a cepa de salmonela vacinal como reforço às imunizações com vacinas de DNA, porém os resultados apresentados utilizando apenas SL FlaE7 foram desanimadores e o modelo “sensibilização-reforço” não foi realizado.

As vacinas de DNA foram construídas utilizando fusões por sobreposição (*SOEing*). Alguns trabalhos correlacionam o nível de expressão da proteína E7 à magnitude da resposta imunológica gerada em imunizações. Há relatos na literatura de que o HPV explora a redundância do código genético e assim utiliza códons raros (e seus relativos RNAt) à célula hospedeira reduzindo a expressão de genes virais. Assim, tornam-se reduzidas as chances de apresentação via MHC-I (Tindle et al., 2002). Quando a expressão é aumentada, por otimização de “codon usage”, a resposta imunológica mostrou-se proporcionalmente maior (Cid-Arregui et al., 2003). Nosso trabalho não otimizamos o “codon usage” da porção de E7 clonada na flagelina. Fato esse que possivelmente pode estar restringindo a expressão da proteína heteróloga e interferindo em sua expressão. Uma evidência de que isto pode estar acontecendo é a fraca intensidade da banda FlaE7 quando compara a flagelina pura, como observado na figura 11. O mesmo acontece para a banda relativa à FlaE7 $\Delta$ .

Uma vez construídas, as vacinas de DNA necessitavam de evidências que comprovassem a expressão de suas proteínas, bem como a localização e o peso molecular correspondente. Porém, foi necessário padronizar no laboratório os ensaios de transfecção, imunofluorescência e *western blot* de células eucariontes. Esforço que envolveu mais linhagens celulares do que as apresentadas na figura 12. Quando as melhores condições de transfecção foram estabelecidas, as vacinas de DNA pFla, pFlaE7 e pFlaE7 $\Delta$  foram então testadas. Como observado na figura 13, as proteínas FlaE7 e FlaE $\Delta$  foram expressas e reconhecidas por

anticorpos anti-Fla e anti-E7. Isso indica que as proteínas híbridas conservam as propriedades antigênicas de ambos os blocos constituintes. O peso molecular das proteínas FlaE7 e FlaE7 $\Delta$  foi correspondente ao calculado *in silico*, conforme mostrado na figura 14.

A ativação de TLR5 por proteínas expressas pelas vacinas de DNA pFlaE7 e pFlaE7 $\Delta$  não ocorreu pois as flagelinas codificadas estavam deletadas da porção C-terminal. Além disto, vacinas de DNA derivadas do pPoly direcionam as proteínas para o espaço intracitoplasmático. Sabe-se que os receptores TLR5 são responsáveis apenas pelo reconhecimento de flagelinas no ambiente extracelular (Cruz et al., 2000).

O reconhecimento da flagelina no espaço intracelular é mediado por receptores do tipo Ipaf e NAIP 4 (Lightfield et al., 2008). Não há relatos na literatura que explorem a capacidade de ativação destes receptores como um potencial efeito adjuvante a ser empregado na imunoterapia de tumores. Conforme comentado anteriormente, o reconhecimento da flagelina no ambiente intracitoplasmático induz a via de ativação do NF- $\kappa$ B e o efeito diferencial na indução de piroptose via caspase-1. A ativação de NF- $\kappa$ B gera estímulos semelhantes àqueles relatados aos receptores toll-like, conforme discutido acima. Naturalmente uma pergunta remanesce: E a ativação de *inflammasome*, teria potencial promissor na imunoterapia do câncer cervical?

Os ensaios de desafio com células TC-1 realizados por nosso trabalho, demonstram que a vacina de DNA pFlaE7 protege um número significativo de animais quando administradas de maneira profilática a inoculação do tumor. É interessante notar que a quantidade de células TC-1 inoculadas para a formação dos tumores no desafio foi  $5 \times 10^6$  e, conseqüentemente, a contenção do crescimento não se estendeu à totalidade dos animais desafiados (70%). Ao passo que o mesmo regime vacinal com o pFlaE7 protegeu 100% dos animais desafiados com  $10^5$  células TC-1. Se for considerado que a quantidade de células tumorais inoculadas correlaciona-se a uma escala de tempo de progressão tumoral, poderíamos inferir que quanto mais precoce a administração da vacina de DNA pFlaE7 maior seu efeito terapêutico. Isso corroborou com os achados nos ensaios terapêuticos apresentados. A vacina pFlaE7 protegeu 20% dos animais imunizados posteriormente à implantação do tumor. Isso dificulta um pouco sua concepção de candidata à imunoterapia do câncer cervical, pois as lesões geralmente apresentam um longo período de tempo antes de serem tratadas.

Uma outra informação importante gerada pelo nosso trabalho diz respeito às vias de administração utilizadas nas imunizações com as vacinas de DNA. Como pode ser observado na figura 16, as imunizações feitas pela via intradérmica por biobalística (GG) foi



sensivelmente mais eficaz quando compara à via intramuscular.. É interessante ressaltar que a dose utilizada via ID foi 100 vezes menor ao correspondente aplicado pela via IM. Foi sugerido que o tipo de resposta imunológica varia se as vacinas de DNA forem administradas por via ID ou IM. Imunizações via ID favorecem a indução de “células T Helper” do tipo Th2, enquanto que nas imunizações com DNA via intramuscular, as repostas são preferencialmente do Tipo Th1. (McCluskie et al., 1999).

Diferente de vacinas profiláticas contra patógenos que requerem títulos protetores de anticorpos, as vacinas terapêuticas contra o câncer requerem respostas imunes do tipo celular, sobretudo, aquelas mediadas por linfócitos T citotóxicos. De acordo com vários trabalhos publicados, há uma relação diretamente proporcional entre a geração CTLs específicos contra E7 e a proteção frente ao desafio com células TC-1 (Roden et al., 2004; Wu, 2004, Kim et al., 2007; Lasaro et al., 2008). Porém, vacinas baseadas em células T ainda são pobremente compreendidas (Appay et al., 2008). O fracasso do ensaio clínico realizado pela Merck com vacinas profiláticas / terapêuticas para infecção pelo Virus da Imunodeficiência humana (HIV) colocou esta dificuldade em evidência. As expectativas de sucesso em humanos baseava-se num estudo prévio realizado em modelo símio (Mattapallil et al., 2006). Há uma maior complexidade em modular respostas imunes do tipo celular do que as do tipo humoral e isso gera impactos na eficiência da estratégia vacinal empregada. Se a resposta imune não for modulada de maneira ideal, a resultante pode até mesmo privilegiar o crescimento tumoral.

Em nosso trabalho, ensaios imunológicos foram realizados buscando a caracterização das respostas imunes geradas pelos regimes vacinais empregados. Inicialmente, foi realizada citometria de fluxo (dados não mostrados) onde não foi detectada a presença de células  $CD8^+$  /  $IFN-\gamma^+$  em níveis significativos como sugeridos por outros trabalhos (Roden et al., 2004; Wu, 2004, Kim et al., 2007; Lasaro et al., 2008). Suspeitando de baixa sensibilidade da citometria de fluxo para o modelo proposto, ELISPOT's foram realizados para verificação de células do baço secretoras de  $IFN-\gamma$ . Como mostraram os resultados, os únicos grupos que apresentaram resultados positivos foram aqueles imunizados com as construções vacinais pFlaE7 e pFlaE7 $\Delta$ . Por ser uma técnica mais sensível que a citometria de fluxo, pode-se dizer que houve uma ativação diferencial apenas nas construções que expressavam E7 e isso corrobora com os dados de proteção. A proteção conferida pela construção pFlaE7 foi acompanhada de células do baço secretoras de  $IFN-\gamma$ . O ensaio de ELIPOT realizado porém não identificou qual a população de células do baço respondeu ao peptídeo E7. Embora não tenha sido demonstrado

experimentalmente por nós, espera-se que essas células representem linfócitos T CD8<sup>+</sup> visto que o peptídeo empregado é definido um epítipo reconhecido especificamente por essas células.

Quando a vacina de DNA pFlaE7 foi utilizada no esquema de imunização terapêutica, apenas 20% dos animais mostraram-se protegidos. O que difere significativamente dos resultados observados pela mesma construção vacinal em ensaios profiláticos, que protegeram 100% dos animais. Ainda neste ensaio terapêutico, um grupo de animais além de receber pFlaE7, recebeu também pFLa. Imaginou-se que a flagelina completa, expressa por pFla, tivesse algum efeito adjuvante adicional sobre pFlaE7. O que se observou, é que a proteção nos animais assim imunizados era menor que os animais que receberam apenas pFlaE7.

Os nossos resultados demonstram que a vacina de DNA pFlaE7 possui efeito terapêutico superior ao conferido pela vacina pFlaE7 $\Delta$ . Isto sugere que a deleção na região c-terminal de E7, apesar de preservar o peptídeo CD8 / E7, interfere de forma negativa à eficácia da formulação vacinal. Esta deleção foi idealizada pensando na redução do potencial oncogênico.

Diante dessas observações, pode-se concluir que a construção vacinal pFlaE7 apresenta níveis de proteção significativos a desafio com células TC-1, quando empregada em imunizações profiláticas. Paralelamente, ensaios imunológicos demonstraram a geração de células do baço responsivas ao peptídeo E7/CD8 de forma específica. No entanto, as condições para o seu emprego em imunizações terapêuticas ainda precisam ser otimizadas. A vacina de pFlaE7 $\Delta$  mostrou eficiência inferior quando comparada à pFlaE7, já a Salmonela vacinal SL FlaE7 não apresentou resultados promissores, o que levou a suspensão do uso dessa última. Apesar da finalização do trabalho de mestrado a linha de pesquisa não está encerrada, visto que alguns parâmetros ainda deverão ser analisados, como o uso de novas construções baseadas na porção C-terminal. Acreditamos que nossos resultados sejam promissores e possam contribuir, num futuro não muito distante, para controle do câncer cervical.

## 6 CONCLUSÕES

- A cepa de salmonela vacinal SL FlaE7, quando empregada em imunizações profiláticas, não foi capaz de conferir proteção a camundongos desafiados com  $5 \times 10^5$  células TC-1;
- A vacina de DNA pFlaE7, quando administrada de forma profilática pela via intradérmica por biobalística, protegeu 80% dos animais frente ao desafio com  $5 \times 10^5$  células TC-1;
- A vacina de DNA pFlaE7 administrada de forma profilática pela via intradérmica por biobalística, protegeu 100% dos animais desafiados com  $1 \times 10^5$  células TC-1;
- A deleção da porção C-terminal de E7 na construção pFlaE7 $\Delta$  reduziu a eficácia da vacina quando comparada à pFlaE7, que contém E7 completa; tanto na proteção em ensaios de desafio, quanto na geração de células do baço sensíveis aos peptídeos;
- A via de administração intradérmica por biobalística (GG) mostrou maior eficiência do que a via intramuscular, produzindo um maior efeito terapêutico com uma menor dose de DNA;
- Células do baço de animais imunizados com a vacina de DNA pFlaE7 secretaram IFN- $\gamma$  de forma específica quando estimuladas com o peptídeo E7 / CD8;
- Nossos dados não permitem a correlação direta entre a ativação de receptores Ipaf / Naip5 e a proteção observada nos ensaios profiláticos com a vacina de DNA pFlaE7 ;
- Os ensaios terapêuticos utilizando a vacina de DNA pFlaE7 mostram que 20% dos animais foram protegidos contra o desenvolvimento do tumor;

- O uso da construção pFla como adjuvante da vacina de DNA pFlaE7 em imunizações terapêuticas, resultou numa diminuição da proteção ao desafio com células TC-1, quando comparada com pFlaE7 isoladamente.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alves AM, Lásaro MO, Almeida DF, Ferreira LC. New vaccine strategies against enterotoxigenic *Escherichia coli*. I: DNA vaccines against the CFA/I fimbrial adhesin. *Braz J Med Biol Res*. 1999; Feb;32(2):223-9.

Appay V, Douek DC, Price DA. CD8+ T cell efficacy in vaccination and disease. *Nat Med*. 2008 Jun;14(6):623-8.

Applequist SE, Rollman E, Wareing MD, Lidén M, Rozell B, Hinkula J, Ljunggren HG. Activation of innate immunity, inflammation, and potentiation of DNA vaccination through mammalian expression of the TLR5 agonist flagellin. *J Immunol*; 2005; Sep; 15;175(6):3882-91.

Badaracco G, Venuti A, Morello R, Muller A, Marcante ML. Human papillomavirus in head and neck carcinomas: prevalence, physical status and relationship with clinical/pathological parameters. *Anticancer Res*. 2000 Mar-Apr;20(2B):1301-5.

Barry MA, Lai WC, Johnston SA. Protection against mycoplasma infection using expression-library immunization. *Nature*. 1995; Oct 19;377(6550):632-5.

Boyd JT, Doll RA. A study of the aetiology of carcinoma of the cervix. *Br Cancer*. 1964; 18: 419-434.

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

Broering R, Wu J, Meng Z, Hilgard P, Lu M, Trippler M, Szczeponek A, Gerken G, Schlaak JF. Toll-like receptor-stimulated non-parenchymal liver cells can regulate hepatitis C virus replication. *J Hepatol*. 2008; Jun;48(6):914-22.

Burnet FM. The Concept of immunological surveillance. *Progress in experimental tumor research* 1970; 13:1-27,

Carpentier A, Laigle-Donadey F, Zohar S, Capelle L, Behin A, Tibi A, Martin-Duverneuil N, Sanson M, Lacomblez L, Taillibert S, Puybasset L, Van Effenterre R, Delattre JY, Carpentier AF. Phase 1 trial of a CpG oligodeoxynucleotide for patients with recurrent glioblastoma. *Neuro Oncol*. 2006; Jan;8(1):60-6.

Chan CW, Housseau F. The 'kiss of death' by dendritic cells to cancer cells. *Cell Death Differ*. 2007; Jan;15(1):58-69.

Chen RW, Aalto Y, Teesalu T, Dürst M, Knuutila S, Aaltonen LM, Vaheri A. Establishment and characterisation of human papillomavirus type 16 DNA immortalised human tonsillar epithelial cell lines. *Eur J Cancer*. 2003; Mar;39(5):698-707.

Cid-Arregui A, Juarez V, Zur Hausen H. A synthetic E7 gene of human papillomavirus type 16 that yields enhances expression o the protein in mammalian cells and is useful for DNA immunization studies. *J Virol*. 2003; Apr; p. 4928-4937.

Dhodapkar MV, Steinman RM, Krasovsky J, Munz C, Bhardwaj N. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med*. 2001; Jan; 15;193(2):233-8.

Donnelly JJ, Wahren B, Liu MA. DNA vaccines: progress and challenges. *J Immunol*. 2005; Jul; 15;175(2):633-9.

Duggan MA, Mcgregor SE, Stuart GC, Morris S, Chang-Poon V, Schepansky A, Honore L. The natural history of CIN I lesions. *Eur J Gynaecol Oncol*. 1998; 19(4):338-44.

Eiben OG, Buday J, Bosze P. Physique of patients with carcinoma of the female genital tract. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2004;25(6):683-8

Favre M, Breitburd F, Croissant O, Orth G. Chromatin-like structures obtained after alkaline disruption of bovine and human papillomaviruses. *J Virol*. 1977; Mar;21(3):1205-9.

Favre M, Orth G, Croissant O, Yaniv M. Human papillomavirus DNA: physical mapping of the cleavage sites of *Bacillus amyloliquefaciens* (BamI) and *Haemophilus parainfluenzae* (HpaII) endonucleases and evidence for partial heterogeneity. *J Virol*. 1977; Mar;21(3):1210-4.

Feltkamp MC, Smits HL, Vierboom MP, Minnaar RP, De Jongh BM, Drijfhout JW, Ter Schegget J, Melief CJ, Kast WM. Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope-containing peptide protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16-transformed cells. *Eur J Immunol*. 1993; Sep;23(9):2242-9.

Frazer IH. The role of vaccines in the control of STDs: HPV vaccines. *Genitourin Med*. 1996; Dec;72(6):398-403.

Gagnon F. Contribution to the study of the etiology and prevention of cancer of the cervix of the uterus. *Am J Obstet Gynecol* 1950; 60: 516-522.

Gissmann L, Pfister H, Zur Hausen H. Human papilloma viruses (HPV): Characterization of four different isolates. *Virology*. 1977; Feb;76(2):569-80.

Gissmann L, zur Hausen H. Inverted repetitive sequences in human papilloma virus 1 (HPV-1) DNA. *Virology*. 1977; Dec;83(2):271-6.

Gissmann L, zur Hausen H. Physical characterization of deoxyribonucleic acids of different human papilloma viruses (HPV). *Med Microbiol Immunol*. 1978; Nov 17;166(1-4):3-11.

Govan VA, Loubser S, Saleh D, Hoffman M, Williamson AL. No relationship observed between human p53 codon-72 genotype and HPV-associated cervical cancer in a population group with a low arginine-72 allele frequency. *Int J Immunogenet*. 2007; Jun;34(3):213-7.

Govan VA. A novel vaccine for cervical cancer: quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16 and 18) recombinant vaccine (Gardasil). *Ther Clin Risk Manag*. 2008; Feb;4(1):65-70.

Grégoire C, Chasson L, Luci C, Tomasello E, Geissmann F, Vivier E, Walzer T. The trafficking of natural killer cells. *Immunol Rev.* 2007; Dec;220:169-82.

Harmey JH, Bucana CD, Lu W, Byrne AM, McDonnell S, Lynch C, Bouchier-Hayes D, Dong Z. Lipopolysaccharide-induced metastatic growth is associated with increased angiogenesis, vascular permeability and tumor cell invasion. *Int J Cancer.* 2002 Oct 10;101(5):415-22.

Hausen Zur H. Immortalization of human cells and their malignant conversion by high risk human papillomavirus genotypes. *Semin Cancer Biol.* 1999; Dec;9(6):405-11

Hoiseth SK, Stocker BAD. Aromatic-dependent *Salmonella Typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* 1981; 291, pp. 238-239.

Hormaeche CE, Joysey HS, Desilva L, Izhar M, Stocker BAD. Immunity induced by live attenuated *Salmonella* vaccines. *Res. Microbiol.* 1990; 141, pp. 765-768.

Huang B, Zhao J, Shen S, Li H, He KL, Shen GX, Mayer L, Unkeless J, Li D, Yuan Y, Zhang GM, Xiong H, Feng ZH. *Listeria monocytogenes* promotes tumor growth via tumor cell toll-like receptor 2 signaling. *Cancer Res.* 2007 May 1;67(9):4346-52.

Ibrahim, GF, Fleet GH, Lyons MJ, Walker RA. Method for the isolation of highly purified *Salmonella* flagellins. *J Clin Microbiol.* 1985; Dec;22(6):1040-4.

Kim JW, Hung CF, Juang J, He L, Kim TW, Armstrong DK, Pai SI, Chen PJ, Lin CT, Boyd DA, Wu TC. Comparison of HPV DNA vaccines employing intracellular targeting strategies. *Gene Ther.* 2004; Jun;11(12):1011-8.

Koss LG. Cervical pap smear. New directions. *Cancer* 1993; 71: 1406-1414.

Koss LG. Diagnostic accuracy in cervicovaginal cytology. *Arch Pathol Lab Med.* 1993; Dec;117(12):1240-2.

Krieg AM. Development of TLR9 agonists for cancer therapy. *J Clin Invest.* 2007; May;117(5):1184-94.

Lásaro MO, Diniz MO, Reyes-Sandoval A, Ertl HC, Ferreira LCS. Anti-tumor DNA vaccines based on the expression of human papillomavirus-16 E6/E7 oncoproteins genetically fused with the glycoprotein D from herpes simplex virus-1. *Microbes Infect.* 2005 ; Dec;7(15):1541-50.

Lásaro MO, Hildegund CJE. Human papillomavirus-associated cervical cancer: Prophylactic and therapeutic vaccines. *Gene Ther Mol Biol* 2004; Vol 8, 291-306.

Lásaro MO, Luiz WB, Sbrogio-Almeida ME, Nishimura RE, Guth BEC, Ferreira LCS. Combined Vaccine Regimen Based on Parenteral Priming with a DNA Vaccine and Administration of an Oral Booster Consisting of a Recombinant *Salmonella enterica* Serovar

Typhimurium Vaccine Strain for Immunization against Infection with Human-Derived Enterotoxigenic *Escherichia coli* Strains. *Infect. Immun.* 2004 ; Nov. 2004, p. 6480–6491.

Lásaro MO, Tatsis N, Hensley SE, Whitbeck JC, Lin SW, Rux JJ, Wherry EJ, Cohen GH, Eisenberg RJ, Ertl HC. Targeting of antigen to the herpesvirus entry mediator augments primary adaptive immune responses. *Nat Med.* 2008; Feb;14(2):205-12.

Lin KY, Guarnieri FG, Staveley-O'Carroll KF, Levitsky HI, August JT, Pardoll DM, Wu TC. Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. *Cancer Res.* 1996 ; Jan 1;56(1):21-6.

Ling M, Kanayama M, Roden R, Wu TC. Preventive and therapeutic vaccines for human papillomavirus-associated cervical cancers. *J Biomed Sci.* 2000; Sep-Oct;7(5):341-56.

Liu WJ, Gao F, Zhao KN, Zhao W, Fernando GJ, Thomas R, Frazer IH. Codon modified human papillomavirus type 16 E7 DNA vaccine enhances cytotoxic T-lymphocyte induction and anti-tumour activity. *Virology.* 2002; Sep 15;301(1):43-52.

Liu WJ, Zhao KN, Gao FG, Leggatt GR, Fernando GJ, Frazer IH. Polynucleotide viral vaccines: codon optimisation and ubiquitin conjugation enhances prophylactic and therapeutic efficacy. *Vaccine.* 2001; Dec 12;20(5-6):862-9.

Liu WJ, Zhao KN, Gao FG, Leggatt GR, Fernando GJ, Frazer IH. Polynucleotide viral vaccines: codon optimisation and ubiquitin conjugation enhances prophylactic and therapeutic efficacy. cytotoxic T-lymphocyte induction and anti-tumour activity. *Virology* 2003; 301(1):43–53.

Liu X, Clements A, Zhao K, Marmorstein R. Structure of the human Papillomavirus E7 oncoprotein and its mechanism for inactivation of the retinoblastoma tumor suppressor. *J Biol Chem.* 2006; Jan 6;281(1):578-86.

Mahdavi A, Monck BJ. Vaccines against Human Papillomavirus and cervical cancer: Promises and challenges. *The oncologist.* 2005;10:528-538.

Mahdavi A, Monk BJ. Vaccines against human papillomavirus and cervical cancer: promises and challenges. *Oncologist.* 2005; Aug;10(7):528-38

Mattapallil JJ, Douek DC, Buckler-White A, Montefiori D, Letvin NL, Nabel GJ, Roederer M. Vaccination preserves CD4 memory T cells during acute simian immunodeficiency virus challenge. *J Exp Med.* 2006 Jun 12;203(6):1533-41.

Mastroeni P, Chabalgolty AP, Dunstan SJ, Maskel DJ, Dougan G. *Salmonella*. Immune responses and vaccines. *The veterinary journal,* 2000; 161, pp.132-164.

Matzo WT, Boysen M, Kalantari M, Johansson B, Hagmar B. Low detection rate of HPV in oral and laryngeal carcinomas. *Acta Oncol.* 1998;37(1):73-6.



M<sup>c</sup>cluskie MJ, Davis HL. Mucosal immunization with DNA vaccines. *Microbes Infect.* 1999; Jul;1(9):685-98.

Meisels A, Morin C: *Cytopathology of the uterine cervix.* Chicago, American society of clinical pathologists press, 1991.

Mizel SB, West AP, Hartgen RR. Identification of a sequence in human Toll-like Receptor 5 require for the binding of Gram-negative Flagellin. *The Journ. Biol. Chem.* 2003; 278, pp. 23624-23629.

Moore MA, Tajima K. Cervical cancer in the asian pacific-epidemiology, screening and treatment. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2004; Oct-Dec;5(4):349-61.

Moretta L, Biassoni R, Bottino C, Cantoni C, Pende D, Mingari MC, Moretta A. Human NK cells and their receptors. *Microbes Infect.* 2002; Dec;4(15):1539-44

Moscicki AB, Ellenberg JH, Farhat S, Xu J. Persistence of Human Papillomavirus Infection in HIV-Infected and -Uninfected Adolescent Girls: Risk Factors and Differences, by Phylogenetic Type. *J Infect Dis* 2004; 190, 37-45.

Moscicki AB, Palafsky J, Schoolnick GK: The association between human papillomavirus, deoxyribonucleic acid status and the results of citologic rescreening tests in young sexually active women. *Am J Obstet Gynecol* 1991;165: 67-75.

Nassiel K, Roger V, Nassiel M. Behavior of mild cervical dysplasia during long-term follow-up. *Obstet Gynecol* 1986; 67:665-9.

Nees M, Geoghegan JM, Hyman T, Frank S, Miller L, Woodworth CD. Papillomavirus type 16 oncogenes downregulate expression of interferon-responsive genes and upregulate proliferation-associated and NF-kappaB-responsive genes in cervical keratinocytes. *J Virol.* 2001; May;75(9):4283-96.

Newton SMC, Joys S, Anderson TM, Kennedy SARC, Hovi ME, Stocker BAD. Expression and immunogenicity of an 18-residue epitope of HIV1 gp41 inserted in the flagellar protein of a *Salmonella* live vaccine. *Research in Microbiology* 1995; 146(3):203-216.

Newton SMC, Stocker BAD. Insertion of heterologous epitopes in *Salmonella* flagellin. *Mem. Inst. Butantã*, 1991; 53(1):53-58.

Newton, SMC, Jacob CO, Stocker BAD. Immune response to Cholera toxin epitope inserted in *Salmonella* Flagelin. *Science.* 1989; vol 244, pp. 70-72.

Orth G, Favre M, Croissant O. Characterization of a new type of human papillomavirus that causes skin warts. *J Virol.* 1977; Oct;24(1):108-20.

Otto F, Schmid P, Mackensen A, Wehr U, Seiz A, Braun M, Galanos C, Mertelsmann R, Engelhardt R. Phase II trial of intravenous endotoxin in patients with colorectal and non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer.* 1996; Sep;32A(10):1712-8.

Pass F, Reissig M, Shah KV, Eisinger M, Orth G. Identification of an immunologically distinct papillomavirus from lesions of epidermodysplasia verruciformis. *J Natl Cancer Inst.* 1977; Oct;59(4):1107-12.

Paz O. Surgery and radiation in the treatment of carcinoma of the uterine cervix, grade I. *Gac Med Caracas.* 1960; Jan-Mar;68:51-9.

Peng X, Hussain SF, Paterson Y. The ability of two *Listeria monocytogenes* vaccines targeting human papillomavirus-16 E7 to induce an antitumor response correlates with myeloid dendritic cell function. *J Immunol.* 2004; May 15;172(10):6030-8.

Pfister H, Gissmann L, zur Hausen H. Partial characterization of the proteins of human papilloma viruses (HPV) 1-3. *Virology.* 1977; Nov;83(1):131-7.

Pidgeon GP, Harmey JH, Kay E, Da Costa M, Redmond HP, Bouchier-Hayes DJ. The role of endotoxin/lipopolysaccharide in surgically induced tumour growth in a murine model of metastatic disease. *Br J Cancer.* 1999 Dec;81(8):1311-7.

Pisani P, Parkin DM, Ferlay J. Estimates of the worldwide mortality from eighteen major cancers in 1985. Implications for prevention and projections of future burden. *J Natl Cancer Inst.* 1986; Oct;59(4):1107-12.

Rakoff-Nahoum S, Medzhitov R. Regulation of spontaneous intestinal tumorigenesis through the adaptor protein MyD88. *Science.* 2007 Jul 6;317(5834):124-7.

Rakoff-Nahoum S, Medzhitov R. Toll-like receptors and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2009; Jan;9(1):57-63.

Razack AH. Bacillus Calmette-Guerin and bladder cancer. *Asian J Surg.* 2007; Oct;30(4):302-9.

Richart RM. The natural history of cervical intraepithelial neoplasia. *Clin Obstet Gynecol* 1967; 10: 748-784.

Robinson HL, Amara RR. T cell vaccines for microbial infections. *Nat Med.* 2005; Apr;11(4 Suppl):S25-32.

Roden RB, Ling M, Wu TC. Vaccination to prevent and treat cervical cancer. *Hum Pathol.* 2004; Aug;35(8):971-82.

Roncarolo MG, Bacchetta R, Bordignon C, Narula S, Levings MK. Type 1 T regulatory cells. *Immunol Rev.* 2001; 176:6624-6630.

Rubin IC. Pathological diagnosis of incipient carcinoma of uterus. *Am J Obstet Gynecol* 1910; 62: 668-676.

Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor laboratory press, 2001. 3 v.

Schauenstein W: Histologische untersuchungen uberatypisches plattenepithel na der innenflasheder cervix uteri. Arch Gynak 1908; 85 : 576-616.

Schnider P, Binder M, Kittler H, Birner P, Starkel D, Wolff K, Auff E. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of botulinum A toxin for severe axillary hyperhidrosis. Br J Dermatol. 1999; Apr;140(4):677-80.

Schomig G: Die weiblichen genitalkarzinom bei sexueller enthaltenheit. Strahlentherapie 1953; 92 : 156-158.

Sfondrini L, Rossini A, Besusso D, Merlo A, Tagliabue E, Mènard S, Balsari A. Antitumor activity of the TLR5 ligand flagellin in mouse models of cancer. The journal of immunology, 2006; 176:6624-6630.

Smith KD, Andersen-Nissen E, Hayashi F, Strobe K, Bergman MA, Barrett SL, Cookson BT, Aderem A. Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. Nat Immunol. 2003; Dec;4(12):1247-53.

Steller MA. Cervical cancer vaccines: progress and prospects. J Soc Gynecol Investig. 2002; Sep-Oct;9(5):254-64.

Stevens R. Ontology based document enrichment in bioinformatics. Comp Funct Genomics. 2002;3(1):42-6.

Syrjanen K, Nurmi T, Mantyjarvi R, Ilonen J, Syrjanen S, Surcel HM, Yliskoski M, Vayrynen M, Chang F, Saarikoski S. HLA types in women with cervical human papillomavirus (HPV) lesions prospectively followed up for 10 years. Cytopathology. 1996; Apr;7(2):99-107.

Thomson KS, Sanders CC. A simple and reliable method to screen isolates of Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae for the production of TEM- and SHV-derived extended-spectrum beta-lactamases. Clin Microbiol Infect. 1997;3(5):549-554.

Tindle RW. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. Nature Reviews Cancer. 2002; Jan; 2(2):121-127.

Tindle RW. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. Nat Rev Cancer. 2002; Jan;2(1):59-65.

Tsuji S, Matsumoto M, Takeuchi O, Akira S, Azuma I, Hayashi A, Toyoshima K, Seya T. Maturation of human dendritic cells by cell wall skeleton of Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin: involvement of toll-like receptors. Infect Immun. 2000; Dec;68(12):6883-90.

Van Kaer L. NKT cells: T lymphocytes with innate effector functions Curr Opin Immunol. 2007; Jun;19(3):354-64.

Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999; 189:12-19.

Wu YC, Deyrieux AF, Wilson VG. Papillomaviruses and the host sumoylation system. *Biochem Soc Trans.* 2007; Dec;35(Pt 6):1433-5.

Yang R, Murillo FM, Cui H, Blosser R, Uematsu S, Takeda K, Akira S, Viscidi RP, Roden RB. Papillomavirus-like particles stimulate murine bone marrow-derived dendritic cells to produce alpha interferon and Th1 immune responses via MyD88. *J Virol.* 2004 Oct;78(20):11152-60.

Yonekura K, Maki-Yonelura S, Mamba K. Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. *Nature.* 2003; 424, pp. 643-647.

Zur Hausen A, Brink AA, Craanen ME, Middeldorp JM, Meijer CJ, van den Brule AJ. Unique transcription pattern of Epstein-Barr virus (EBV) in EBV-carrying gastric adenocarcinomas: expression of the transforming BARTF1 gene. *Cancer Res.* 2000; May 15;60(10):2745-8.

Zur Hausen H. Cervical carcinoma and human papillomavirus: on the road to preventing a major human cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2001; Feb 21;93(4):252-3

Zur Hausen H. Immortalization of human cells and their malignant conversion by high risk human papillomavirus genotypes. *Semin Cancer Biol.* 1999; ec;9(6):405-11

Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer.* 2002; May;2(5):342-50.

Zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 2000; May 3;92(9):690-8.

Zur Hausen H. Papillomaviruses in human cancers. *Proc Assoc Am Physicians.* 1999; Nov-Dec;111(6):581-7.

Zur Hausen H. Perspectives of contemporary papillomavirus research. *Vaccine.* 2006; Aug 31;24 Suppl 3:S3/iii-iv.