**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

AGTHA DE ALENCAR MUNIZ CHAVES

**Clonagem, Expressão, Purificação e
Caracterização das Proteínas do Capsídio
Viral do Papilomavírus Humano (HPV)**

Versão original da Dissertação defendida

São Paulo
Data do Depósito na SPG:
02/10/2012

AGTHA DE ALENCAR MUNIZ CHAVES

**Clonagem, Expressão, Purificação e
Caracterização das Proteínas do Capsídio
Viral do Papilomavírus Humano (HPV)**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre em Ciências
(Bioquímica)*

Orientador: Prof. Dr. Paulo Lee Ho

São Paulo
2012

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Chaves, Agtha de Alencar Muniz
C512c Clonagem, expressão, purificação e caracterização, das proteínas
do capsídio viral do Papilomavírus humano (HPV) / Agtha de
Alencar Muniz Chaves. -- São Paulo, 2012.
137p.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador : Ho, Paulo Lee

I. Biologia molecular 2. Proteína : Bioquímica 3. Papilomavírus :
Microbiologia médica I. T. II. Ho, Paulo Lee, orientador.

574.88 CDD

Agtha de Alencar Muniz Chave

**Clonagem, Expressão, Purificação e Caracterização das Proteínas do Capsídio
Viral do Papilomavirus Humano (HPV)**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre em Ciências
(Bioquímica)

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Desenvolvimento de Vacinas profiláticas e terapêuticas contra papilomavirus humano”, **protocolo nº 649/09**, sob a responsabilidade de Paulo Lee Ho, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de **13/10/2009**.

Vigência do Projeto: 01/2010 – 12/2013	Nº de animais/espécie
Laboratório Biotecnologia Molecular I	60 camundongos Balb/c (Fêmea) 240 camundongos C57B1/6 (Fêmea)

São Paulo, 15 de outubro de 2009.

Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

De acordo:

Dr. Otávio Azevedo Mercadante
Diretor do Instituto Butantan

*Ao meu pai,
pelo amor, apoio e incentivo incondicionais.*

AGRADECIMENTO(S)

Ao meu orientador, Dr Paulo Lee Ho, pela oportunidade de desenvolver este trabalho em seu laboratório, pela paciência, pela confiança em mim depositada, pela orientação durante todo o mestrado e pela contribuição à minha formação científica, palavras jamais poderão expressar todo o meu agradecimento.

À Dr^a Silvia Boschi Bazan, pela imensurável ajuda na fase inicial do projeto, pela paciência, pelo carinho e amizade.

Ao Dr Eneas de Carvalho, pelo imenso auxílio nas muitas etapas deste trabalho, pela paciência, pela compreensão e por todas as palavras de incentivo, meus mais sinceros agradecimentos.

Ao Dr Richard Roden do Departamento de Patologia da Johns Hopkins University, por gentilmente ceder os genes da L2 do HPV-16 e do HPV 18, possibilitando o desenvolvimento de grande parte deste projeto.

À Dr^a Maria Leonor Sarno de Oliveira, pelo auxílio durante os experimentos realizados com animais e pela discussão de resultados e sugestões.

Às técnicas de laboratório Aline Marques e Nídia Pereira de Moraes por todo o suporte técnico, pela convivência e pela amizade.

A todos os pesquisadores do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan que por muitas vezes possibilitaram o uso de equipamentos em seus laboratórios.

Ao Instituto de Química e ao Programa de Pós Graduação em Bioquímica pela oportunidade de cursar o mestrado.

Aos funcionários da Secretaria de Pós Graduação em Bioquímica por serem sempre prestativos.

Aos docentes do Programa de Pós Graduação em Bioquímica pela contribuição à minha formação acadêmica.

À Juliana Branco Novo, pela inestimável amizade, pelo apoio, pelo carinho e compreensão em todos os momentos.

Aos queridos amigos Ana Tung e Inácio Junqueira, pela amizade, por todo o apoio, pelo incentivo e pelo carinho.

Às “amigas do rock”, Camila Huffenbaecher e Camila Garcia, por me acompanharem durante toda esta jornada e por proporcionar os momentos de descontração fora do laboratório.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia Molecular I pela agradável convivência diária: Adriana, Aline, Carol, Cíntia, Cynthia, Eliane, Henrique, Izilda, Jô, Juliana, Leonardo, Liliane, Lívia, Luciane e Renata.

Aos colegas dos demais laboratórios do Centro de Biotecnologia pela convivência diária.

À Fundação Butantan, à Fundação para Desenvolvimento Administrativo (FUNDAP), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro e pela bolsa concedida.

E por fim, mas não menos importante, à minha família, pela dedicação, pelo carinho, pela compreensão, pelo incentivo nas horas difíceis e por proporcionar a oportunidade para realização dos meus sonhos.

*“A maior glória não é ficar de pé,
mas levantar-se cada vez que se cai.”*

(Confúcio).

RESUMO

Chaves, AAM. **Clonagem, Expressão, Purificação e Caracterização das proteínas do capsídio viral do Papilomavirus Humano (HPV)**. 2012. 137p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O Câncer Cervical é um importante problema de saúde pública, causando aproximadamente 270 milhões de mortes anuais. Atualmente, esse câncer é o segundo mais comum em mulheres no mundo, com os maiores índices de incidência ocorrendo nos países em desenvolvimento. O Câncer cervical tem como agente etiológico o Papilomavírus Humano (HPV). O vírus possui DNA circular duplo com genes que codificam oito proteínas, E1, E2, E4, E5, E6, E7 (não estruturais), e L1 e L2 (estruturais) que formam o capsídio viral. A proteína L1 quando produzida em sistema heterólogo de expressão tem a capacidade de auto-arranjo em partículas semelhantes ao vírus chamadas de VLPs (“Vírus like Particles”), que são a base das vacinas profiláticas disponíveis, Gardasil® e Cervarix®. Neste trabalho, foram produzidas VLPs da proteína L1 do HPV-16 na levedura metilotrófica *Pichia pastoris* utilizando dois tipos de vetores de expressão para leveduras, um episomal e outro integrativo, para os trabalhos de purificação. Inicialmente as amostras obtidas ao final da purificação apresentaram degradação e agregação da proteína L1, além de contaminantes. O protocolo de purificação foi modificado e as amostras obtidas no final do processo de purificação não apresentaram degradação e nem agregação da proteína L1, embora ainda tenha sido detectada a presença de contaminantes e, portanto, as amostras obtidas estavam semi-purificadas. Uma segunda abordagem para o desenvolvimento de uma vacina alternativa foi realizada, na qual foram produzidos candidatos vacinais baseados na proteína L2 do Papilomavírus Humano (L2 do HPV-16, L2 do HPV-18 e L2 Multimérica), e também foram expressas proteínas fusionadas ao domínio ZZ de *Staphylococcus aureus*, utilizado neste caso como adjuvante. Em geral as proteínas de fusão, ainda que apresentando a fusão em sua forma funcional,

geraram uma fraca indução de anticorpos IgG e de anticorpos neutralizantes. Pode-se observar uma produção de anticorpos neutralizantes contra pseudovírus homólogos e heterólogos que dependeu da combinação com os adjuvantes utilizados. Numa tentativa de maximizar a eficiência imunológica dos antígenos utilizados, um novo ensaio de imunização foi realizado com uma formulação conjunta contendo três proteínas (L2 do HPV-16, L2 do HPV-18 e L2 Multimérica), sendo também avaliadas as propriedades de três adjuvantes. A combinação da formulação vacinal com os adjuvantes gerou altos níveis de anticorpos L2-específicos, destacando-se as formulações com o hidróxido de alumínio/MPLA e com a vacina celular *Pertussis low*. Com a utilização desses adjuvantes, os níveis de anticorpos permaneceram elevados a longo termo. Pode-se observar a imunogenicidade de cada um dos antígenos dependeu de sua formulação com os adjuvantes testados.

Palavras chave: Câncer Cervical, Vacina Profilática, Papilomavirus Humano, Proteína L1, VLP, Proteína L2

ABSTRACT

Chaves, AAM. **Cloning, Expression, Purification and Characterization of Human papillomavirus (HPV) capsid proteins.** 2012. 137p). Masters Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Cervical cancer is one of the most important problems of public health, causing nearly 270 million deaths annually. Currently, cervical cancer is the second more common type in women worldwide and the highest incidences occurring in developing countries. *Human papillomavirus* (HPV) are the etiologic agents of cervical cancer. HPV have a double-stranded circular DNA genome encoding eight viral proteins, E1, E2, E4, E5, E6, E7 (non-structural), and L1, L2 (structural), the last ones forming the viral capsid. L1 protein expressed in heterologous systems self-assembles into VLPs (“*Virus like Particles*”), the base of prophylactic vaccines available commercially, Gardasil and Cervarix. In this work, we produced VLPs of HPV-16 L1 protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* for purification assays. Initially, samples obtained from purification presented degradation and aggregation of L1 protein and also contaminants. The purification protocol was modified and samples obtained in the new process did not present degradation nor aggregation but the presence of some contaminants could still be detected. Therefore, samples obtained were semi-purified. A second approach to the development of an alternative vaccine was performed with the production of vaccine candidates based on the HPV L2 protein (HPV-16 L2, HPV-18 L2 and Multimeric L2) and we also expressed the same proteins fused to *Staphylococcus aureus* ZZ domain, using it as an adjuvant. In general, the fused proteins induced low antibodies titer and low neutralizing antibodies titer when compared to other formulations. Neutralizing antibodies elicited against homologous and heterologous pseudovirus depended on the adjuvant used. In another approach, trying to enhance immunologic antigen efficiencies, an immunization assay was performed with a formulation containing L2 HPV-

16, L2 HPV-18 and Multimeric L2 and the properties of three adjuvants were assessed. The vaccine formulations adjuvanted with alum/MPLA and cellular *Pertussis* low vaccine induced the highest levels of L2-specific antibodies. In addition, the usage of adjuvants maintained the antibody levels in the long term. The immunogenicity of each antigen depends on the adjuvant combination used.

Key-words: Cervical Cancer, Prophylactic Vaccine, *Human Papillomavirus*, L1 Protein, VLP, L2 Protein.

LISTA DE ABREVIATURAS

AP20 – filtros para pré-filtração com poros de 2,0 µm (Millipore)

BSA – albumina bovina sérica

DNA – ácido desoxirribunucleico

dNTPs – deoxinucleotídeos trifosfato

DTT - *Dithiothreitol*

EDTA – *Ethylenediamine tetraacetic acid* (ácido etileno-diamino-tetra-acético)

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (Ensaio Imunoenzimático)

Fc – porção constante de imunoglobulinas

His - histidina

his4 – gene que codifica a enzima histidinol desidrogenase

HPV – *Human Papillomavirus*

IgG – imunoglobulina G

IgG1 – imunoglobulina G subtipo 1

IgG2a – imunoglobulina G subtipo 2a

kDa – 10³ Daltons

LPS – lipopolissacarídeo

MPLA – monofosforil lipídeo A

pb – pares de bases

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (reação em cadeia da polimerase)

Pfu - DNA Polymerase de *Pyrococcus furiosus*.

PMSF – *Phenylmethanesulphonyl fluoride*

PBS – Phosphate buffered saline (tampão fosfato-salina)

PBS-T – tampão fosfato-salina com tween 20

SDS-PAGE – *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (eletroforese em gel de poliacrilamida)

SEAP – *Secreted Placental Alkaline Phosphatase* (fosfatase alcalina secretada)

TAE – tampão tris-acetato e EDTA

Tween 80 – polissorbato 80

TRIS-HCl - *Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride*

VLP – *Virus-like-particles*

wP_{low} – vacina celular *B. pertussis* low

ZZ – domínio ZZ da protein A de *Staphylococcus aureus*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Organização do genoma viral do HPV 16.....	22
Figura 2. Ciclo de vida do Papilomavírus Humano.....	27
Figura 3. Vetores de expressão eucarióticos.....	42
Figura 4. Vetor de clonagem pGEM-T easy.....	49
Figura 5. Vetor de expressão pAE.....	50
Figura 6. Vetor de expressão pCP.....	51
Figura 7. Representação esquemática do protocolo de diálise.....	59
Figura 8. Análise da purificação com vetor episomal.....	66
Figura 9. Análise da purificação com vetor integrativo.....	68
Figura 10. Western-blot de diferentes clones de <i>P. pastoris</i> submetidos à indução por 48h...	69
Figura 11. Gel de agarose 1% com produtos de PCR para clonagem no vetor pAE.....	70
Figura 12. Representação esquemática do cassete de expressão do vetor pAE-L2.....	70
Figura 13. Representação esquemática do cassete de expressão do vetor pCP-L2.....	71
Figura 14. Gel de agarose 1% da digestão do vetor pUC57/l2 multimérico com NdeI e NcoI e com SacI e NcoI.....	72
Figura 15. Representação esquemática do cassete de expressão do gene l2 multimérico clonado no vetor pAE e do gene l2 multimérico clonado no vetor pCP.....	72
Figura 16. Gel de poliácridamida 10 e 12% da análise de clones da bactéria BL21SI submetidas à indução com NaCl.....	73
Figura 17. Gel de poliácridamida 10 e 12% da análise do corpúsculo de inclusão.....	75
Figura 18. Gel de poliácridamida 10% com alíquotas das proteínas após purificação por cromatografia de afinidade.....	76
Figura 19. Representação esquemática da estratégia de imunização.....	78
Figura 20. Titulação de anticorpos IgG anti-L2 após a imunização subcutânea de camundongos BALB/c com as proteínas recombinantes.....	79
Figura 21. Indução de IgG anti-L2 após imunização de camundongos BALB/c por via subcutânea com as proteínas recombinantes.....	82
Figura 22. Reatividade cruzada dos soros de camundongos BALB/c imunizados por via subcutânea com as proteínas recombinantes.....	85
Figura 23. Análise funcional da fusão proteína-domínio ZZ.....	86
Figura 24. Representação esquemática da estratégia de imunização vacinal conjunta.....	90

Figura 25. Titulação de anticorpos IgG anti-L2 após imunização de camundongos BALB/c por via intraperitoneal com as proteínas L2 HPV 16, L2 HPV 18 e L2 Multimérica.....	91
Figura 26. Indução de IgG anti-L2 após imunização de camundongos BALB/c por via intraperitoneal.....	93
Figura 27. Indução de subtipos de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-L2 após imunização de camundongos BALB/c por via intraperitoneal.....	96
Figura 28. Comparação dos títulos de anticorpos IgG anti-L2 dos soros da 3ª sangria e sangria final após imunização de camundongos BALB/c por via intraperitoneal com a vacina conjunta.....	99
Figura 29. Western-blot da análise da reatividade do pool de soros de camundongos BALB/c imunizados por via intraperitoneal.....	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação dos Papilomavírus.....	23
Tabela 2. Massas moleculares e pontos isoeletricos das proteínas recombinantes.....	74
Tabela 3. Quantificação das proteínas recombinantes.....	77
Tabela 4. Valores de P_{value} obtidos através do teste Mann-Whitney para as comparações par-a-par dos títulos de IgG anti-L2 obtidos no ensaio de imunização utilizando coating com a proteína L2 HPV 16.....	83
Tabela 5. Valores de P_{value} obtidos através do teste Mann-Whitney para as comparações par-a-par dos títulos de IgG anti-L2 obtidos no ensaio de imunização utilizando coating com a proteína L2 HPV 18.....	83
Tabela 6. Valores de P_{value} obtidos através do teste Mann-Whitney para as comparações par-a-par dos títulos de IgG anti-L2 obtidos no ensaio de imunização utilizando coating com a proteína L2 Multimérica.....	83
Tabela 7. Títulos de soroneutralização contra pseudovírus, dos soros gerados pela imunização de camundongos BALB/c por via subcutânea.....	87
Tabela 8. Títulos de anticorpos IgG anti-L2 dos soros gerados pela imunização de camundongos BALB/c por via intraperitoneal com as proteínas L2 HPV 16, L2 HPV 18 e L2 Multimérica.....	92
Tabela 9. Valores de P_{value} obtidos pelo teste Mann-Whitney para comparação par-a-par dos títulos de IgG anti-L2 com <i>coating</i> de proteína L2 HPV 16.....	94
Tabela 10. Valores de P_{value} obtidos pelo teste Mann-Whitney para comparação par-a-par dos títulos de IgG anti-L2 com <i>coating</i> de proteína L2 HPV 18.....	94
Tabela 11. Valores de P_{value} obtidos pelo teste Mann-Whitney para comparação par-a-par dos títulos de IgG anti-L2 com <i>coating</i> de proteína L2 Multimérica.....	94
Tabela 12. Valores de P_{value} obtidos pelo teste Mann-Whitney para coparação par-a-par dos títulos dos subtipos IgG1 e IgG2a com <i>coating</i> de proteína L2 HPV 16.....	97
Tabela 13. Valores de P_{value} obtidos pelo teste Mann-Whitney para coparação par-a-par dos títulos dos subtipos IgG1 e IgG2a com <i>coating</i> de proteína L2 HPV 18.....	97
Tabela 14. Valores de P_{value} obtidos pelo teste Mann-Whitney para coparação par-a-par dos títulos dos subtipos IgG1 e IgG2a com <i>coating</i> de proteína L2 Multimérica.....	97

Sumário

1	Introdução	21
1.1	Câncer cervical	21
1.2	Os Papilomavírus	22
1.3	Proteínas do Papilomavírus Humano	24
1.4	A história natural do HPV	26
1.4.1	O processo de infecção	26
1.4.2	Ciclo de vida dos Papilomavírus	27
1.4.3	Estratégias de evasão viral	28
1.4.4	Progressão do câncer cervical	30
1.4.5	Resposta do sistema imune contra infecção pelo Papilomavírus	31
1.5	Vacinas	32
1.5.1	Vacinas terapêuticas	32
1.5.2	Vacinas profiláticas	33
1.5.3	Vacinas de segunda geração	35
1.6	A utilização de adjuvantes vacinais	36
2	Objetivos	38
3	Materiais e Métodos	39
3.1	Soluções	39
3.2	Meios de Cultura	40
3.3	Leveduras	41
3.4	Leveduras eletrocompetentes	41
3.5	Vetores de expressão em leveduras	42
3.6	Clonagem do gene L1 HPV-16	43
3.7	Transformação de leveduras eletrocompetentes	44
3.8	Expressão da proteína L1 em <i>Pichia pastoris</i>	45
3.9	Lise das Leveduras	45
3.10	Purificação da proteína L1	46
3.10.1	Preparação da coluna:	46
3.10.2	Cromatografia de Afinidade:	46
3.11	Análise da purificação	46
3.11.1	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)	47

3.11.2 Western-Blot.....	47
3.12 Ensaio de expressão comparativa da proteína L1 HPV 16	48
3.13 Bactérias	48
3.14 Bactérias quimiocompetentes	49
3.15 Vetores de clonagem e expressão em bactérias	49
3.16 Clonagem dos genes L2 HPV 16 e L2 HPV 18	52
3.17 Análise dos produtos da amplificação por PCR	54
3.18 Subclonagem dos genes <i>L2</i> HPV 16, <i>L2</i> HPV 18 em pGEM-T® easy.....	54
3.18.1 Reação de Adenilação.....	54
3.18.2 Reação de Ligação	54
3.19 Transformação de bactérias quimiocompetentes	54
3.20 Seleção de clones positivos pGEM-T/L2.....	55
3.21 Confirmação das clonagens através de seqüenciamento	55
3.22 Gene sintético L2 multimérico	56
3.23 Clonagem nos vetores de expressão.....	56
3.23.1 Clonagem dos genes L2 HPV 16, L2 HPV 18 e L2 multimérico no vetor de expressão pAE.....	56
3.23.2 Clonagem dos genes L2 HPV 16, L2 HPV 18 e L2 <i>multimérico</i> no vetor de expressão pCP	57
3.24 Expressão das proteínas em pequena escala.....	57
3.25 Expressão das proteínas recombinantes em maior escala	58
3.26 Lise das bactérias.....	58
3.27 Purificação das proteínas.....	59
3.27.1 Preparação da coluna.....	59
3.27.2 Cromatografia de Afinidade à Níquel	59
3.28 Diálise das proteínas.....	60
3.29 Quantificação das proteínas recombinantes purificadas	60
3.30 Remoção do Lipopolissacarídeo (LPS)	60
3.31 Ensaio de imunização com as proteínas recombinantes.....	61
3.32 Obtenção do soro	62
3.33 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).....	62
3.34 Ensaio funcional das proteínas em fusão com domínio ZZ.....	63
3.35 Produção de pseudovírus	63
3.36 Ensaio de neutralização de pseudovírus.....	64

4	Resultados	66
	Parte A – Produção e purificação de VLPs da proteína L1	66
4.1	Purificação da proteína L1 em resina Heparina-Sepharose	66
4.1.1	Purificação da proteína L1 HPV 16 utilizando clone de <i>Pichia pastoris</i> com vetor de expressão pPICHOLI	66
4.1.2	Purificação da proteína L1 HPV 16 utilizando clone de <i>Pichia pastoris</i> com vetor de expressão pINT-A	67
4.2	Quantificação da expressão da proteína L1 em levedura	69
	Parte B – Produção de candidatos vacinais baseados na proteína L2	70
4.3	Amplificação dos fragmentos dos genes L2 HPV 16 e L2 HPV 18 e clonagem em pAE	70
4.4	Amplificação dos fragmentos dos genes L2 HPV 16 e L2 HPV 18 e clonagem em pCP	71
4.5	Clonagem do gene L2 multimérico	72
4.6	Expressão das proteínas L2 recombinantes	73
4.7	Análise da expressão das proteínas L2 em maior escala	75
4.8	Purificação das proteínas L2 recombinantes	77
4.9	Indução de anticorpos anti-L2 induzidos pelas proteínas de fusão	78
4.10	Análise funcional do domínio ZZ	86
4.11	Soro-neutralização de pseudovírus com soros anti-L2	87
4.12	Indução de anticorpos anti-L2 produzida pela imunização conjunta com as proteínas L2 HPV 16, L2 HPV 18 e L2 Multimérica	90
4.13	Análise da reatividade dos soros obtidos na imunização com vacina conjunta, contra cada proteína recombinante	101
5	Discussão	103
	Parte A – Produção e purificação de VLPs da proteína L1	104
	Parte B – Produção de candidatos vacinais baseados na proteína L2	110
6	Conclusões	121
7	Referências Bibliográficas	123
8	Anexos	133

1 Introdução

1.1 Câncer cervical

O câncer cervical é um importante problema de saúde pública no mundo, sendo o segundo tipo de câncer mais comum entre a população feminina, atingindo aproximadamente 530 mil mulheres e responsável por cerca de 270 mil mortes a cada ano. A maioria dos casos de câncer cervical, aproximadamente 86%, ocorre em países em desenvolvimento onde representam 13% do total de câncer feminino (WHO, 2010).

No Brasil, a população em risco de desenvolvimento de câncer de colo de útero, acima dos 15 anos de idade, soma um total de 69 milhões de mulheres. Atualmente, o câncer de colo de útero representa o terceiro tipo de câncer feminino de maior incidência no país e, no ano de 2012, estima-se a ocorrência de aproximadamente 17540 novos casos desse tipo de câncer. Uma projeção de desenvolvimento de novos casos de câncer cervical estima que no ano de 2025 a ocorrência deste câncer chegue a 37464 novos casos (INCA, 2012).

O papel do papilomavírus humano como agente carcinogênico no câncer cervical foi estabelecido no começo dos anos 80, através do isolamento do HPV dos tipos 16 e 18 de biopsias de tumores cervicais, levando à associação entre infecção viral e câncer pelo Drº Harald zur Hausen (Durst et al., 1983; Boshart et al., 1984). O câncer de colo de útero foi o primeiro tipo de câncer reconhecido pela Organização Mundial da Saúde como totalmente atribuído a uma infecção viral (Bosch e de Sanjose, 2002). Análises de tumores cervicais mostraram a presença do vírus em 99,7% dos tumores (Walboomers et al., 1999). Atualmente, a infecção pelo papilomavírus humano é a doença sexualmente transmissível (DST) mais comum no mundo, infectando aproximadamente 75% dos indivíduos sexualmente ativos, serão infectados em algum período de sua vida (Koutsky et al., 1988; Baseman e Koutsky, 2005).

As mais altas taxas de prevalência da infecção pelo HPV foram observadas na África e América Latina (Bruni et al., 2010), onde a distribuição dessas infecções por idade tende a apresentar dois picos, um primeiro em mulheres com menos de 25 anos e um segundo pico em mulheres de 45 anos ou mais (Franceschi et al., 2006; de Sanjose et al., 2007). Os tipos de HPV mais comuns mundialmente e associados aos casos de câncer cervical são 16, 18, 58, 33, 45, 31, 52, 35, 59, 39, 51 e 56 (Li et al., 2011). O tipo 16 está presente em maior frequência nos casos de câncer cervical, seguido pelo tipo 18, sendo os dois responsáveis por 75% dos casos de câncer cervical no mundo, entre 41-67% das lesões cervicais de alto grau e 16-32% das lesões cervicais de baixo grau. O tipo 16 também está associado aos casos de câncer anal (90%), peniano (40%), vaginal e vulvar (40%). Já os tipos 6 e 11 são os mais frequentes nos casos de lesões benignas e cutâneas .

1.2 Os Papilomavírus

Os papilomavírus são vírus não envelopados pertencentes à família *Papillomaviridae* que apresentam alta diversidade, e são encontrados numa ampla variedade de animais ocorrendo na maioria dos mamíferos. Os vírus são classificados de acordo com a sequência de DNA da ORF do gene L1, sendo considerados diferentes tipos quando a sequência difere em 10%, subtipos quando há diferença entre 2-10% e variantes quando diferir entre 1-2%.

Até o momento são conhecidos mais de 120 tipos de Papilomavírus Humano (HPV), dos quais aproximadamente 40, infectam o trato anogenital humano. Os HPVs mais prevalentes estão agrupados no gênero *Alphapapillomavirus* (Bernard et al., 2010). Eles apresentam tropismo tecidual, alguns com predileção para superfícies cutâneas (cutaneotrópicos) e outros para superfícies de mucosas epiteliais (mucosotrópicos) (Castellsague, 2008).

A partícula viral possui tamanho de aproximadamente 55 nm com simetria icosaédrica ($T=7$) e possui DNA circular de dupla fita com cerca de 8 kb. Apesar de ser um vírus de pequeno tamanho, possui uma complexa biologia (Figura 1). O genoma dos papilomavírus possui oito genes que codificam proteínas de duas regiões, a de expressão precoce (E), e a de expressão tardia (L). Além destas, há uma região não codificante de controle de expressão que possui aproximadamente 1kb (de Villiers et al., 2004).

Figura 1. Organização do genoma viral do HPV 16. O genoma do HPV 16, de 7904 pb, é dividido em três regiões: região contendo os genes precoces (E), região contendo genes tardios (L) e região de controle de expressão (LCR). P97 e P670: promotores, PAE: sítio de poliadenilação da região precoce, PAL: sítio de poliadenilação da região tardia. Em destaque estão os sítios para ligação das proteínas E1, E2, SP-1 e a sequência TATA. Adaptado de Doorbar 2006.

Os papilomavírus humanos podem ser classificados epidemiologicamente de acordo com seu potencial de progressão ao câncer em: alto-risco, baixo-risco e de provável alto-risco (Tabela 1). Os HPVs de baixo-risco estão associados a lesões benignas, como verrugas cutâneas (palmares e planares), tumores verruciformes (*Epidermodisplasia verruciforme*),

verrugas anogenitais (*Condyloma acuminata*). Os HPVs de alto-risco estão associados com a transformação maligna e conseqüentes neoplasias em sítios anatômicos da região anogenital.

Tabela 1. Classificação dos Papilomavírus. Adaptado de Munoz et al., 2006.

Grupo	Tipos HPV
Alto-risco	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59
Provável alto-risco	26, 53, 66, 68, 73, 82
Baixo-risco	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, CP6108

1.3 Proteínas do Papilomavírus Humano

Na região precoce, estão as ORFs que codificam as proteínas não estruturais E1, E2, E4, E5, E6 e E7. A proteína E1, encontrada nos diferentes tipos de HPVs, pode ter número de aminoácidos variando de 593 a 681 e massa molecular entre 67-76 kDa (Wilson et al., 2002). Esta proteína é modular com um domínio para ligação ao DNA na origem de replicação e o outro com atividade helicase (Amin et al., 2000; Schuck e Stenlund, 2011). A proteína E2 é constituída por cerca de 360 aminoácidos e atua como fator de transcrição. Ela é formada por um domínio de ligação ao DNA, um domínio de ativação da transcrição e por uma região central flexível ligando os dois domínios. Na região da LCR há quatro sítios de ligação para E2 (Hegde e Androphy, 1998; Stubenrauch et al., 1998). A proteína E4 associa-se com os filamentos intermediários de queratina, gerando desorganização dessa rede de filamentos e facilitando a liberação das partículas (Doorbar et al., 1991; Roberts et al., 1994).

A proteína E5, a menor proteína dos papilomavírus, é constituída por 83 aminoácidos e está presente no retículo endoplasmático, envelope nuclear e complexo de Golgi (Leechanachai et al., 1992). A proteína tem ação sob múltiplas vias, atuando sob a VATPase (ATPase vacuolar), impedindo a acidificação do endossomo e a degradação de EGFR (Conrad et al., 1993), sob os receptores de EGF (fator de crescimento epidermal), ET_A (endotelina) (Venuti et al., 1998) e PGE2 (prostaglandina) (Oh et al., 2009).

Uma das proteínas oncogênicas do vírus é a proteína E6 constituída por 160 aminoácidos, cuja importância se deve ao fato de realizar alterações de grande impacto no ciclo celular das células infectadas pelo HPV, direcionando a proteína supressora de tumor p53 à degradação (Scheffner et al., 1993). A degradação da proteína p53 é realizada em associação com a proteína E6-AP (*E6 associated protein*), uma ubiquitina ligase recrutada pela proteína E6. Outra proteína oncogênica, a proteína E7, é constituída por 98 aminoácidos e interage com diversos fatores que controlam a capacidade de proliferação celular. Uma das interações mais bem caracterizada é a que ocorre com membros da família de proteínas do retinoblastoma (Rb). A interação E7-Rb encaminha a proteína supressora de tumor Rb à degradação, resultando na dissociação do complexo Rb-E2F e expressão de genes da fase S do ciclo celular (Munger et al., 1989). Além das interações bem caracterizadas com as proteínas p53 e Rb, as proteínas E6 e E7 ainda interagem com várias proteínas alvo de diferentes vias de sinalização celular, conduzindo à imortalização, transformação, e inibição da apoptose e da diferenciação (Yugawa e Kiyono, 2009).

Na região tardia, encontram-se as ORFs dos genes que codificam as proteínas estruturais do capsídio viral, L1 e L2. O capsídio é formado por 72 homopentâmeros (capsômeros) da proteína L1 e 12 cópias da proteína L2 presentes no centro de cada pentâmero, mantendo uma proporção de 30:1 entre as proteínas (Kirnbauer et al., 1993), embora até 72 moléculas da proteína L2 possam ser incorporadas à partícula viral (Buck et al., 2008). A proteína L1 é a principal proteína do capsídio viral, com massa molecular de aproximadamente 55 kDa representando 80% da estrutura do vírus (Muller et al., 1995). Apesar de ser uma proteína conservada entre os diferentes tipos de HPV, apresenta regiões hipervariáveis que contém sítios de ligação para anticorpos neutralizantes (Xu et al., 2006).

A proteína L2, a proteína minoritária do capsídio viral, tem massa molecular de aproximadamente 50 kDa, entretanto, possui mobilidade eletroforética anômala em gel de

SDS-PAGE, migrando como uma proteína de cerca de 70-80 kDa (Muller et al., 1995). A proteína está presente como uma molécula única no centro do homopentâmero de L1 (Buck et al., 2008), e sua presença no capsídio contribui para eficiente encapsidação do genoma viral, intensificação da infectividade viral, além da função adicional de interação com várias proteínas do hospedeiro durante o ciclo de vida do vírus (Roden et al., 2001; Holmgren et al., 2005).

1.4 A história natural do HPV

1.4.1 O processo de infecção

A infecção inicia-se com o vírus associando-se à membrana basal do epitélio cervical através de moléculas de heparan-sulfato (HSPG), após a perda da integridade física desse epitélio (Doorbar, 2006; Johnson et al., 2009). Com essa associação, ocorre uma mudança conformacional no capsídio viral que expõe a porção N-terminal da proteína L2 onde se encontra o sítio consenso (R-X-K/R-R), aminoácidos 9 a 12, para clivagem pela furina (Richards et al., 2006; Day e Schiller, 2009). Com a clivagem, ocorre a exposição de uma região da proteína L1 antes encoberta. Essa nova região exposta servirá para interagir com um segundo receptor na célula basal do epitélio cervical e conseqüente internalização do vírus. Uma vez presente na vesícula endossômica, a partícula viral é desmontada restando a proteína L1 e o complexo proteína L2-genoma viral. Neste estágio, a atividade catalítica da enzima γ -secretase promove o escape do complexo proteína L2-DNA viral da vesícula endossômica, seguindo-se então o encaminhamento do complexo para o núcleo com o auxílio da proteína dineína (Karanam et al., 2010; Schneider et al., 2011). No núcleo, o complexo proteína L2-DNA viral se estabelecerá próximo ao domínio nuclear 10 (ND10) (Day et al., 2004).

1.4.2 Ciclo de vida dos Papilomavírus

Ao infectar a célula basal, o vírus se beneficia do programa de diferenciação e, à medida que a célula sofre diferenciação, as proteínas que compõem o vírus são produzidas até a formação das partículas virais nas camadas mais externas (Doorbar, 2006). Na camada mais superficial, com a descamação das células os vírus formados intracelularmente são liberados com a descamação das células.

Na primeira fase da infecção, há manutenção do genoma viral sob a forma episomal por variados períodos de tempo nas células basais do epitélio cervical e em baixa quantidade no número de cópias, aproximadamente 50-100 por célula. Nesta fase, há também a expressão das proteínas da região precoce: E1, E2, E4, E5, E6 e E7 (McMurray et al., 2001; Frazer, 2004). Nas camadas suprabasais, ocorre a amplificação do genoma viral e na camada superficial, há expressão das proteínas estruturais L1 e L2 e montagem das partículas virais (Figura 2). Inicialmente, precedendo a expressão da L1, ocorre a expressão e translocação da proteína L2 para o núcleo. No citoplasma, as proteínas L1 se agregam formando pentâmeros que são translocados para o núcleo. Em seguida, a proteína L2 então associa-se à L1 através da interação com a região carboxi terminal da L1, posicionando-se no centro dos pentâmeros (Florin et al., 2002; Finnen et al., 2003).

A persistência da infecção pelo vírus é um importante fator da transformação maligna das células infectadas, permitindo a existência de instabilidades genômicas que resultam na integração do genoma viral no genoma da célula hospedeira (Ho et al., 1995; Walboomers et al., 1999; Pett et al., 2004). Embora a integração ocorra em regiões de instabilidade genômica, não existem *hotspots* identificados para a integração (Ziegert et al., 2003). Quando ocorre a integração, em geral, o gene E2 é interrompido, conduzindo à perda da repressão mediada pela proteína E2 e à conseqüente, alta expressão das proteínas oncogênicas E6 e E7.

Figura 2. Ciclo de vida do Papilomavírus humano. Através da perda da integridade física do epitélio cervical, as partículas virais infectam as células da camada basal. O DNA viral permanece na célula infectada sob a forma de epissomo e as proteínas da região precoce (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) são expressas na camada suprabasal. A expressão das proteínas L1, L2 e a montagem da partícula viral ocorrem na camada superficial. As partículas virais produzidas são liberadas com a descamação das células do epitélio e estas poderão iniciar uma nova infecção. Durante uma infecção persistente com HPV de alto risco, ocorre a integração do genoma viral no genoma do hospedeiro e, com isso, o gene E2 é interrompido. Após a integração há alto nível de expressão das proteínas E6 e E7. Células com coloração azul: células normais; células com coloração roxa: células com genoma viral na forma de epissômero; células com coloração vermelhas: células com genoma viral integrado. Adaptado de Woodman et al., 2007.

1.4.3 Estratégias de evasão viral

Entre os mecanismos utilizados pelo HPV para evitar a vigilância imune incluem-se, infecção de células epiteliais em diferenciação, a ausência de lise celular, a inibição de citocinas e quimiocinas, assim como a modulação do interferon, da apresentação de antígenos e da expressão de importantes moléculas envolvidas com a ativação do sistema imune.

A estratégia de evasão inicialmente utilizada pelo papilomavírus acontece durante seu ciclo de vida através da ausência de viremia, pois como a infecção é sítio específica, ela permanece restrita às células epiteliais. Eventos comuns em infecções virais como lise celular e efeito citopático não ocorrem durante a infecção pelo HPV (Stanley, 2012). Além disso, o ciclo tende a minimizar os níveis de expressão das proteínas do capsídeo viral (que ocorrem somente na camada mais externa do epitélio cervical), e a liberar as partículas virais longe do sítio de atuação do sistema imune, evitando dessa forma, contato com células apresentadoras de antígenos (APCs) (Tindle, 2002; Einstein et al., 2009).

Na ausência de lise celular e morte citopática, outro processo evitado durante infecção pelo vírus é a liberação de citocinas e quimiocinas, importantes moléculas de sinalização envolvidas na ativação, recrutamento de células do sistema imune e resolução da infecção. Na ausência de liberação dessas moléculas, não há migração e ativação das células apresentadoras de antígeno (não residentes no epitélio cervical) ao sítio de infecção (Kanodia et al., 2007). O vírus é capaz de reduzir a expressão dos interferons do tipo I ($INF\alpha$ e $INF\beta$) que possuem propriedades antiproliferativas, antiangiogênicas e imunoestimulatória, e de acentuar a expressão de citocinas anti-inflamatórias, como de IL-10 (Mota et al., 1999; Stanley, 2012).

Ao ser capturado pelas células dendríticas, o vírus ativa estas células e desencadeia uma resposta imune. Entretanto, há indícios de que as partículas virais do HPV não ativam células de Langerhans, levando à inibição da maturação e da migração destas células, e da formação de uma resposta imune contra o vírus (Fausch et al., 2002). O mecanismo viral para evadir a resposta imune celular envolve a desregulação da proteína TAP (*Transporter associated with Antigen Processing*) e conseqüente redução na apresentação de molécula do complexo de histocompatibilidade principal de classe I (MHC I) às células T (Evans et al., 2001). A proteína TAP facilita a entrada de peptídeos virais no retículo endoplasmático,

tornando esses peptídeos acessíveis para serem ligados às moléculas de MHC I (Einstein et al., 2009).

1.4.4 Progressão do câncer cervical

Na maioria das infecções com o vírus HPV, cerca de 80-90%, ocorre remissão espontânea, em períodos que variam de 4 a 18 meses, e cerca de 10% das infecções encaminham-se para progressão das lesões intraepiteliais (Trottier e Franco, 2006).

A infecção com tipos de HPV de alto risco oncogênico é o principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer (Bosch e de Sanjose, 2007). Como consequência da integração do genoma viral no genoma da célula hospedeira, há aumento dos níveis de expressão das proteínas oncogênicas E6 e E7, cuja ação conjunta desencadeia diversos eventos que culminam na desregulação de vias de transdução de sinal, inibição da apoptose, imortalização e proliferação celular, conduzindo à modificações no epitélio cervical e à progressão do câncer invasivo. Alguns co-fatores endógenos (traumas cervicais, hormônios, sistema imune comprometido e predisposição genética) e exógenos (número de parceiros sexuais, uso de anticoncepcionais, agentes mutagênicos, tabagismo, co-infecções com outros microorganismos ou com outros tipos de HPV) também são fatores de risco que contribuem para a progressão maligna e carcinogênese (zur Hausen, 2002; Castellsague e Munoz, 2003).

O câncer invasivo é precedido por lesões denominadas neoplasia intraepitelial cervical (CIN). Na neoplasia intraepitelial cervical 1 (CIN1), que corresponde à LSIL (lesão intraepitelial escamosa de baixo grau), o genoma viral encontra-se sob a forma epissomal, há baixo risco de progressão maligna e regressão na ausência de tratamento, não representando, portanto, uma lesão pré-cancerosa (WHO, 2010). Nas lesões CIN2 e CIN3, que correspondem à HSIL (lesão intraepitelial escamosa de alto grau) e são consideradas as precursoras do câncer cervical, há alterações na diferenciação celular, o epitélio é quase todo ocupado por células transformadas e o genoma viral pode apresentar-se sob forma integrada no genoma da

célula (McCredie et al., 2008). Estima-se que cerca de 20% das lesões do tipo CIN1 tornam-se lesões do tipo CIN2. Destas, cerca de 30% progridem para a lesão pré-cancerosa do tipo CIN3, e cerca de 40% das lesões CIN3 progridem para câncer cervical (Peto et al., 2004).

1.4.5 Resposta do sistema imune contra infecção pelo Papilomavírus

Na maioria dos casos, o sistema imune é capaz de estabelecer uma resposta efetiva contra a infecção pelo HPV, caracterizada por uma forte resposta celular local, na qual as lesões regredem e anticorpos neutralizantes são produzidos (Einstein et al., 2009; Stanley, 2012). A ativação de células do sistema imune inato permite a proliferação e diferenciação de células do sistema imune adaptativo. Assim, ao ser detectada a presença do HPV, as células de Langerhans são ativadas e migram, e os antígenos são processados e apresentados para células T não maduras para a formação de uma resposta efetora cujo alvo são as células infectadas pelo vírus (Stanley, 2012).

A caracterização da resposta celular realizada através de estudos imunohistológicos de lesões em regressão revelou que a resposta celular consiste numa intensa infiltração de células T $CD4^+$, $CD8^+$, macrófagos, além da presença de citocinas Th1 como IL-12, TNF α e IFN γ . (Stanley, 2012). A elevada incidência e progressão da infecção pelo HPV observada em pacientes imunossuprimidos tornam evidente o papel crucial da resposta imune celular baseada em células T $CD4^+$ na elucidação da infecção. Nos pacientes que apresentam lesões intraepiteliais de alto grau e naqueles que apresentam carcinoma cervical, há reduzida detecção de resposta mediada por células T específicas para as proteínas oncogênicas (Einstein et al., 2009).

Além da resposta celular, anticorpos neutralizantes podem também ser gerados. Estes são direcionados contra epitopos conformacionais da proteína L1, expostos no capsídio viral. A produção destes anticorpos é lenta para os tipos de HPV de alto risco, levando de seis meses a um ano, e ocorre inicialmente após infecção para os tipos de HPV de baixo risco,

embora em níveis muito baixos. Ainda assim, esses anticorpos são capazes de proteger contra re-infecção (Stanley, 2012).

1.5 Vacinas

As vacinas contra o HPV podem ser categorizadas em dois grupos: vacinas profiláticas e vacinas terapêuticas. As vacinas profiláticas protegem contra a infecção viral, utilizando como estratégia a indução de anticorpos neutralizantes contra as proteínas do capsídio viral. As vacinas terapêuticas têm como alvo infecções já estabelecidas, visando reduzir as lesões tumorais provocadas pelo vírus e impedir a progressão tumoral das células do epitélio cervical (Lowy e Frazer, 2003; Mahdavi e Monk, 2005).

1.5.1 Vacinas terapêuticas

Diversas estratégias têm sido desenvolvidas na tentativa de desenvolver uma vacina terapêutica contra o HPV, visando o a regressão e controle de lesões causadas pelo vírus. A vacina terapêutica tem como alvo, principalmente, as proteínas não estruturais E6 e E7. A expressão destas proteínas torna-se constitutiva nas células tumorais, sendo potenciais alvos da resposta imune adaptativa. Algumas das estratégias avaliadas envolvem vacinas baseadas em: vetores vivos, peptídeos, proteínas recombinantes e ácidos nucléicos.

Vários vetores bacterianos têm sido explorados em vacinas terapêuticas contra o HPV, entre eles, *Listeria monocytogenes* (Maciag et al., 2009). Em teste clínico de fase I, mostrou-se segura e bem tolerada em pacientes que falharam ao tratamento com quimioterapia. Vetores virais também são amplamente utilizados como estratégia terapêutica como, por exemplo, vírus recombinantes expressando as proteínas E6 e E7 do HPV dos tipos 16 e 18, chamada de TA-HPV, promovendo uma potente indução de resposta citotóxica e anticorpos contra as proteínas em testes clínicos de fase II/III (Kaufmann et al., 2002).

Outro tipo de abordagem explorado em vacinas terapêuticas contra o HPV são as vacinas baseadas em peptídeos e proteínas. Há várias vacinas baseadas em peptídeos sendo submetidas a testes clínicos, como é o caso da vacina contendo peptídeos longos de E6 e E7, cuja administração com o adjuvante Montanide ISA-51 promoveu significativa indução de resposta imune $CD4^+$ e $CD8^+$ específica contra a proteína E6 (Welters et al., 2008). Para intensificar o processamento endógeno e a apresentação dos antígenos através do MHC I das vacinas baseadas em proteínas, também podem ser utilizadas estratégias de uso de adjuvantes iscomatrix (Stewart et al., 2004), LPD – “liposome-polycation-DNA (Cui e Huang, 2005), assim como a fusão de E6 e/ou E7 a outras moléculas, como hsp (*Heat shock protein*) (Einstein et al., 2007; Liu et al., 2008).

As estratégias baseadas na tecnologia do DNA recombinante permitem a produção de vacinas visando múltiplos epitopos de simples produção em larga escala, alta estabilidade e pureza. Geralmente os epitopos do HPV utilizados são fusionados a outros epitopos para intensificar a produção da resposta imune (Massa et al., 2008; Ohlschlager et al., 2009; Trimble et al., 2009). Há a possibilidade de utilização de uma nova e interessante estratégia baseada em replicons de RNA em imunoterapia contra o HPV (Herd et al., 2004), embora esta estratégia apresente desvantagens em relação à baixa estabilidade e dificuldade de produção.

1.5.2 Vacinas profiláticas

As vacinas profiláticas utilizam as proteínas do capsídeo viral como antígeno alvo induzindo a produção de anticorpos neutralizantes e prevenindo a entrada do vírus na célula (Kwak et al., 2011). As vacinas comercialmente disponíveis baseiam-se na proteína L1 que possui capacidade de autoarranjar-se em partículas semelhantes ao vírus, as VLPs (*Virus-like Particles*), quando produzidas em sistemas heterólogos de expressão. De forma semelhante aos vírus, induzem a produção de anticorpos neutralizantes (Kirnbauer et al., 1992; Liu et al., 1998; Chen et al., 2000). As VLPs são consideradas bons candidatos vacinais pois são

capazes de se replicar já que não possuem genoma viral, garantindo que não sejam infecciosas (Grgacic e Anderson, 2006).

Existem duas vacinas profiláticas disponíveis, a Gardasil[®] (Merck Sharp&Dohme, Whitehouse Station, NJ, EUA) e a Cervarix[®] (Glaxo Smith&Kline Biologicals, Rixensart, Bélgica), aprovadas pelo FDA (*Food and Drug Administration*) em junho de 2006 e outubro de 2009, respectivamente (WHO, 2010). Atualmente estão licenciadas em mais de 100 países (Sheinfeld Gorin et al., 2011).

A Gardasil[®] é a vacina quadrivalente composta por VLPs de quatro tipos de HPV, sendo dois de alto risco oncogênico (HPV 16 e HPV 18) e dois de baixo risco (HPV 6 e HPV 11), produzidas em sistema de expressão em leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*). Esta vacina é indicada para imunização de mulheres da faixa etária entre 9 a 26 anos. É administrada junto com o adjuvante sulfato hidroxifostato de alumínio amorfo em três doses, por via intramuscular (Villa et al., 2005). Em estudos clínicos, a vacina mostrou-se altamente eficaz contra o câncer na região anogenital, apresentando 100% de eficácia contra as lesões precancerosas e neoplasias vaginais/vulvares, 95% de eficácia contra as neoplasias intraepiteliais cervicais, e 99% de eficácia contra as lesões genitais relacionadas aos HPVs 6, 11, 16 e 18. A duração da proteção desta vacina é de ao menos 5 anos (Villa et al., 2006).

A segunda vacina profilática disponível contra o HPV, a Cervarix[®], contém VLPs da proteína L1 de dois tipos de HPV de alto risco (HPV 16 e HPV 18) que são produzidas através do sistema de expressão de baculovírus em células de inseto (*Spodoptera frugiperda*-9). O uso da vacina é recomendado para a imunização de mulheres da faixa etária entre 10-25 anos, e a administração utiliza o adjuvante AS04 (hidróxido de alumínio/3-O-desacil-4-monofosforil lipídio A) em três doses por via intramuscular. Estudos clínicos demonstraram que a vacina possui eficácia de 96-100% contra infecções relacionadas aos HPVs 16 e 18, e de 100% contra neoplasias intraepiteliais cervicais associadas com os tipos de HPV presentes

na vacina (Harper et al., 2004). Além disso, esta vacina induz proteção cruzada contra tipos de HPV não presentes na vacina (HPV 31, HPV 33 e HPV 45), aumentando sua eficácia (Wheeler et al., 2012). Após 9,4 anos, anticorpos contra os HPVs 16 e 18 ainda continuam presentes, comprovando a duração da eficácia da vacina (Harper e Vierthaler, 2011).

Recentemente, um estudo comprovou a eficácia da imunização com a vacina quadrivalente de homens na faixa etária entre 16-26 anos (Giuliano et al., 2011) com redução da incidência de lesões genitais relacionadas aos tipos de HPV 6, 11, 16, 18 em 90% e eficácia contra *Condyloma acuminata* de 89%. Dessa forma, podem ser reduzidos os casos de câncer associados ao HPV neste grupo, assim como a redução da transmissão para mulheres.

No Brasil as vacinas Gardasil® e Cervarix® foram registradas na ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) em 2006 e 2008 respectivamente (INCA, 2012). Cada dose tem custo elevado, de aproximadamente R\$ 300,00, o que torna sua incorporação no Programa Nacional de Imunização do Sistema Único de Saúde uma prática difícil de ser implantado, ainda que o Senado tenha aprovado o seu uso na saúde pública para meninas entre 9 e 13 anos (Agência Senado, 2012).

1.5.3 Vacinas de segunda geração

A necessidade de desenvolver vacinas profiláticas de segunda geração contra o HPV tem como desafio a produção de vacinas de baixo custo, com ampla cobertura de proteção, utilizando vias alternativas de administração e que seja de eficácia efetiva em dose única.

Uma vacina visando ampla cobertura contra o HPV atualmente encontra-se em fase III (<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00543543>) com estimativa de finalização para o ano de 2013. A vacina nonavalente V503 (Merck Sharp&Dohme, Whitehouse Station, NJ, EUA) é composta por VLPs da proteína L1 dos tipos de HPV de alto risco 16, 18, 31, 33, 45, 52, 58 e de baixo risco 6 e 11 produzidas em *Saccharomyces cerevisiae*, complementando a proteção conferida pela Gardasil®. O grupo de Schlegel e colaboradores desenvolveram uma vacina

com propriedades profiláticas e terapêuticas, baseadas em VLPs quiméricas contendo o epitopo da proteína E7 (Peres, 2011). A vacina possui menor custo de produção pois é realizada no sistema de expressão em bactérias. Atualmente, a vacina encontra-se em fase de produção pela empresa Biosidus e em breve serão iniciados testes clínicos de fase I.

Outra opção no desenvolvimento de vacina profilática de segunda geração é a utilização da proteína minoritária do capsídeo viral, a L2. A proteína possui epitopos subdominantes e com neutralização cruzada (Roden et al., 2000; Pastrana et al., 2005), e sua utilização geraria uma proteção de ampla cobertura contra diferentes tipos de HPV. Uma vacina baseada na proteína L2 foi desenvolvida por Jagu e colaboradores (patente US20090047301), sendo composta por um polipeptídeo derivado de diferentes tipos de HPV, tipos 1, 5, 6, 16, 18 (Jagu et al., 2009). Esta vacina está sendo produzida pela empresa Shanta Biotechnics (subsidiária da Sanofi Pasteur) com início do teste clínico de fase I previsto para o ano de 2013. Embora a proteína L2 multivalente tenha apresentado uma robusta resposta humoral contra diversos tipos de HPV em modelos pré-clínicos, sua imunogenicidade não é comparável à obtida pelas VLPs, necessitando a utilização de adjuvante adequado para subverter essa restrição (Ma et al., 2010).

1.6 A utilização de adjuvantes vacinais

Em muitos casos, composições vacinais não são suficientemente imunogênicas, requerendo a utilização de adjuvantes para elevar a sua imunogenicidade. Os adjuvantes são agentes adicionados à composição de uma vacina que promovem aumento da imunogenicidade e potencialização da resposta imune contra o antígeno vacinal (Reed et al., 2009). Eles podem ser categorizados em sistemas de entrega cujo mecanismo de ação é apresentar os antígenos às células do sistema imune, ou imunoestimuladores que agem diretamente sobre células do sistema imune, ativando-as (O'Hagan e De Gregorio, 2009).

A primeira geração de adjuvantes tem como membros os sais de alumínio, genericamente chamados de Alum, e emulsões (água em óleo). Estes dois adjuvantes permitem a adsorção do antígeno e promovem a persistência prolongada do mesmo no sítio de injeção. A segunda geração de adjuvantes foi iniciada pela adição de outros componentes aos adjuvantes de primeira geração, visando intensificar o potencial de ação (O'Hagan e De Gregorio, 2009). Atualmente, o desenvolvimento de adjuvantes de segunda geração tem avançado com os “Sistemas de adjuvantes” que geralmente envolvem combinações de alumínio, emulsões, ou lipossomos adicionados a imunoestimuladores (Garcon et al., 2007).

Apesar do grande avanço no desenvolvimento de adjuvantes de segunda geração, até o presente momento, poucos estão licenciados para o uso em vacinas profiláticas humanas, e testes clínicos em diferentes fases estão sendo conduzidos com possíveis candidatos (Mbow et al., 2010). Para o caso específico de vacinas contra o HPV, já estão patenteados alguns sistemas de adjuvantes, entre os quais se incluem agonistas específicos como, por exemplo, ligantes de receptores Toll-like (TLR) e carreadores de vacinas baseados em lipídeos, como emulsões e lipossomos (Cho et al., 2011). O maior desafio no desenvolvimento de adjuvantes é achar a combinação perfeita, com a formulação ótima e segura onde os diferentes componentes atuem em sinergia para produzir uma resposta imune apropriada a um custo acessível (Guy, 2007).

2 Objetivos

O trabalho tem por objetivo o desenvolvimento de uma vacina profilática brasileira de baixo custo contra o Papilomavírus Humano. Para atingir esta meta, a proposta inicial foi realizada em duas partes:

Parte A:

- Produção de VLPs do Papilomavírus Humano 16, utilizando o sistema de expressão em leveduras metilotróficas da espécie *Pichia pastoris* e sua purificação;

Parte B:

- Clonagem, expressão e purificação de candidatos vacinais baseados na proteína L2 do Papilomavírus humano;
- Avaliação da capacidade imunogênica dos candidatos vacinais produzidos;
- Avaliação do potencial imunogênico de formulação vacinal conjunta;
- Avaliação dos adjuvantes administrados com a formulação vacinal conjunta.

3 Materiais e Métodos

3.1 Soluções

- Solução tampão para amostra de DNA 10X: azul de bromofenol 0,2% (m/V), xileno cianol 0,42% (m/V), glicerol 50% (V/V).
- Solução Tris-EDTA (TAE) 10x: Tris base 400 mmol.L⁻¹, ácido acético 190 mmol.L⁻¹, EDTA 10 mmol.L⁻¹, pH 7,6.
- Solução tampão de amostra para SDS-PAGE 10X: Tris-HCl 1 mol.L⁻¹ pH 6,8, SDS 10% (m/V), azul de bromofenol 0,5% (m/V), glicerol 50% (V/V), β-mercaptoetanol 1 mol.L⁻¹.
- Solução tampão Tris-Glicina 5X: Tris base 1,5% (m/V), glicina 9,4% (m/V), SDS 0,5% (m/V).
- Solução Acrilamida-bisacrilamida 30%: acrilamida 29% (m/V), bisacrilamida 1% (m/V).
- Solução tampão de transferência para Western-Blot: solução tampão Tris-Glicina 1X, SDS 1% (m/V), etanol 20% (V/V).
- Solução de Coomassie Brilliant Blue[®]: Coomassie Brilliant Blue[®] 0,25 % (m/V), etanol 45% (V/V), ácido acético 10% (V/V).
- Solução vermelho de Ponceau S[®]: Ponceau S 0,1% (m/V), ácido acético 5% (V/V).
- Solução descorante: etanol 30% (V/V), ácido acético 10% (V/V).
- Solução tampão fostato-salino (PBS) 10X: NaCl 1,37 mol.L⁻¹, KCl 27 mmol.L⁻¹, Na₂HPO₄ 100 mmol.L⁻¹, KH₂PO₄ 14 mmol.L⁻¹, com pH ajustado para 7,4.
- Solução PBS-T: solução tampão PBS 1X, Tween 20 0,05% (V/V).
- Solução tampão carbonato-bicarbonato: Na₂CO₃ 50 mmol.L⁻¹, NaHCO₃ 50 mmol.L⁻¹, pH 9,6.

- Solução tampão citrato-fosfato: citrato de sódio 100 mmol.L⁻¹, NaH₂PO₄ 200 mmol.L⁻¹, pH 5,0.
- Solução tampão de lise I: solução tampão PBS 1X, EDTA 1 mmol.L⁻¹, glicerol 5% (V/V).
- Solução tampão de equilíbrio I: solução tampão PBS 1X, NaCl 0,3 mol.L⁻¹.
- Solução tampão de lavagem I: solução tampão PBS 1X, NaCl 0,4 mol.L⁻¹.

Solução tampão de eluição I (gradiente salino): solução tampão PBS 1X, NaCl 0,4 a 1,0 mol.L⁻¹.

- Solução tampão de lise II: Tris-HCl 50 mmol.L⁻¹ pH 7,5, 500 mmol.L⁻¹ NaCl.
- Solução tampão de solubilização II: Tris-HCl 50 mmol.L⁻¹ pH 7,5, 500 mmol.L⁻¹ NaCl, 5 mmol.L⁻¹ β-mercaptoetanol, 8 mol.L⁻¹ uréia.
- Solução tampão de equilíbrio II: Tris-HCl 50 mmol.L⁻¹ pH 7,5, 500 mmol.L⁻¹ NaCl, 5 mmol.L⁻¹ β-mercaptoetanol, 8 mol.L⁻¹ uréia.
- Solução tampão de eluição II: Tris-HCl 50 mmol.L⁻¹ pH 7,5, 500 mmol.L⁻¹ NaCl, 5 mmol.L⁻¹ β-mercaptoetanol, 8 mol.L⁻¹ uréia.
- Solução RFI: KCl 100mmolL⁻¹, 50 mmolL⁻¹, CH₃COOK 30 mmolL⁻¹, CaCl₂ 10 mmolL⁻¹, 15% glycerol, pH 5,8
- Solução RFII: KCl 10 mmolL⁻¹, CaCl₂ 75 mmolL⁻¹, MOPS 10 mmolL⁻¹, 15% glycerol, pH 6,8

3.2 Meios de Cultura

Meio Yeast Extract Peptone (YP): extrato de levedura 1% (m/V), triptona 1% (m/V).

Meio Yeast Extract Peptone Dextrose (YPD): extrato de levedura 1% (m/V), triptona 1% (m/V), glicose 2%(m/V).

Meio YPD_{zeo}: meio YPD , zeocina 100 µg.mL⁻¹.

Meio Yeast Nitrogen Base (YNB) 10X: meio YNB sem aminoácidos 3,4% (m/V), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10% (m/V).

Meio Buffered Complex Methanol (BMMY): extrato de levedura 1% (m/V), triptona 1% (m/V), meio YNB 1X, biotina 0,00004% (m/V), histidina 0,004% (m/V), tampão fosfato de potássio 100 mmol.L^{-1} pH 6,0.

Meio BMMY_{zeo}: meio BMMY, zeocina $100 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Meio Luria-Bertani (LB): extrato de levedura 1%, triptona 2%, NaCl 1%.

Meio LB_{amp}: meio LB, ampicilina $100 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Meio LBON: extrato de levedura 1% (m/V), triptona 2% (m/V).

Meio LBON_{amp}: meio LBON, ampicilina $100 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Meio LB_{amp}-ágar: meio LB_{amp}, ágar 1,5%.

Meio LBON_{amp}-ágar: meio LBON_{amp}, ágar 1,5%.

3.3 Leveduras

Foram utilizadas leveduras metilotróficas do gênero *Pichia*, espécie *Pichia pastoris*, linhagens GS115 (*his4*) e KM71 (*his4 arg4 aox1Δ::ARG4*). As duas linhagens apresentam mutação para o gene *his4* que codifica a enzima histidinol desidrogenase responsável por catalisar a reação final da biossíntese de histidina.

3.4 Leveduras eletrocompetentes

As preparação de leveduras eletrocompetentes foi realizada segundo protocolo do manual do vetor pPICHOLI (Mobitec[®]). Inicialmente, uma colônia da levedura foi inoculada em 10 mL de meio líquido YPD e mantida sob agitação a 250 rpm a 30 °C por 16 h. Após esse período, essa cultura foi adicionada em 500 mL de meio YPD e mantida sob as mesmas condições anteriormente descritas. Ao atingir densidade óptica entre 1,3-1,5 em $\lambda = 600 \text{ nm}$, a cultura foi centrifugada a 2000 g, 4 °C por 10 min. O precipitado contendo as células foi

ressuspendido em 100 mL de meio YPD contendo 20% de HEPES 1 molL^{-1} e 2,5% de DTT 1 molL^{-1} e incubado a 30°C por 15 min sem agitação. Após incubação, foi adicionada água a 4°C até que atingisse volume final de 500 mL e as células ressuspendidas foram novamente centrifugadas (2000 g, 4°C , 10 min). O precipitado formado foi novamente ressuspendido em água a 4°C e centrifugado (2000 g, 4°C , 10 min). Após isso, o precipitado foi ressuspendido em 20 mL de sorbitol 1 molL^{-1} e mais uma vez centrifugado, e por fim, as células foram ressuspendidas em 500 μL de sorbitol 1 molL^{-1} , aliquotadas (50 μL) e mantidas a -80°C até o uso.

3.5 Vetores de expressão em leveduras

Foram utilizados para expressão em levedura os plasmídios pPICHOLI[®] (Mobitec[®]) e pINT-A. O pPICHOLI (3579 pb) (figura 3A) é um vetor de expressão episomal que contém o forte promotor da álcool oxidase (AOX). Este promotor é reprimido na presença de glicose e induzido na presença de metanol. Além disso, possui o promotor do fago T7(pT7), sítio múltiplo de clonagem (multiple cloning site, MCS), sequência de replicação autônoma em *Pichia pastoris* (PARS-1). O gene de resistência ao antibiótico zeocina é precedido pelo promotor TEF-1 (*S. cerevisiae*) e EM-7 (*E. coli*) e seguido pelo terminador CYC-1.

O vetor pINT-A (5899pb) (figura 3 B) é um vetor de expressão integrativo que foi desenvolvido em nosso laboratório. Ele também possui o promotor forte da álcool oxidase (AOX), sítio múltiplo de clonagem (multiple cloning site, MCS), resistência ao antibiótico zeocina e fragmento da sequência de DNA ribossômico de *Hansenula polymorpha* que permite integração de múltiplas cópias do vetor no genoma da levedura (Klabunde et al., 2003).

Figura 3. Vetores de expressão eucarióticos. (A) Vetor pPICHOLI. (Mobitec®) (B) Vetor pINTA (Silva, 2010).

3.6 Clonagem do gene L1 HPV-16

O plasmídeo contendo o gene L1 do HPV-16 codon-otimizado para expressão em *Pichia pastori*, foi gentilmente cedido pelo Prof Dr Robert L. Garcea da *University of Colorado Boulder* e clonado no vetor pPICHOLI pela Dr^a Silvia Boschi Bazan (Bazan, 2007).

A amplificação do gene L1 otimizado foi realizada a partir do vetor pPICZB/L1 HPV-16 utilizando os seguintes oligonucleotídeos:

Forward – 5' ACC ATG TCT TTG TGG TTG CCA 3'

Reverse – 5' GCG CGC TCT AGA CTA CTA TTA 3'

Após a amplificação por PCR, o volume da reação foi aplicado em gel de agarose 1% e a banda correspondente ao fragmento do gene L1 foi cortada e o gene recuperado utilizando o kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification®* (GE Healthcare). Em seguida, foi realizada reação de adenilação para permitir ligação do gene L1 no vetor pGEM-T easy®. Para confirmar a clonagem foi realizado o seqüenciamento de minipreparações plasmidiais do vetor pGEM-T/L1 HPV-16.

O fragmento L1 otimizado foi liberado do vetor através de digestão com a enzima *SpeI*, submetido ao tratamento com enzima Klenow, e em seguida digerido com *EcoRI*. Após isso, o fragmento foi ligado no vetor pPICHOLI previamente digerido com *Sall* e *EcoRI*.

A clonagem do gene L1 otimizado no vetor pINTA foi realizado por João Renato Souza Negrão e Silva. O vetor pGEM-T/L1 HPV-16 foi digerido com enzima de restrição *EcoRI* para liberação do gene L1 otimizado. Após isso, o fragmento foi ligado no vetor pINT-A previamente digerido com *EcoRI*. A clonagem no vetor pINT-A foi confirmada através de seqüenciamento (Silva, 2010).

3.7 Transformação de leveduras eletrocompetentes

Leveduras metilotróficas eletrocompetentes foram submetidas à eletroporação (1,5 kV, 200 Ω , 25 μ F) na presença de 5 μ g dos vetores pPICHOLI/L1 ou pINT-A/L1. Em seguida, as leveduras foram mantidas a 30°C por 2 h e depois plaqueadas em meio sólido YPD_{zeo}. Colônias isoladas foram selecionadas e inoculadas em meio líquido YPD_{zeo} por 16 h a 30 °C

em seguida as leveduras foram criopreservadas adicionando glicerol para a concentração final de 20% e mantidas a -80 °C.

3.8 Expressão da proteína L1 em *Pichia pastoris*

A partir de estoque criopreservado em glicerol, clones de levedura *P. pastoris* contendo o plasmídeo de expressão (pPICHOLI//L1 ou pINT-A/L1), foram inoculados em 5mL de meio YPD_{zeo}, e mantidas por 16h a 250 rpm a 30°C. Posteriormente, foram adicionados 95 mL de meio YPD_{zeo} e a cultura foi novamente mantida por 16 h a 250 rpm e 30°C.

Após este período, a cultura foi diluída em 900 mL de meio BMMY_{zeo} e mantida em condições de crescimento (250 rpm a 30°C) até atingir a densidade óptica 1,0 em $\lambda = 600$ nm. A indução da expressão do gene L1 foi obtida após adição de metanol (concentração final de 0,5% V/V). Uma vez que o metanol é consumido durante o período de indução, este procedimento foi repetido 24 h após a primeira adição de metanol. O período total de indução foi de 48 h.

3.9 Lise das Leveduras

Após a indução da expressão da proteína L1 recombinante, o cultivo foi centrifugado por 15min a 4°C e 2000 g e os precipitados foram ressuspensos em tampão de lise I. O material centrifugado foi lisado no agitador BeadBeater (Biospec Products) adicionado-se 0,5 a 1 volume de pérolas de vidro (0,5 mm) e efetuando-se por 8 ciclos de agitação de 30 s com intervalos de 1 min. O volume lisado foi centrifugado por 10 min a 4°C e 10000 g, e depois clarificado por filtração em filtro AP20 (Millipore) de retenção nominal de 0,8-8 μ m.

3.10 Purificação da proteína L1

A purificação da proteína L1 foi inicialmente realizada segundo protocolo descrito por Bazan e colaboradores (Bazan et al., 2009).

3.10.1 Preparação da coluna:

Foram empacotados 5 mL de resina Heparina-SepharoseTM Fast Flow (Amersham Pharmacia Biosciences) em uma coluna cromatográfica de 1,0 cm de diâmetro. Após o empacotamento, a resina foi extensivamente lavada com H₂O para retirada da solução de armazenamento (álcool 20%) e então equilibrada com a passagem de 50 mL de tampão de equilíbrio I (PBS 1X adicionado de 0,3 molL⁻¹).

3.10.2 Cromatografia de Afinidade:

O clarificado da lise das leveduras foi introduzido na coluna mantendo-se o fluxo de 1 mL/min. Após passagem da amostra, a resina foi lavada com tampão de lavagem I (PBS 1X adicionado de 0,4 molL⁻¹). A proteína adsorvida à resina foi eluída através de gradiente salino contínuo em tampão fosfato-salino (solução de eluição I contendo gradiente contínuo de NaCl com início em 0,4 M e final em 2,0 M). As eluições foram coletadas em tubos contendo 0,02 % (V/V) de Tween 80 para evitar a adsorção da proteína recombinante à parede do tubo de armazenamento (Shi et al., 2005).

3.11 Análise da purificação

As frações de material eluído foram analisadas quanto à presença da proteína recombinante e de contaminantes através de SDS-PAGE e Western-blotting.

3.11.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada segundo protocolo previamente descrito (Laemmli, 1970). O gel de poliacrilamida foi composto por gel de empilhamento contendo 5% de acrilamida e por gel de separação contendo 10 ou 12% de solução acrilamida-bisacrilamida. A eletroforese foi realizada em tampão Tris-glicina 1X, aplicando-se corrente constante de 25 mA para cada gel. Ao final da eletroforese os géis foram corados com o corante Coomassie Blue[®] e o excesso de corante foi removido através de incubação em solução descorante.

3.11.2 Western-Blot

Após eletroforese, as amostras fracionadas no gel de poliacrilamida foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose através do sistema BioRad Trans-Blot por 120 min a 300 mA. Ao final da transferência, a membrana foi corada com vermelho Ponceau S e as posições das bandas do marcador de massa molecular foram assinaladas. Em seguida, o corante vermelho Ponceau S foi removido com lavagem com água destilada e a membrana foi bloqueada com solução de leite 5% (m/V) em PBS-T por 16h e então incubada por 90 min com anticorpo monoclonal anti-L1 (CAMVIR[®], Chemicon International) na diluição de 1:800 em PBS-T contendo 3% BSA. Após essa incubação, a membrana foi lavada por 3 vezes com PBS-T e em seguida, incubada por 60 min com anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (Sigma Aldrich) na diluição de 1:10000 em PBS-T contendo 1% BSA. Ao final desta incubação, a membrana foi novamente lavada por 3 vezes com PBS-T. O kit comercial *ECL* (GE Healthcare) e o filme de raio X *Hyperfilm* (GE Healthcare), foram utilizados para a revelação da reação.

3.12 Ensaio de expressão comparativa da proteína L1 HPV 16

Durante as tentativas de purificação da proteína L1 realizadas, os clones de *P. pastoris* utilizados continham o vetor episomal pPICHOLI/L1 HPV 16 ou o vetor integrativo pINT-A/L1 HPV 16.

A partir do estoque em glicerol de dois clones contendo o vetor episomal e dois clones com vetor integrativo foram submetidos à indução da expressão da proteína L1 em pequena escala. Após o período de indução de 48 h, as células foram lisadas e diferentes volumes do lisado, 2 μ L e 5 μ L, foram utilizados para fracionamento em gel de poliacrilamida e Western-blot.

Para análise comparativa foram utilizadas amostras com quantidades conhecidas de VLPs purificadas (gentilmente cedidas pela D^a Luisa Villa do INCT-HPV), 20ng e 30ng. A quantificação foi estimada no equipamento Eagle Eye (Stratagene) através de comparação densitométrica entre a intensidade relativa da banda correspondente à proteína L1 e das amostras de VLPs de quantidades conhecidas.

3.13 Bactérias

Foram utilizadas bactérias *E. coli* linhagem DH5 α [™] (Life Technologies[®]), que possui genótipo: *F⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(r_K⁻ m_K⁺), λ -*. Esta linhagem foi utilizada para selecionar clones positivos da subclonagem no vetor pGEM-T easy e para selecionar clones positivos das clonagens nos vetores de expressão pAE e pCP.

Uma segunda linhagem de *E. coli* foi utilizada, BL21SI (Life Technologies[®]), que possui genótipo: *F⁻ ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm endA1 proUp::T7RNAP::malQ-LacZ, tet^S*. Esta linhagem contém o gene codificador para T7 RNA polimerase integrado em seu genoma sob controle do promotor proU osmoticamente indutível (Bhandari e Gowrishankar, 1997).

3.14 Bactérias quimiocompetentes

A preparação das bactérias quimiocompetente por MgCl_2 teve início com o inóculo de uma colônia de bactéria em 5 mL de meio líquido LBon (ou LB), esse inóculo foi mantido a 30 °C (ou 37° C) sob agitação por 16 h. Foram inoculados 2 mL da cultura inicial em 100 mL de meio LBon (ou LB) e esse cultivo foi mantido a 30 °C (ou 37° C) sob agitação. Ao atingir densidade óptica de 0,6 em $\lambda = 600 \text{ nm}$, foi adicionado 1 mL de MgCl_2 1 molL^{-1} ao cultivo e este foi incubado a 4 °C por 15 min. Após incubação, o cultivo foi centrifugado a 2000 g, 4 °C por 15 min, o precipitado formado foi ressuscitado em 10 mL de solução RFI incubado a 4 °C por 15 min e centrifugado a 2000g, 4 °C por 15 min. As células foram ressuscitadas em 2 mL de solução RFII, aliqüotadas (50 μL) e mantidas a -80 °C até o uso.

3.15 Vetores de clonagem e expressão em bactérias

O plasmídeo pGEM-T easy[®] (Promega) (figura 4) é um vetor de clonagem com tamanho de 3015 pb sendo fornecido pelo fabricante sob forma linearizada através de digestão com a enzima de restrição *Eco RV*. Ele contém timidina nas extremidades 3' possibilitando ligação de produtos de PCR gerados por algumas polimerases termoestáveis que tendem a adicionar adenina na extremidade dos amplicons produzidos. O vetor possui promotor do fago T7 (pT7), promotor Sp6 (pSp6), sítio múltiplo de clonagem e resistência à ampicilina.

Figura 4. Vetor de clonagem pGEM-T easy (Promega®).

O vetor pAE (2800 pb) é um vetor de expressão de alta cópia em *E. coli* desenvolvido no nosso laboratório (figura 5). Possui o promotor do fago T7 (pT7), sítio de ligação ao ribossomo (RBS), sequência para cauda de histidina (6xhis), sítio múltiplo de clonagem (multiple cloning site, MCS) e resistência à ampicilina conferida pelo gene da β -lactamase. A região da cauda de histidina presente na porção amino-terminal possibilita a posterior purificação de proteínas à ela fusionada através, de cromatografia de afinidade à níquel (Ramos et al., 2004).

Figura 5. Vetor de expressão pAE (Ramos et al, 2004).

O vetor pCP (5027 pb) (figura 6) é um vetor de expressão em *E. coli* e também possui o promotor T7 (pT7), uma sequência dos domínios ZZ da proteína A de *Staphylococcus aureus*, sítio múltiplo de clonagem (MCS) e resistência à ampicilina (Drevet et al., 1997). Como os domínios ZZ são os responsáveis pela ligação da proteína A à região Fc das imunoglobulinas do tipo IgG, uma fusão amino-terminal destes domínios permite que a proteína recombinante produzida por este vetor seja capaz de se ligar às IgGs.

Figura 6. Vetor de expressão pCP (Drevet *et al*, 1997).

3.16 Clonagem dos genes L2 HPV 16 e L2 HPV 18

Os genes L2 HPV 16 e L2 HPV 18, gentilmente cedidos pelo Prof^o Dr Richard Roden do Departamento de Patologia da *Johns Hopkins University*, foram amplificados a partir do plasmídeo pPROEXTha/L2 através da reação de cadeia da polimerase (PCR).

As PCRs foram realizadas utilizando os oligonucleotídeos abaixo listados:

- Amplificação para clonagem no vetor pAE

Gene L2 HPV 16

Foward - 5' - $\frac{GAG}{SacI} \frac{CTC}{XhoI} GCT CGA GAT$ GCG ACA CAA ACG TTC -3'

Reverse - 5' - $\frac{CCA}{NcoI} \frac{TGG}{NcoI}$ CTA GGC AGC CAA AGA GAC ATC TGA -3'

Gene L2 HPV 18

Forward - 5' - $\frac{GAG\ CTC}{SacI}$ $\frac{GCT\ CGA}{XhoI}$ GAT GGT ATC CCA CCG TGC C -3'

Reverse - 5' - $\frac{CCA\ TGG}{NcoI}$ CTA GGC CGC CAC AAA GCC ATC TGC -3'

- Amplificação para clonagem no vetor pCP

Gene L2 HPV 16

Foward - 5' - $\frac{GAG\ CTC}{SacI}$ $\frac{GCT\ CGA}{XhoI}$ GAT GCG ACA CAA ACG TTC -3'

Reverse - 5' - $\frac{CCA\ TGG}{NcoI}$ CTA GGT ACC $\frac{GTG\ ATG\ GTG\ ATG\ GTG\ ATG}{His\ x\ 6}$ GCC

CGG GCC CGG GCC GGT ACC GGA TCC GGC AGC CAA AGA GAC ATC TGA -
3'

Gene L2 HPV 18

Forward - 5' - $\frac{GAG\ CTC}{SacI}$ $\frac{GCT\ CGA}{XhoI}$ GAT GGT ATC CCA CCG TGC C -3'

Reverse - 5' - $\frac{CCA\ TGG}{NcoI}$ CTA GGT ACC $\frac{GTG\ ATG\ GTG\ ATG\ GTG\ ATG}{His\ x\ 6}$ GCC CGG

GCC CGG GCC GGT ACC GGA TCC GGC CGC CAC AAA GCC ATC TGC - 3'

A PCR foi realizada em termociclador PTC-100™ (Programable Thermal Controller, MJ Research) no qual foram utilizados os seguintes ciclos: 94 °C por 2 min seguido de 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 65 °C por 30 s e 72 °C por 3 min. Após isso, foi realizado um ciclo de 72 °C por 7 min. Por fim, a reação foi mantida a 4 °C.

Todas as reações foram realizadas em volume final de 50 µL na presença de 100 ng de DNA molde, 2 mmolL⁻¹ de MgCl₂, 0,2 mmolL⁻¹ de dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 5 unidades (U) de enzima *Pfu* DNA polimerase e solução tampão para enzima *Pfu* DNA polimerase

3.17 Análise dos produtos da amplificação por PCR

O volume total da reação de PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% (m/V), em tampão TAE 1X e brometo de etídio (0,5 µg/mL). As bandas presentes nas posições esperadas para os produtos da PCR foram recortadas, e o material recuperado através do kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification*® (GE Healthcare) e quantificados através da leitura a $A_{260\text{nm}}$ no espectrofotômetro de microvolume, Nanodrop®.

3.18 Subclonagem dos genes L2 HPV 16, L2 HPV 18 em pGEM-T® easy

3.18.1 Reação de Adenilação

Os fragmentos referentes aos genes L2 HPV 16 e L2 HPV 18 amplificados foram incubados na presença de $0,8 \text{ mmolL}^{-1}$ de dATP e 5 unidades (U) de Taq DNA polimerase a 94 °C por 5 min e em seguida a 72 °C por 30 s. Após isso, o volume total da reação foi purificado com *kit GFX™ PCR DNA and Gel band purification*® (GE Healthcare).

3.18.2 Reação de Ligação

Após adenilação, 100 ng dos produtos de PCR, 50 ng de pGEM-T easy® (Promega), 1 unidade (U) de enzima T4 DNA ligase e solução tampão para enzima T4 DNA ligase foram incubados a 16 °C por 16 h.

3.19 Transformação de bactérias quimiocompetentes

Bactérias quimiocompetentes *E. coli* DH5α (50 µL) foram incubadas com fração (5 µL) da reação de ligação pGEM-T/L2 por 30 min a 4 °C. Em seguida foi realizado um choque térmico de 2 min a 42 °C e 5 min a 4 °C. Após esta etapa, foram adicionados 350 µL de meio LB e as bactérias foram mantidas a 37 °C por 1 h. O volume final da transformação,

aproximadamente 400 µL, foi dividido e plaqueado em meio sólido LB_{amp}-ágar. As placas foram mantidas a 37 °C por 16 h.

3.20 Seleção de clones positivos pGEM-T/L2

As colônias da transformação foram selecionadas e inoculadas em 5 mL de meio LB_{amp} e mantidas a 37 °C por 16 h sob agitação (150 rpm). Parte dessa cultura de *E. coli*, aproximadamente 400 µL, foi aliqotada e centrifugada. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e à massa de bactérias foram adicionados 100 µL de Ficol Dye 2X e 38 µL de preparação de fenol-clorofórmio 1:1 (v/v). A mistura foi então vortexada e centrifugada.

O sobrenadante da mistura foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% (m/V), em tampão TAE 1X e brometo de etídio (0,5 µg/mL). Através da comparação da mobilidade eletroforética dos DNAs plasmidiais contendo o gene e do plasmídio vazio (Beucken *et al*, 1998), os clones positivos puderam ser selecionados. Estes clones tiveram os seus DNAs plasmidiais purificados usando *kit Plasmid prep mini spin*[®] (GE Healthcare) e submetidos à reação de seqüenciamento de DNA.

3.21 Confirmação das clonagens através de seqüenciamento

Os insertos clonados em cada vetor foram seqüenciados pelo método de dideoxinucleotídeo para confirmar a correta inserção e a ausência de mutações. O seqüenciamento foi realizado em um seqüenciador capilar automático ABI Prism 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems) utilizando-se *kit ABI Prism*[®] *BigDye Terminator Cycle Sequencing* (Applied Biosystems). Para a reação de seqüenciamento foram utilizados 150 ng de DNA plasmidial e 1,6 pmolL⁻¹ dos oligonucleotídeos iniciadores:

M13 forward - 5' GTA AAA CGA CGG CCA G 3'

M13 reverse - 5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3'

As seqüências obtidas foram analisadas no programa Vector NTI Advanced (Invitrogen).

3.22 Gene sintético L2 multimérico

Um gene com códons otimizados para expressão em *E. coli* contendo a seqüência de nucleotídeos correspondente à seqüência dos aminoácidos 11 a 88 da proteína L2 de cinco tipos de *Papilomavírus Humano* (HPVs) de alto risco oncogênico (HPV-16, HPV-18, HPV-33, HPV-52, HPV-58) foi sintetizado (Genscript[®]), nomeado gene L2 multimérico e clonado no vetor pUC57. O gene também contém sítios de enzimas de restrição que possibilitaram a clonagem do mesmo nos vetores de expressão em *E. coli* (pAE e pCP), além de uma seqüência espaçadora codificando cinco aminoácidos (GPGPG) (Livingston et al., 2002) entre cada seqüência da L2.

3.23 Clonagem nos vetores de expressão

3.23.1 Clonagem dos genes L2 HPV 16, L2 HPV 18 e L2 multimérico no vetor de expressão pAE

Os plasmídios obtidos na subclonagem em pGEM-T easy[®] foram submetidos à digestão com enzimas de restrição *XhoI* e *NcoI* para liberação dos fragmentos dos genes L2 HPV 16 e L2 HPV 18. O fragmento do gene L2 multimérico foi obtido através da digestão do plasmídio pUC57/ L2 multimérico com as enzimas de restrição *XhoI* e *NcoI*. O plasmídio pAE também foi submetido à digestão com as mesmas enzimas de restrição. A reação de ligação dos fragmentos no vetor e a seleção dos clones positivos foram realizadas conforme descrito nos itens 3.16.2 e 3.18, os plasmídios pAE/L2 foram submetidos à reação de seqüenciamento utilizando os oligonucleotídeos iniciadores T7 – 5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3' e pRSET – 5' TAG TTA TTG CTC AGC GGT GG 3' para confirmação das clonagens.

3.23.2 Clonagem dos genes L2 HPV 16, L2 HPV 18 e L2 *multimérico* no vetor de expressão pCP

Os plasmídios obtidos na subclonagem em pGEM-T easy[®] foram submetidos à digestão com enzimas de restrição *SacI* e *NcoI* para liberação dos fragmentos dos genes *L2* HPV 16 e *L2* HPV 18. O fragmento do gene *L2 multimérico* foi obtido através da digestão do plasmídio pUC57/*L2 multimérico* com as enzimas de restrição *SacI* e *NcoI*. O plasmídio pCP também foi submetido à digestão com as mesmas enzimas de restrição. A reação de ligação dos fragmentos no vetor e a seleção dos clones positivos foram realizadas conforme descrito nos itens 3.16.2 e 3.18, os plasmídios também foram submetidos à reação de sequenciamento utilizando o oligonucleotídeo iniciador T7 – 5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3' e pRSET – 5' TAG TTA TTG CTC AGC GGT GG 3' para confirmação das clonagens.

3.24 Expressão das proteínas em pequena escala

Para expressão das proteínas: L2 HPV-16, L2 HPV-18, ZZ-L2 HPV-16, ZZ-L2 HPV-18, L2 Multimérica e ZZ-L2 Multimérica, bactérias *E. coli* BL21(SI) quimiocompetentes foram transformadas com os plasmídios obtidos nas clonagens em pAE e pCP. As transformações foram plaqueadas em meio sólido LB_{amp}-ágar, e colônias selecionadas no meio sólido foram inoculadas em 2 mL de meio LB_{amp} e incubadas a 30 °C por 16 h, sob agitação. Após esse período, uma alíquota de cada cultura foi diluída (1:30) em 5 mL de meio LB_{amp}. Ao atingir a densidade óptica de 0,6 em $\lambda = 600$ nm, 1 mL de cada cultura foi retirada para uma posterior análise de bactérias não submetidas à indução.

Como as bactérias BL21(SI) contêm o gene da enzima T7 RNA polimerase integrado em seu genoma e sob controle osmoindutível, a indução da expressão das proteínas pôde ser realizada adicionando 300 mmol.L⁻¹ de NaCl a cada cultura de bactérias. Após adição de NaCl as culturas foram mantidas sob agitação a 30 °C por 3 h. Ao final do período de indução

uma alíquota de 1 mL foi retirada de cada cultura para uma posterior análise da expressão das proteínas recombinantes.

As amostras de bactérias não submetidas à indução e submetidas à indução foram centrifugadas e as bactérias foram ressuspensas em tampão de amostra para SDS-PAGE 1X. As bactérias foram lisadas através do uso de seringa (UI 100cc/1 mL) com agulha (0,45x13 mm, 26Gx0,5”). Os extratos foram incubados a 96 °C por 5 min e submetidos à SDS-PAGE.

Amostras de cada clone avaliadas foram criopreservadas em glicerol 30% a -80 °C.

3.25 Expressão das proteínas recombinantes em maior escala

Foram inoculados 50 µL do estoque criopreservado em glicerol de clones produtores das proteínas recombinantes em 5 mL de meio LB_{amp}. Este inóculo foi mantido a 30 °C por 16h sob agitação. Após esse período, o cultivo foi inoculado em 800 mL de meio LB_{amp}. Ao atingir a densidade óptica de 0,6 em $\lambda = 600$ nm, realizou-se a indução da expressão adicionando-se 300 mmol.L⁻¹ de NaCl à cultura de bactérias. A cultura foi mantida a 30 °C por 3h e após o período de indução as bactérias foram centrifugadas a 5400 g por 15 min. Após a centrifugação as bactérias foram ressuspensas em 80 mL tampão de lise II.

3.26 Lise das bactérias

Após serem ressuspensas, as bactérias foram submetidas à lise através de diferença de pressão (30000 psi) expressas no French Pressure[®] (Thermo Electron Corporation). O lisado bacteriano foi centrifugado a 12000 g por 30 min. A fração solúvel foi separada e o precipitado foi dissolvido em 20 mL de tampão de solubilização II. Em seguida, uma amostra do sobrenadante do lisado e uma amostra do precipitado do lisado foram submetidas à SDS-PAGE para verificar se as proteínas estavam sendo expressas sob a forma solúvel ou insolúvel (corpúsculo de inclusão).

3.27 Purificação das proteínas

Todas as proteínas (L2 HPV 16, L2 HPV 18, ZZ-L2 HPV 16, ZZ-L2 HPV 18, L2 Multimérica e ZZ-L2 Multimérica) foram expressas com uma cauda de 6xHis e obtidas sob a forma insolúvel de corpúsculos de inclusão. Assim, todas as purificações foram realizadas em condições desnaturantes. Os corpúsculos de inclusão dissolvidos em tampão de solubilização foram mantidos a temperatura ambiente por 16h.

3.27.1 Preparação da coluna

Foram empacotados 5 mL de resina quelante (Chelating-SepharoseTM Fast Flow, Amersham Pharmacia Biosciences) em uma coluna cromatográfica de 1,0 cm de diâmetro. Após empacotamento, a resina foi carregada com 25 mL de solução 300 mmol.L⁻¹ NiSO₄. Para a retirada do excesso de níquel, a resina foi lavada com 100 mL de água destilada e então, equilibrada com 50 mL de tampão de equilíbrio II.

3.27.2 Cromatografia de Afinidade à Níquel

O corpúsculo solubilizado (~20 mL) foi introduzido na resina mantendo-se o fluxo de 1 mL.min⁻¹. Após a passagem da amostra, a resina foi lavada com 30 mL tampão de equilíbrio II. A eluição das proteínas adsorvidas à resina foi realizada através de gradiente crescente de imidazol (5 mmol.L⁻¹, 20 mmol.L⁻¹, 40 mmol.L⁻¹, 60 mmol.L⁻¹, 1 mol.L⁻¹) em 20 mL tampão de eluição II. As frações referentes às concentrações de 5, 20, 40 e 60 mmol.L⁻¹ de imidazol foram coletadas em 5 mL, e as frações da concentração de 1 mol.L⁻¹ foram coletadas a cada 1 mL. Uma alíquota de cada fração da purificação foi analisada por SDS-PAGE.

3.28 Diálise das proteínas

As frações nas quais as proteínas estavam presentes foram reunidas (40 mL) e dialisadas utilizando membrana com limite de exclusão de 14 kDa. A membrana de diálise com a proteína recombinante foi imersa em 2 L de solução tampão e mantida a 4 °C por 16h, após esse período a solução tampão foi sucessivamente trocada, conforme descrito na figura 7. Após a diálise, a solução de proteína foi concentrada com Amicon Ultra 30k (Millipore) para reduzir o volume e facilitar a quantificação e a imunização.

Figura 7. Representação esquemática do protocolo de diálise.

3.29 Quantificação das proteínas recombinantes purificadas

Para realizar a quantificação das proteínas, foi utilizada, curva padrão com quantidades conhecidas de albumina bovina sérica . Uma alíquota da proteína recombinante dialisada e a curva padrão de BSA foram submetidas à SDS-PAGE e a quantificação foi realizada através de comparação densitométrica entre a intensidade relativa das bandas da proteína dialisada com as bandas da curva padrão utilizando o programa ImageJ.

3.30 Remoção do Lipopolissacarídeo (LPS)

A remoção do lipopolissacarídeo das soluções contendo as proteínas recombinantes foi realizada segundo protocolo descrito por Aida e colaboradores. A cada 1 mL de solução foram adicionados 10 µL de Triton[®] X-114, e essa mistura foi submetida à agitação em vórtex por 30 s. As soluções foram mantidas a 4 °C por 5 min e novamente agitadas em vórtex por 30 s, seguidos de incubação a 37 °C por 5 min e centrifugação a 37 °C por 30 s a 9300 g. A fase aquosa foi coletada e o procedimento repetido por mais 3 vezes. Todo material utilizado neste procedimento era livre de pirogênio (Aida e Pabst, 1990).

3.31 Ensaio de imunização com as proteínas recombinantes

Os ensaios de imunização em camundongos foram aprovados pelo Comitê de Ética do Instituto Butantan (protocolo N° 649/09). Os ensaios foram baseados em protocolo previamente publicado (Jagu et al., 2009).

No primeiro ensaio de imunização grupos de cinco camundongos SPF (Specific pathogen free) BALB/C fêmeas de 5 a 7 semanas, obtidos no Centro de Bioterismo da Fundação Faculdade de Medicina da USP, foram imunizados por via subcutânea com 3 doses de cada preparação com intervalos de 15 dias entre cada dose. No dia anterior à primeira dose foi realizada sangria para obtenção de soro pré-imune, nos dias anteriores as segunda e terceira doses e no 15º dia após a terceira dose foram realizadas sangrias para obtenção de soro imune.

Cada dose era composta por 25 µg de proteína recombinante ou 25 µg de proteína recombinante + adjuvante (50 µg de hidróxido de alumínio e 5 µg de monofosforil lipídio A de *Bordetella pertussis* fornecido pela Divisão Bioindustrial do Instituto Butantan). Para o ensaio, foram incluídos grupos controles, um deles sendo imunizado com a proteína ZZ (gentilmente cedida pela Dr^a Maria Leonor Sarno de Oliveira do Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan) e o segundo grupo controle imunizado com a preparação dos adjuvantes (50 µg de hidróxido de alumínio e 5 µg de monofosforil lipídio A) utilizados no ensaio.

No segundo ensaio de imunização, grupos de seis camundongos SPF BALB/c fêmeas de 5 a 7 semanas, obtidos no Centro de Bioterismo da Fundação Faculdade de Medicina da USP, foram imunizados por via intraperitonal com 4 doses de cada preparação com intervalos de 15 dias entre cada dose. No dia anterior à primeira dose foi realizada sangria para obtenção de soro pré-imune, e nos dias anteriores a cada dose foram realizadas sangrias para obtenção de soro imune. A sangria final foi realizada 4 meses após a última dose (4ª dose).

Os camundongos foram imunizados com 75 µg de proteína (25 µg de cada proteína, L2 HPV 16, L2 HPV 18, L2 Multimérica) ou 75 µg de proteína + adjuvante. Os adjuvantes utilizados neste ensaio foram hidróxido de alumínio (150 µg) + monofosforil lipídio A - MPLA (15 µg), wP_{low} (Vacina celular Pertussis low, lote IBVPL 03/06), fornecida pela Divisão Bioindustrial do Instituto Butantan (1/8 da dose humana, 62,5 µg de *B. pertussis*), Adjuvante de Freund Completo na primeira dose e Incompleto nas doses seguintes (1:1, V/V).

3.32 Obtenção do soro

A obtenção do soro foi realizada através de sangria via punção do plexo retro-orbital. O sangue coletado foi mantido a 37 °C por 30 min para permitir coagulação e depois mantido a 4 °C por 30 min. Em seguida, foi realizada centrifugação a 4 °C por 20 min a 400 g. Após a centrifugação, o sobrenadante foi cuidadosamente coletado e mantido a -20 °C até o momento de uso.

3.33 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Placas de 96 micropoços foram incubadas a 4°C por 16 h com 100 ng/poço de proteína recombinante (L2 HPV-16, L2 HPV-18 ou L2 Multimérica) diluída em solução tampão carbonato-bicarbonato. Em seguida, as placas foram lavadas por 3 vezes com PBS-T e bloqueadas com 10% (m/V) de leite desnatado em PBS-T por 1 h a 37°C e ao final do bloqueio, foram novamente lavadas por 3 vezes com PBS-T. A seguir, os poços foram incubados com diluições seriadas dos soros (a partir de 1:100) em PBS-T/BSA 1% (m/V) por uma hora e meia a 37°C e lavados por 3 vezes com PBS-T. Após as lavagens, anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (Sigma) diluído (1:10000) em PBS-T/BSA 1% (m/V) foi adicionado aos poços e incubado por 1 h a 37°C. Para a revelação das placas foram adicionados 100 µL de solução tampão citrato-fosfato contendo orto-fenilenodiamina (OPD) 0,04% (m/V) e água oxigenada 0,05% (V/V). A reação de revelação foi interrompida após 15

min adicionando-se 50 μL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 4 mol.L^{-1} . As placas foram submetidas à leitura espectrométrica em comprimento de onda de 492 nm. Os títulos foram definidos pela diluição do soro cujo valor de absorbância a 492 nm foi 0,1.

3.34 Ensaio funcional das proteínas em fusão com domínio ZZ

Placas de 96 micropoços foram incubadas a 4°C por 16 h com 100 ng/poço de proteína recombinante (ZZ L2 HPV 16, ZZ L2 HPV 18, ZZ L2 Multimérica, L2 HPV 16, L2 HPV 18, L2 Multimérica, ZZ, Proteína A, PspA2 recombinante de *S. pneumoniae* produzida em *E. coli* gentilmente cedida pela Dr^a Eliane Miyaji (Moreno et al., 2010)) diluída em tampão carbonato-bicarbonato. Em seguida, as placas foram lavadas por 3 vezes com PBS-T e bloqueadas com 10% (m/V) de leite desnatado em PBS-T por 1 h a 37°C e ao final do bloqueio, foram novamente lavadas por 3 vezes com PBS-T. Após as lavagens, o anticorpo *rabbit anti-goat* IgG (H+L) conjugado à peroxidase (Southern Biotech) diluído (1:20000) em PBS-T/BSA 1% (m/V) foi adicionado aos poços e incubado por 1 h a 37°C. Para a revelação das placas foram adicionados 100 μL de solução tampão citrato-fosfato contendo orto-fenilenodiamina (OPD) 0,04% (m/V) e água oxigenada 0,05% (V/V). A reação de revelação foi interrompida após 15 min adicionando-se 50 μL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 4 mol.L^{-1} . As placas foram submetidas à leitura espectrométrica em comprimento de onda de 492 nm.

3.35 Produção de pseudovírus

As células 293 TT (HEK 293TT) foram originadas a partir de células 293 T que carregam uma cópia estavelmente integrada do genoma do SV 40 (*Simian virus* 40) e expressam o antígeno T pequeno. Para obter as células 293 TT, as células 293 T foram transfectadas com cassete de expressão contendo cDNA do antígeno T grande do SV 40. Essas células replicam plasmídios com origem de replicação do SV 40 em elevado número de cópias, facilitando a produção de pseudovírus.

Os pseudovírus de diferentes tipos de HPVs foram produzidos segundo o protocolo descrito por Pastrana e colaboradores (Pastrana et al., 2004). Células 293 TT foram co-transfectadas com os plasmídeos contendo os genes das proteínas estruturais do papillomavirus (pShell) e o plasmídeo que contém gene repórter (pYSEAP) usando lipofectamina 2000 (Invitrogen), conforme instruções do fabricante. Em seguida, novo meio de cultura foi adicionado e as células foram mantidas a 37 °C por 30 h. Após esse período, as células foram recuperadas, misturadas à DPBS (Dulbecco's PBS) suplementado com 9,5 mmolL⁻¹ de MgCl₂, 0,5% Brij 85 e 0,5 % de benzonase e mantidas a 37 °C por 45 min. Em seguida foi realizada centrifugação a 1500 g, 4°C por 10 min , e o sobrenadante foi coletado em tubos siliconizados. Os pseudovírus foram purificados através de gradiente com Opiprep[®] Density Gradient Medium (Sigma Aldrich) e em seguida, recuperados por ultracentrifugação (3,5 h, 234000 g, 16 °C). A quantificação dos pseudovírus foi realizada através de comparação densitométrica das intensidades relativas das bandas dos pseudovírus e da curva padrão de BSA em gel de poliacrilamida.

3.36 Ensaio de neutralização de pseudovírus

Pseudovírus de HPV, contendo o plasmídeo com gene repórter para fosfatase alcalina secretada (pYSEAP), foram incubados com soros (obtidos no primeiro ensaio de imunização) em diferentes diluições a 4°C por 1 h. Após esse período, a mistura de pseudovírus e soro foi colocada em placa de 96 poços de poliestireno com células 293 TT previamente aderidas e mantidas a 37°C por 72 h. Ao final da incubação 50 µL de sobrenadante foram transferidos para outra placa 96 poços de poliestireno e centrifugado 1000 g por 5 min, 15 µL do sobrenadante clarificado foram adicionados em placa de 96 poços (optiplat-96) e incubados 65° C por 30 min. A presença de SEAP neste sobrenadante foi detectada através de reação quimioluminescente com o *kit Great ESCAPE SEAP Chemiluminescence Detection 2*

(Clontech). Em seguida, a placa foi submetida à leitura no MLX Microplate Luminometer (Dynex Technologies). O título de neutralização foi definido como o recíproco da mais alta diluição do soro em que se observou redução de ao menos 50% na atividade da SEAP comparado com a reatividade do controle positivo.

4 Resultados

Parte A – Produção e purificação de VLPs da proteína L1

4.1 Purificação da proteína L1 em resina Heparina-Sepharose

4.1.1 Purificação da proteína L1 HPV 16 utilizando clone de *Pichia pastoris* com vetor de expressão pPICHOLI

O objetivo inicial deste projeto foi o estabelecimento de um protocolo de purificação de proteína L1 a partir de *Pichia pastoris* recombinantes. Utilizou-se numa primeira tentativa o protocolo descrito por Bazan e colaboradores que utiliza um clone de *P. pastoris* contendo vetor episomal de expressão pPICHOLI/L1 (Bazan et al., 2009). A indução da expressão foi mantida por 48h. Após a indução as leveduras foram lisadas e o extrato da lise clarificado foi introduzido em coluna contendo resina Heparina Sepharose previamente equilibrada com solução de equilíbrio I contendo $0,3 \text{ molL}^{-1}$ NaCl. As alíquotas das eluições coletadas foram submetidas a Western-blot para detecção da presença da proteína L1 e possíveis contaminantes.

Um experimento representativo do ensaio de purificação da proteína L1 produzida com vetor pPICHOLI///está demonstrado na figura 8. Nas frações das eluições de 0,4 a $1,3 \text{ molL}^{-1}$ NaCl (figura 8A) a proteína L1 foi detectada pela presença de banda com massa molecular esperada (55 kDa). No conteúdo da amostra não adsorvida na resina foi detectada a presença de L1, sugerindo que a resina não pôde reter a quantidade total de proteína presente no lisado celular. As eluições ainda apresentaram evidências de degradação da proteína L1 que correspondem às bandas de tamanho inferior ao tamanho da proteína (bandas inferior a 55 kDa) e possível agregação (representada por bandas superiores à massa esperada de L1). As membranas coradas com corante vermelho Ponceau S[®] (figura 8B) mostraram a presença de contaminantes (proteínas de tamanho abaixo ao da proteína L1).

Figura 8. Análise da purificação com vetor episomal. (A) Western-blot com alíquotas provenientes da purificação utilizando vetor episomal. M: padrão de massa molecular, L: lisado clarificado de *Pichia pastoris* introduzido na coluna, NA: não adsorvido à resina, NaCl 0,4 – 2,0 M: gradiente contínuo de cloreto de sódio, C: controle positivo (extrato de *Pichia pastoris* expressando a proteína L1). (B) As membranas de nitrocelulose utilizadas, coradas com corante vermelho Ponceau S[®].

4.1.2 Purificação da proteína L1 HPV 16 utilizando clone de *Pichia pastoris* com vetor de expressão pINT-A

Nesta purificação em resina Heparina-Sepharose foi utilizado um clone transformado com um segundo vetor de expressão, o vetor integrativo pINT-A. Tanto o tempo de indução da expressão de L1 (48h), quanto as condições de lise foram realizadas conforme descrito no protocolo citado no item anterior. Adotou-se um clone transformado com pINT-A/L1 por tratar-se de um recombinante estável, com cassete de expressão integrado no genoma, não necessitando de uso de antibiótico como no caso da construção pPICHOLI/L1. Além do uso de um vetor diferente, esta purificação contou com alterações metodológicas em relação ao

protocolo realizado anteriormente objetivando-se uma melhora de rendimento (principalmente relacionados com agregação, degradação e má adsorção da proteína L1 à resina).

As mudanças introduzidas no novo protocolo foram: (i) equilíbrio da resina Heparina-Sepharose com tampão de equilíbrio I contendo $0,4 \text{ molL}^{-1}$ de NaCl, (ii) adição de PMSF (5 mmolL^{-1}) ao tampão de lise, colocando-se inicialmente PMSF para $2,5 \text{ mmolL}^{-1}$ e posteriormente mais PMSF para completar $5,0 \text{ mmolL}^{-1}$ final, eluições coletadas em tubos de poliestireno contendo 0,04% de Tween 80 para diminuir a perda de L1 por adsorção (Shi et al., 2005).

As amostras das eluições provenientes desta purificação foram submetidas à análise por Western-blot. A figura 9 mostra um experimento representativo do ensaio de purificação utilizando clone de *P. pastoris* com vetor integrativo. Na figura podem ser observadas bandas com tamanho esperado para proteína L1 (figura 9A) na maioria das frações das eluições ($0,5\text{-}2,0 \text{ molL}^{-1}$ NaCl), não houve presença de agregação e nem degradação da proteína L1, embora nas membranas coradas com vermelho Ponceau S[®] evidenciassem a presença de contaminantes (bandas de massa inferior à da proteína L1) nas eluições (figura 9B).

Figura 9. Análise da purificação com vetor integrativo. (A) Western-blot com alíquotas provenientes da purificação utilizando vetor integrativo. M: padrão de massa molecular, L: lisado clarificado de *Pichia pastoris* introduzido na coluna, NA: não adsorvido à resina, NaCl 0,4 – 2,0 M: gradiente contínuo de cloreto de sódio. (B) As membranas de nitrocelulose utilizadas, coradas com corante vermelho Ponceau S[®].

4.2 Quantificação da expressão da proteína L1 em levedura

A expressão da proteína L1 foi realizada com os clones de *P. pastoris* utilizando os dois tipos de vetores: (i) episomal pPICHOLI/L1, (ii) integrativo pINT-A/L1. Com objetivo de verificar qual vetor apresentava melhor expressão da proteína L1, foi realizado um ensaio de expressão comparativa com clones contendo os diferentes vetores (figura 10).

A quantificação foi realizada com extratos de *P. pastoris* linhagem KM71, comparando a expressão entre dois clones de leveduras que continham vetor pPICHOLI/L1 e dois clones com vetor pINT-A/L1. Duas amostras com quantidades estabelecidas de VLPs

purificadas foram incluídas (30 ng e 20 ng respectivamente) para o cálculo estimado da quantidade da L1 expressa nos clones recombinantes.

Figura 10. Western-blot de diferentes clones de *P. pastoris* submetidos à indução por 48h. Os poços correspondem a dois clones contendo vetor pPICHOLI/L1 (CL A: clone A e CL B: clone B), VLPs purificadas (30 e 20 ng respectivamente), e dois clones contendo vetor pINT-A/L1 (CL A: clone A e CL B: clone B). Cada clone foi amostrado duas vezes, aplicando-se 2 μ L e 5 μ L (da esquerda para a direita), Uma seta indica a altura de massa molecular esperada para a uma banda de L1.

Os clones A e B contendo vetor pPICHOLI/L1 obtiveram médias de expressão de, respectivamente, 18,6 mg e 17,8 mg de proteína L1 em 1 L de cultura. Os clones A e B contendo vetor pINT-A/L1, são representados pelas colunas CLA e CLB, apresentaram expressão média de, respectivamente, 20,4 mg e 29,7 mg de proteína L1 em 1 L de cultura.

Parte B – Produção de candidatos vacinais baseados na proteína L2

4.3 Amplificação dos fragmentos dos genes L2 HPV 16 e L2 HPV 18 e clonagem em pAE

Os produtos da PCR da amplificação dos genes L2 HPV 16 e L2 HPV 18 foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% (figura 11), no qual pode ser observadas bandas correspondendo ao tamanho esperado para os genes L2 HPV 16 (1441 pb) e L2 HPV 18 (1408 pb). Em seguida, os fragmentos foram clonados no vetor pGEM-T. A clonagem foi confirmada por seqüenciamento.

Figura 11. Gel de agarose 1% com produtos de PCR para clonagem no vetor pAE. M: padrão 1 kb plus (Invitrogen), 16: amplificação do gene L2 HPV-16, 18: amplificação do gene L2 HPV-18.

Os plasmídeos pGEM-T/L2-16 e pGEM-T/L2-18 foram submetidos à digestão com as enzimas *Xho*I e *Nco*I para liberação dos fragmentos e em seguida foram clonados no vetor pAE para obtenção dos plasmídeos pAE/L2-16 e pAE/L2-18. Os componentes do cassete de expressão dessas construções estão representados na figura 12.

Figura 12. Representação esquemática do cassete de expressão do vetor pAE-L2

4.4 Amplificação dos fragmentos dos genes L2 HPV 16 e L2 HPV 18 e clonagem em pCP

A reação de PCR para amplificação foi realizada como descrito na seção anterior no item 3.16. O oligonucleotídeo *reverse* utilizado nesta reação permitiu a inserção de uma sequência codificadora de espaçador constituído por cinco aminoácidos (glicina e prolina) e também uma sequência codificadora de cauda de histidina (seis aminoácidos histidina) na porção C-terminal. Após a reação o produto foi submetido à eletroforese em gel de agarose

1% , no qual pode ser observada banda de tamanho esperado para o gene L2 HPV 16 (1492 pb) e gene L2 HPV 18 (1459 pb) (resultados não mostrados).

Os plasmídeos pGEM-T/L2-16 e pGEM-T/L2-18 foram submetidos à digestão com as enzimas *SacI* e *NcoI* para liberação dos fragmentos, e então clonados no vetor pCP gerando os plasmídeos pCP/L2-16 e pCP/L2-18. Os componentes do cassete de expressão dessas construções estão representados na figura 13.

Figura 13. Representação esquemática do cassete de expressão do vetor pCP-L2.

4.5 Clonagem do gene L2 multimérico

O plasmídeo pUC57 contendo o gene L2 multimérico sintetizado (Genscript[®]), foi submetido à digestão com as enzimas *NdeI* e *NcoI* para liberação do fragmento correspondente ao gene L2 multimérico (1303 pb) (figura 14). Em seguida o fragmento foi clonado no vetor pAE para obtenção do plasmídeo pAE/L2 multimérico. Também foi realizada uma reação de digestão, com as enzimas *SacI* e *NcoI* para liberação de fragmento do gene L2 multimérico (1295 pb), e o fragmento foi clonado no vetor pCP para obtenção do plasmídeo pCP/L2 multimérico. Os componentes dos cassetes de expressão das construções pAE/L2 multimérico e pCP/L2 multimérico estão representados respectivamente na figura 15A e 15B.

Figura 14. Gel de agarose 1% da digestão do vetor pUC57/L2 multimérico com *NdeI* e *NcoI* (A) e com *SacI* e *NcoI* (B). As digestões liberaram fragmentos correspondentes ao gene L2 multimérico (indicados pelas setas). A digestão de diversos clones é indicada em cada gel (6 clones em A, 3 clones em B), M: marcador 1 kb plus (Invitrogen), nd: vetor não submetido à digestão.

Figura 15. Representação esquemática do cassete de expressão do gene L2 multimérico clonado no vetor pAE (A) e do gene L2 multimérico clonado no vetor pCP (B).

4.6 Expressão das proteínas L2 recombinantes

A avaliação da expressão das proteínas recombinantes foi realizada com bactérias *E. coli* BL21(SI) transformadas com os plasmídios gerados nas clonagens. Clones das bactérias foram cultivados em meio LB_{amp} a 30°C, induzidos com NaCl e o lisado bacteriano de cada clone foi aplicado em gel de poliácridamida 10% para as proteínas L2 HPV-16, L2 HPV-18,

ZZ-L2 HPV-16 e ZZ-L2 HPV-18 ou em gel de poliacrilamida 12% no caso das proteínas L2-multimérica e ZZ-L2-multimérica (figura 16).

Figura 16. Gel de poliacrilamida 10 e 12% da análise da expressão de clones da bactéria BL21SI submetidas à indução com NaCl. M: padrão de massa molecular, NI: bactéria não submetida à indução, I: bactéria submetida à 3 h de indução, SI: bactéria não transformada com plasmídio de expressão, C1: clone 1, C2: clone 2, C3: clone 3, C4: clone 4. As setas indicam a presença de cada proteína recombinante analisada.

As seqüências de aminoácidos das proteínas recombinantes foram utilizadas para calcular as massas moleculares e pontos isoelétricos (pI) através do programa ProtParam disponível em <http://web.expasy.org/protparam/>. Os dados obtidos estão descritos na tabela 2.

Tabela 2. Massas moleculares e pontos isoelétricos das proteínas recombinantes.

PROTEÍNA	NÚMERO DE AMINOÁCIDOS	MASSA MOLECULAR (kDa)	PONTO ISOELÉTRICO (pI)
L2 HPV 16	482	51,88	6,15
L2 HPV 18	471	50,79	6,11
ZZ-L2 HPV 16	622	67,26	5,71
ZZ-L2 HPV 18	611	66,17	5,67
L2 Multimérica	431	42,28	9,31
ZZ-L2 Multimérica	557	56,58	8,65
ZZ	127	14,44	4,89

Através da comparação dos padrões de bandas apresentados pelo lisado de bactéria não-induzida e induzida foi possível observar, para cada caso analisado, a presença de uma banda na amostra do lisado bacteriano induzido para cada proteína recombinante. A diferença entre a massa molecular predita e a massa molecular visualizada no gel deve-se à migração anômala apresentada pela proteína L2 (Muller et al., 1995).

4.7 Análise da expressão das proteínas L2 em maior escala

As expressões em maior escala foram realizadas a partir de estoque em glicerol dos clones que apresentaram melhor expressão em pequena escala. Para expressão de cada proteína foram utilizados cultivos de 800 mL, cujas células foram coletadas e lisadas após a indução da expressão. Amostras do sobrenadante do lisado (fração solúvel) e do precipitado solubilizado (fração insolúvel) foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% ou 12%.

A presença das proteínas recombinantes foi identificada através de banda com massa molecular correspondente na amostra do cultivo induzido. Todas as proteínas recombinantes

foram detectadas majoritariamente na fração insolúvel, indicando que foram expressas sob a forma insolúvel, em corpúsculos de inclusão (figura 17). Nota-se que a fusão ZZ parece ter aumentado a solubilidade das proteínas L2.

Figura 17. Gel de poliacrilamida 10 e 12% da análise do corpúsculo de inclusão. M: padrão de massa molecular, SI: bactéria BL21SI não transformada com o plasmídio de expressão, NI: bactéria não submetida à indução de expressão, I: bactéria submetida à 3 h de indução, S: sobrenadante do lisado bacteriano, C: corpúsculo do lisado bacteriano solubilizado em solução com 8 M de uréia.

4.8 Purificação das proteínas L2 recombinantes

As proteínas recombinantes foram expressas em fusão com cauda de histidina e purificadas por cromatografia de afinidade à níquel em condições desnaturantes a partir dos corpúsculos de inclusão solubilizados em tampão contendo 8 molL^{-1} uréia.

A purificação das proteínas foi confirmada através da presença de banda específica em gel de SDS-PAGE (as seis proteínas purificadas podem ser visualizadas na figura 18). As frações que continham as proteínas purificadas e com maior grau de pureza foram reunidas para a realização da diálise. O tampão utilizado na primeira etapa de diálise continha 4 molL^{-1} uréia, sendo realizadas sucessivas reduções da quantidade de uréia. Ao final do processo foi possível obter as proteínas recombinantes em solução de tampão fosfato sem presença de uréia.

Figura 18. Gel de poliacrilamida 10% com alíquotas das proteínas após purificação por cromatografia de afinidade. M: padrão de massa molecular (em kDa).

Uma alíquota de cada proteína foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida junto com curva com padrão de BSA, e então as proteínas foram quantificadas por densitometria através do programa Image J (tabela 3). Também foi calculado o rendimento de proteína purificada por litro de cultivo.

Tabela 3. Quantificação das proteínas

Proteína recombinante	Concentração (µg/µL)	Produção (mg/L)
L2 HPV 16	0,19	3,8
L2 HPV 18	0,17	3,4
L2 Multimérica	0,2	4,0
ZZ L2 HPV 16	0,21	4,2
ZZ L2 HPV 18	0,31	6,2
ZZ L2 Multimérica	0,2	4,0
ZZ	0,2	4,0

4.9 Indução de anticorpos anti-L2 induzidos pelas proteínas de fusão

Para realizar os ensaios de imunização, todas as soluções contendo as proteínas recombinantes foram previamente submetidas à remoção de lipopolissacarídeo (LPS) (Aida e Pabst, 1990). O ensaio de imunização foi realizado com um total de 14 grupos (12 grupos amostrais e 2 grupos controles) nos quais os animais foram imunizados por via subcutânea com cada proteína recombinante na ausência e presença de adjuvantes (hidróxido de alumínio e monofosforil lipídio A). A estratégia de imunização utilizada está esquematizada na figura 19.

Figura 19. Representação esquemática da estratégia de imunização.

O *pool* dos soros obtidos na sangria final de cada grupo foi analisado por ELISA para a detecção de anticorpos sistêmicos (IgG presente no soro) contra as proteínas utilizadas na imunização (figura 20). Os grupos imunizados com L2 HPV 16 e L2 HPV-16-adjuvante apresentaram títulos de anticorpos de 1:25600 e 1:51200, respectivamente (figura 20A). A imunização com a proteína L2 HPV 18, induziu altos níveis de anticorpos no grupo que recebeu L2 HPV 18-adjuvante (1:102400). A imunização com a proteína L2 Multimérica induziu baixos níveis de anticorpos com as titulações dos soros variando entre 1:800 e 1:1600.

Figura 20. Titulação de anticorpos IgG anti-L2 após imunização subcutânea de camundongos BALB/c com as proteínas recombinantes. Foram utilizados o *pool* dos soros de 5 animais de cada grupo. (A) *Coating* utilizando a proteína L2 HPV-16. (B) *Coating* utilizando a proteína L2 HPV-18. (C) *Coating* utilizando a proteína L2 Multimérica.

As análises de indução de anticorpo IgG anti-L2 através de ELISA foram realizadas utilizando-se o *pool* de soros (como mostrado acima) e também com os soros individuais (figura 21). Para a representação gráfica dos soros individuais, o inverso do título foi determinado para cada grupo. A significância estatística da diferença entre os grupos foi avaliada com testes não paramétricos de Kruskal-Wallis, seguido de segundo teste estatístico, Mann-Whitney, para comparação par-a-par entre os grupos (tabelas 4 a 6).

O teste de Kruskal-Wallis apresentou um valor de p igual a 0,0001, indicando que existe heterogeneidade entre as amostras (não mostrado). A comparação par-a-par entre os grupos nos quais foi administrada a proteína L2 HPV 16, não fusionada e fusionada ao domínio ZZ, mostra que o grupo imunizado com a fusão gerou títulos de IgG anti-L2 menores do que os obtidos pelo grupo sem a fusão com o domínio ZZ (figura 21A). A adição de adjuvante (hidróxido de alumínio e MPLA) às proteínas intensificou a produção de IgG anti-L2, mas com uma diferença significativa nos níveis de anticorpos observada apenas em relação à proteína fusionada. A tabela 4 apresenta os valores de P_{value} obtidos pela comparação par a par entre os grupos imunizados com as proteínas L2 HPV 16 e ZZ-L2 HPV 16.

A comparação entre os grupos imunizados com as proteínas L2 HPV 18 e ZZ L2 HPV 18 mostra que, de maneira semelhante ao caso anterior, a proteína não fusionada induziu nível de anticorpos anti-L2 superiores àqueles obtidos com a proteína fusionada (figura 21B), e que a adição de adjuvante às proteínas intensificou a produção de anticorpos podendo ser observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (tabela 5).

Nos grupos em que foram administradas as proteínas L2 Multimérica e ZZ L2 Multimérica, os títulos de IgG obtidos apresentaram valores próximos não sendo observadas diferenças significativas, sugerindo uma indução de anticorpos de mesma intensidade para todos os grupos (figura 21C).

A imunização com as proteínas mostrou de forma geral que a adição de adjuvantes às proteínas L2 HPV 16 e L2 HPV 18 potencializou a produção de anticorpos do tipo IgG, e que a fusão ZZ não promoveu aumento do nível de anticorpos, ao contrário os níveis de anticorpos do tipo IgG gerados foram mais baixos. Com relação aos níveis de anticorpos induzidos pela proteína L2 multimérica aqueles foram baixos e uniformemente similares entre os grupos.

Figura 21. Indução de IgG anti-L2 após imunização de camundongos BALB/c por via subcutânea com as proteínas recombinantes. (A) Títulos dos soros dos grupos imunizados com as proteínas L2 HPV 16 e ZZ L2 HPV 16 na presença e ausência de adjuvante (hidróxido de alumínio e monofosforil lipídio A), (B) Título dos soros dos grupos imunizados com as proteínas L2 HPV 18 e ZZ L2 HPV 18 na presença e ausência de adjuvante, (C) Títulos dos soros dos grupos imunizados com as proteínas L2 Multimérica e ZZ L2 Multimérica na presença e ausência de adjuvante. (*) diferença significativa ($p < 0,05$), (**) diferença significativa ($p < 0,01$) para o teste Mann-Whitney. ND: absorbância não detectada.

Tabela 4. Valores de P_{value} obtidos através do teste Mann-Whitney para as comparações par-a-par dos títulos de IgG anti-L2 obtidos no ensaio de imunização utilizando *coating* com a proteína L2 HPV 16. Os números marcados em vermelho representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Coating L2 HPV 16				
	L2 HPV 16	ZZ L2 HPV 16	L2 HPV 16 + Alum + MPLA	ZZ L2 HPV 16 + Alum + MPLA
L2 HPV 16				
ZZ L2 HPV 16	0,0107			
L2 HPV 16 + Alum + MPLA	0,0833	0,0092		
ZZ L2 HPV 16 + Alum + MPLA	0,0107	0,0112	0,0092	

Tabela 5. Valores de P_{value} obtidos através do teste Mann-Whitney para as comparações par-a-par dos títulos de IgG anti-L2 obtidos no ensaio de imunização utilizando *coating* com a proteína L2 HPV 18. Os números marcados em vermelho representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Coating L2 HPV 18				
	L2 HPV 18	ZZ L2 HPV 18	L2 HPV 18 + Alum + MPLA	ZZ L2 HPV 18 + Alum + MPLA
L2 HPV 18				
ZZ L2 HPV 18	0,0532			
L2 HPV 18 + Alum + MPLA	0,0092	0,0095		
ZZ L2 HPV 18 + Alum + MPLA	0,1251	0,015	0,016	

Tabela 6. Valores de P_{value} obtidos através do teste Mann-Whitney para as comparações par-a-par dos títulos de IgG anti-L2 obtidos no ensaio de imunização utilizando *coating* com a proteína L2 Multimérica. Os números marcados em vermelho representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Coating L2 Multimérica				
	L2 Multimérica	ZZ L2 Multimérica	L2 Multimérica + Alum + MPLA	ZZ L2 Multimérica + Alum + MPLA
L2 Multimérica				
ZZ L2 Multimérica	0,1351			
L2 Multimérica + Alum + MPLA	0,2636	0,0833		
ZZL2 Multimérica+Alum+ MPLA	0,5152	0,1887	0,7972	

Os soros dos grupos imunizados com as proteínas L2 Multimérica e ZZ L2 Multimérica foram analisados quanto à reatividade cruzada contra as proteínas L2 HPV 16 e L2 HPV 18 (figura 22). Os soros de todos os grupos foram capazes de reconhecer a proteína L2 HPV 16, e os níveis de reconhecimento foram estatisticamente superiores em relação aos controles (ZZ e hidróxido de alumínio/monofosforil lipídio A). Entre os soros dos grupos imunizados com as proteínas, houve um padrão de reconhecimento com intensidades similares e sem diferença estatística.

Na avaliação de reatividade cruzada contra a proteína L2 HPV 18, apenas os soros dos grupos ZZ L2 Multimérica e ZZ L2 Multimérica-adjuvante produziram reconhecimento superior e com diferença estatística quando comparados aos soros dos grupos controles. Entre os grupos, apesar dos soros ZZ-L2 Multimérica e ZZ-L2 Multimérica-adjuvante apresentarem uma tendência de reconhecimento superior, não foi possível observar diferenças estatísticas entre eles (figura 22B).

Os soros dos grupos imunizados com as proteínas multimérica reconheceram as proteínas L2 HPV 16 e L2 HPV 18, ainda que alguns soros não tenham apresentado reatividade detectável. De forma geral, o reconhecimento da proteína L2 HPV 16 pelos soros foi mais intenso quando comparado ao reconhecimento da proteína L2 HPV 18.

Figura 22. Reatividade cruzada dos soros de camundongos BALB/c imunizados por via subcutânea com as proteínas recombinantes.. (A) Títulos dos soros dos grupos imunizados com as proteínas L2 Multimérica e ZZ L2 Multimérica na presença e ausência de adjuvante (hidróxido de alumínio e monofosforil lipídio A), o coating foi realizado com a proteína L2 HPV 16. (B) Títulos dos soros dos grupos imunizados com as proteínas L2 Multimérica e ZZ L2 Multimérica na presença e ausência de adjuvante (hidróxido de alumínio e monofosforil lipídio A), o coating foi realizado com a proteína L2 HPV 18. (*) diferença significativa ($p < 0,05$), (**) diferença significativa ($p < 0,01$) para o teste Mann-Whitney. ND: absorvância não detectada.

4.10 Análise funcional do domínio ZZ

Para verificar se a reduzida produção de anticorpos induzidas pelos antígenos quando fusionados o domínio ZZ estava correlacionada à ausência de funcionalidade do domínio ZZ, as proteínas foram submetidas à análise funcional do domínio ZZ através da capacidade de ligação a IgG de coelho em ensaio de ELISA (figura 23). Para comparação foram utilizadas as proteínas sem fusão, além da proteína A de *Staphylococcus aureus* utilizada como controle positivo e a proteína recombinante PspA2 (proteína de *Streptococcus pneumoniae*) utilizada como controle negativo. A interação da fusão domínio ZZ das proteínas com anticorpos IgG foi detectada nas três proteínas, embora com diferentes valores de absorvâncias para cada

proteína. As proteínas ZZ-L2 HPV 16 e ZZ-L2 Multimérica apresentaram uma interação com anticorpos IgG com valores semelhantes à apresentada pela proteína A e superior à do domínio ZZ. A proteína ZZ-L2 HPV 18 apresentou uma interação de intensidade menor em comparação com as intensidades obtidas tanto para proteína A quanto para o domínio ZZ. Estes dados mostram que o domínio ZZ das fusões das proteínas ZZ-L2 estavam funcionais.

Figura 23. Análise funcional da fusão domínio ZZ-proteína. As proteínas fusionadas, não fusionadas e proteínas controles (Proteína A de *Staphylococcus aureus* e proteína recombinante PspA2 de *Streptococcus pneumoniae* produzida em *E. coli*) foram adsorvidas em placa de Elisa. Os asteriscos representam diferença estatística para o teste Mann-Whitney ($p < 0,05$). ND: absorbância não detectada.

4.11 Soro-neutralização de pseudovírus com soros anti-L2

A manutenção das células 293 TT, a produção de pseudovírus e o ensaio de neutralização foram realizados pela equipe do laboratório do Profº Drº Richard Roden no Departamento de Patologia da Johns Hopkins University. Para testar a indução de anticorpos neutralizantes gerados pela imunização com as proteínas fusionadas e não fusionadas foram realizados ensaios de neutralização e de neutralização cruzada contra pseudovírus com todos os soros obtidos no ensaio de imunização. Adicionalmente foram testados os potenciais de

neutralização cruzada contra tipos de pseudovírus não incluídos na proteína multimérica, como os tipos HPV 31 e HPV 45 (tabela 7).

Tabela 7. Títulos de soroneutralização contra pseudovírus, dos soros gerados pela imunização de camundongos BALB/c por via subcutânea. ND: não detectado.

Soros	Título de Neutralização contra pseudovírus do tipo				
	HPV 45	HPV58	HPV 18	HPV31	HPV 16
L2 HPV 16	ND	ND	ND	ND	100
ZZ L2 HPV 16	ND	ND	ND	ND	ND
L2 HPV 16 + Alum + MPLA	ND	50	100	ND	800
ZZ L2 HPV 16 + Alum + MPLA	800	ND	400	ND	ND
L2 HPV 18	100	ND	400	ND	50
ZZ L2 HPV 18	50	ND	100	100	ND
L2 HPV 18 + Alum + MPLA	200	ND	200	100	ND
ZZ L2 HPV 18 + Alum + MPLA	ND	ND	50	ND	ND
L2 Multimérica	ND	ND	ND	ND	ND
ZZ L2 Multimérica	ND	ND	ND	ND	ND
L2 Multimérica + Alum + MPLA	ND	50	ND	ND	50
ZZ L2 Multimérica + Alum + MPLA	ND	ND	ND	ND	ND
ZZ	ND	ND	ND	ND	ND
Alum + MPLA	ND	ND	ND	ND	ND

Entre os soros dos grupos imunizados com as proteínas L2 HPV 16 e ZZ L2 HPV 16, respectivamente, o *pool* dos soros dos animais imunizados com a proteína sem fusão apresentou neutralização somente contra pseudovírus homólogo (HPV 16), não foi possível detectar ação neutralizante utilizando o *pool* dos soros dos animais imunizados com a proteína fusionada ao domínio ZZ. Quando os adjuvantes (hidróxido de alumínio/MPLA) foram adicionados às mesmas proteínas, a ação neutralizante foi ampliada aos pseudovírus heterólogos, caracterizando a ação de neutralização cruzada. O *pool* dos soros do grupo

imunizado com a proteína L2 HPV 16 e adjuvantes, neutralizou os pseudovírus dos tipos 16, 18, 58. Apesar de apresentar neutralização cruzada contra os pseudovírus dos tipos 18 e 45, o soro do grupo imunizado com a proteína ZZ L2 HPV 16 e com adjuvantes não apresentou nível de neutralização detectável contra o pseudovírus do tipo 16 (homólogo).

Os soros dos animais imunizados com as proteínas L2 HPV 18 e ZZ L2 HPV 18 apresentaram neutralização contra o pseudovírus homólogo e também apresentaram neutralização contra pseudovírus heterólogos dos tipos 16 e 45 (soro do grupo imunizado com a proteína L2 HPV 18) e contra os tipos 31 e 45 (soro do grupo imunizado com a proteína fusionada). Com a adição dos adjuvante nas respectivas formulações de proteínas utilizadas na imunização (L2 HPV 18 com adjuvante, ZZ L2 HPV 18 com adjuvantes), os soros imunes mantiveram a capacidade de neutralização contra o pseudovírus tipo 18, embora a capacidade de neutralização cruzada do *pool* de soros dos animais imunizados com a proteína fusionada ao domínio ZZ não tenha sido detectada. Ao contrário, o soro imune do grupo que recebeu a formulação L2 HPV 18 e adjuvante foi capaz de neutralizar os pseudovírus heterólogos dos tipos 31 e 45.

Os soros obtidos a partir da imunização com a proteína L2 Multimérica e ZZ L2 Multimérica, não apresentaram níveis de neutralização ou neutralização cruzada detectáveis. A presença dos adjuvantes nas formulações de ambas as proteínas L2 Multimérica e ZZ L2 Multimérica foi capaz de ampliar a capacidade neutralizante apenas para o soro do grupo imunizado com L2 Multimérica e adjuvante, que apresentou neutralização contra os pseudovírus dos tipos 16 e 58.

Apesar dos níveis de neutralização de alguns soros não terem sido detectados, devido ao título apresentar-se inferior a 1:50, nos demais soros os títulos de neutralização e neutralização cruzada foram detectados ainda que em baixos níveis, comprovando que apesar

de fraca, uma indução de anticorpos neutralizantes foi gerada através do ensaio de imunização.

De uma forma geral, a associação dos antígenos com a mistura adjuvante melhorou a resposta de anticorpos contra os antígenos homólogos e heterólogos. A fusão genética com o domínio ZZ parece ter diminuído a resposta imune aos antígenos homólogos e heterólogos.

4.12 Indução de anticorpos anti-L2 produzida pela imunização conjunta com as proteínas L2 HPV 16, L2 HPV 18 e L2 Multimérica

Em função dos resultados obtidos no item anterior, um segundo ensaio de imunização foi realizado, no qual uma mistura das proteínas L2 HPV 16, L2 HPV 18 e L2 Multimérica foram administradas conjuntamente na mesma formulação vacinal. Neste ensaio foi avaliado o potencial de indução de anticorpos anti-L2 utilizando diferentes adjuvantes na formulação vacinal (tabela 8), assim como a manutenção a longo termo de anticorpos anti-L2 produzidos pela imunização. Neste novo ensaio, a associação com a mistura Hidróxido de Alumínio + Monofosforil lipídio A como combinação adjuvante foi mantida por terem apresentados os melhores resultados. Além desta combinação, foi avaliado o uso do adjuvnte de Freund (considerado o padrão ouro de mistura adjuvante) e também a vacina celular de *Pertussis* contendo baixa concentração de LPS (wP_{low}). Neste último caso, poderia conter a maioria dos PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*) necessários para uma atividade adjuvante ideal para a vacina proposta. Para este ensaio foram utilizados 7 grupos com 6 animais cada, sendo administradas 4 doses através da via intraperitoneal. A 4ª dose não foi administrada nos grupos proteínas-adjuvante de Freund e adjuvante de Freund. A estratégia de imunização utilizada neste segundo ensaio está demonstrada na figura 24.

Figura 24. Representação esquemática da estratégia de imunização vacinal conjunta.

Os soros obtidos na terceira sangria foram utilizados para análise de indução de anticorpo IgG anti-L2 (Figura 25) através de ELISA com três diferentes condições de *coating*: proteína L2 HPV 16, proteína L2 HPV 18 e proteína L2 Multimérica. A tabela 8 apresenta a titulação do *pool* dos soros de 4 grupos amostrais deste ensaio. Nos grupos controles a absorbância não foi detectável.

O grupo imunizado com as proteínas em conjunto com hidróxido de alumínio e monofosforil lipídio A obteve os maiores níveis de anticorpos anti-L2 tanto quando a proteína L2 HPV 16 (1:409600) foi adsorvida à placa de ELISA quanto para a proteína L2 HPV 18 (1:409600) (tabela 8 e figura 25A, 25B). Quando a placa foi adsorvida com a proteína L2 Multimérica, os grupos imunizados com proteína em conjunto com hidróxido de alumínio/monofosforil lipídio A e com proteínas junto com a vacina wP_{low}, apresentaram o mesmo título de anticorpos IgG anti-L2 (1:204800) (tabela 8 e figura 25C).

Figura 25. Titulação de anticorpos IgG anti-L2 após a imunização de camundongos BALB/c por via intraperitoneal com as proteínas L2 HPV 16, L2 HPV 18 e L2 Multimérica. O *pool* dos soros de 6 animais de cada grupo. (A) *Coating* utilizando a proteína L2 HPV-16. (B) *Coating* utilizando a proteína L2 HPV-18. (C) *Coating* utilizando a proteína L2 Multimérica.

Tabela 8. Título de anticorpos IgG anti-L2 dos soros gerados pela imunização de camundongos BALB/c por via intraperitoneal com as proteínas L2 HPV 16, L2 HPV 18 e L2 Multimérica.

Grupos	Coating L2 HPV 16	Coating L2 HPV 18	Coating L2 Multimérica
Proteínas	1:25600	1:6400	1:6400
Proteínas + Alum + MPLA	1:409600	1:409600	1:204800
Proteínas + wP _{low}	1:204800	1:204800	1:204800
Proteínas + Adjuvante Freund	1:51200	1:102400	1:12800

Podemos perceber que os dados mostraram que a mistura alumínio/monofosforil lipídio A parece ter sido a melhor combinação de adjuvante, seguida pela wP_{low}. Os resultados obtidos com alumínio/monofosforil lipídio A ou wP_{low} foram superiores ao uso do Adjuvante de Freund, considerando o padrão ouro do adjuvante.

Os soros individuais também foram utilizados em ensaios de ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-L2, sendo novamente realizadas três condições de *coating* (figura 26). Na condição em que a proteína L2 HPV 16 foi adsorvida à placa de ELISA (figura 26A) observou-se que a adição dos diferentes adjuvantes promoveu um aumento estatisticamente significativo na indução de anticorpo IgG (tabela 9), mas entre os grupos que receberam as proteínas junto com os diferentes adjuvantes não houve diferença nos níveis de anticorpos induzidos após a imunização.

Figura 26. Indução de IgG anti-L2 após imunização de camundongos BALB/c por via intraperitoneal. Soros individuais dos grupos imunizados com proteínas recombinantes, proteínas + hidróxido de alumínio + MPLA, proteínas + wP_{low}, proteínas + adjuvante de Freund. (A) Títulos de IgG anti-L2 utilizando como *coating* a proteína L2 HPV 16, (B) Títulos de IgG anti-L2 utilizando como *coating* a proteína L2 HPV 18, (C) Títulos de IgG anti-L2 utilizando como *coating* a proteína L2 Multimérica. (*) diferença significativa ($p < 0,05$), (**) diferença significativa ($p < 0,01$) para o teste Mann-Whitney. ND: absorbância não detectada.

Tabela 9. Valores de P_{value} obtidos pelo teste Mann-Whitney para comparação par-a-par dos títulos de IgG anti-L2 com *coating* de proteína L2 HPV 16. Os números marcados em vermelho representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Coating L2 HPV 16				
	Proteínas	Proteínas + Alum + MPLA	Proteínas + wP _{low}	Proteínas + Freund
Proteínas				
Proteínas + Alum + MPLA	0,0117			
Proteínas + wP _{low}	0,0255	0,0836		
Proteínas + Freund	0,0475	0,0581	0,4315	

Tabela 10. Valores de P_{value} obtidos pelo teste Mann-Whitney para comparação par-a-par dos títulos de IgG anti-L2 com *coating* de proteína L2 HPV 18. Os números marcados em vermelho representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Coating L2 HPV 18				
	Proteínas	Proteínas + Alum + MPLA	Proteínas + wP _{low}	Proteínas + Freund
Proteínas				
Proteínas + Alum + MPLA	0,003			
Proteínas + wP _{low}	0,0041	0,0149		
Proteínas + Freund	0,0036	0,0052	0,1422	

Tabela 11. Valores de P_{value} obtidos pelo teste Mann-Whitney para comparação par-a-par dos títulos de IgG anti-L2 com *coating* de proteína L2 Multimérica. Os números marcados em vermelho representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Coating L2 Multimérica				
	Proteínas	Proteínas + Alum + MPLA	Proteínas + wP _{low}	Proteínas + Freund
Proteínas				
Proteínas + Alum + MPLA	0,0032			
Proteínas + wP _{low}	0,0032	1		
Proteínas + Freund	0,0074	0,0039	0,0031	

Quando a proteína L2 HPV 18 foi adsorvida à placa de ELISA (figura 26B), pôde ser observado aumento na indução de anticorpos anti-L2 com a adição de adjuvantes às proteínas (tabela 10). Em relação aos grupos com adjuvantes, aquele em que os adjuvantes utilizados foram hidróxido de alumínio e o monofosforil lipídio A, apresentou títulos de anticorpos significativamente maiores que os demais grupos.

Já na condição utilizando a proteína L2 Multimérica adsorvida à placa de ELISA (figura 26C), similarmente aos casos anteriores, houve aumento significativo na indução de anticorpos anti-L2 com a adição dos adjuvantes às proteínas. Também foram observadas diferenças significativas entre os grupos que receberam adjuvantes, com o grupo com adjuvante de Freund apresentando os menores níveis de IgG anti-L2 induzidos (tabela 11).

Além da indução de IgG total anti-L2 foi analisada indução para subtipos de anticorpos IgG (IgG1 e IgG2a) através de ELISA sendo novamente realizadas três condições de *coating* (figura 27). Para cada grupo foi calculada a relação dos subtipos IgG1/IgG2a a partir do logaritmo da média dos títulos obtidos individualmente.

Figura 27. Indução dos subtipos de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-L2 após imunização de camundongos BALB/c por via intraperitoneal. A relação entre IgG1 e IgG2a é apresentada para os soros individuais dos grupos imunizados com proteínas recombinantes, proteínas + hidróxido de alumínio + MPLA, proteínas + wP_{low}, proteínas + adjuvante de Freund. (A) Títulos dos subtipos de IgG utilizando como *coating* a proteína L2 HPV 16, (B) Títulos dos subtipos de IgG utilizando como *coating* a proteína L2 HPV 18, (C) Títulos dos subtipos de IgG utilizando como *coating* a proteína L2 Multimérica. O número acima da coluna de cada grupo representa a relação IgG1/IgG2a do log da média dos títulos obtidos. ND: absorvância não detectada.

Tabela 12. Valores de P_{value} obtidos pelo teste Mann-Whitney para comparação par-a-par dos títulos dos subtipos IgG1 e IgG2a com o *coating* de proteína L2 HPV 16. Os valores marcados em vermelho representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Coating L2 HPV 16				
		IgG1		
	Grupo Proteínas	Grupo Proteínas + Alum + MPLA	Grupo Proteínas + wPlow	Grupo Proteínas + Freund
Grupo Proteínas	0,3656			
IgG2a Grupo Proteínas + Alum + MPLA		0,0063		
Grupo Proteínas + wPlow			0,0151	
Grupo Proteínas + Freund				0,0061

Tabela 13. Valores de P_{value} obtidos pelo teste Mann-Whitney para comparação par-a-par dos títulos dos subtipos IgG1 e IgG2a com o *coating* de proteína L2 HPV 18. Os valores marcados em vermelho representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Coating L2 HPV 18				
		IgG1		
	Grupo Proteínas	Grupo Proteínas + Alum + MPLA	Grupo Proteínas + wPlow	Grupo Proteínas + Freund
Grupo Proteínas	0,4976			
IgG2a Grupo Proteínas + Alum + MPLA		0,0039		
Grupo Proteínas + wPlow			0,101	
Grupo Proteínas + Freund				0,0044

Tabela 14. Valores de P_{value} obtidos pelo teste Mann-Whitney para comparação par-a-par dos títulos dos subtipos IgG1 e IgG2a com o *coating* de proteína L2 Multimérica. Os valores marcados em vermelho representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Coating L2 Multimérica				
		IgG1		
	Grupo Proteínas	Grupo Proteínas + Alum + MPLA	Grupo Proteínas + wPlow	Grupo Proteínas + Freund
Grupo Proteínas	0,0863			
IgG2a Grupo Proteínas + Alum + MPLA		0,0117		
Grupo Proteínas + wPlow			0,1154	
Grupo Proteínas + Freund				0,0022

Os perfis para os subtipos IgG1 e IgG2a obtidos a partir das três condições de *coating* foram basicamente semelhantes (figura 27). Em relação ao grupo imunizado somente com proteínas, os títulos de IgG1 e IgG2a obtidos não apresentaram diferença estatística e estavam balanceados apresentando uma relação IgG1/IgG2a próxima a 1, em todas as três condições analisadas.

Os grupos imunizados com proteínas adicionadas aos adjuvantes apresentaram pequenas diferenças. No grupo cujo adjuvante foi a vacina wP_{low}, o perfil de anticorpos IgG1 e IgG2a foi semelhante ao caso anterior, com níveis balanceados entre os subtipos e relação de subtipos próxima a 1, com exceção de quando a proteína L2 HPV 16 foi adsorvida à placa de ELISA, no qual houve diferença significativa (tabela 12) entre os títulos dos subtipos, com o subtipo IgG2a apresentando-se em nível mais elevado (figura 27A).

Nos grupos que receberam a formulação conjunta de proteínas com hidróxido de alumínio/monofosforil lipídio A e adjuvante de Freund, os perfis para os subtipos IgG1 e IgG2a obtido foram semelhantes, com o subtipo IgG1 em nível significativamente mais elevado em comparação com o subtipo IgG2a (tabela 12). Com nível mais elevado de IgG1, o valor da relação IgG1/IgG2a para esses grupos foi superior a 1.

A sangria final foi realizada 4 meses após a administração da última dose (4ª dose). A partir do *pool* dos soros obtidos, foi analisada a presença de anticorpos anti-L2 através de ensaio de ELISA (figura 28). Como observado no gráfico, o grupos imunizados com formulação conjunta de proteínas juntamente com hidróxido de alumínio/ monofosforil lipídio A e wP_{low} mantiveram altos títulos de anticorpos anti-L2 (títulos entre 1:51200 e 1:102400) enquanto nos outros grupos houve redução do título de anticorpos anti-L2. Esse resultado indica que o uso dos dois adjuvantes (hidróxido de alumínio/monofosforil lipídio A e wP_{low}) produzem uma indução de anticorpos anti-L2 que se mantém estáveis por tempo prolongado.

Figura 28. Comparação dos títulos de anticorpos IgG anti-L2 após imunização de camundongos BALB/c por via intraperitoneal com vacina conjunta. Foi utilizado o *pool* dos soros da 3ª sangria e da sangria final (4 meses após a última imunização) de cada grupo. (A) *Coating* com a proteína L2 HPV 16, (B) *Coating* com a proteína L2 HPV 18, (C) *Coating* com a proteína L2 Multimérica.

4.13 Análise da reatividade dos soros obtidos na imunização com vacina conjunta, contra cada proteína recombinante

Os soros obtidos na terceira sangria do segundo ensaio de imunização (imunização com formulação conjunta de proteínas) foram utilizados para realização de Western blot para caracterização da reatividade contra as proteínas presentes na vacina conjunta. Cada soro foi diluído proporcionalmente de acordo com o título de IgG anti-L2, obtido através de ensaio de ELISA com um *coating* com a mistura de proteína (L2 HPV 16, L2 HPV 18, L2 Multimérica), em relação ao soro do grupo imunizado sem adjuvantes (grupo proteínas). A proteína recombinante PspA4 de *Streptococcus pneumoniae* foi utilizada como controle negativo.

A figura 29 mostra que houve reconhecimento das três proteínas, presentes na formulação administrada, pelos soros dos grupos experimentais. A utilização dos diferentes adjuvantes gerou um padrão de reconhecimento específico para cada proteína, sendo mais intenso o reconhecimento das proteínas L2 HPV 18 e L2 Multimérica em comparação ao da proteína L2 HPV 16 que foi menos intenso em todas as condições. Nos grupos que receberam como adjuvante wP_{low} e adjuvante de Freund o reconhecimento das proteínas L2 HPV 18 e L2 Multimérica foram opostos, sendo mais intenso o reconhecimento da proteína L2 Multimérica pelo soro anti-proteínas-wP_{low} e da proteína L2 HPV 18 pelo soro anti-proteínas-adjuvante de Freund.

Não houve reconhecimento das proteínas pelos soros dos grupos que receberam apenas os adjuvantes (hidróxido de alumínio/monofosforil lipídio A, wP_{low}, adjuvante de Freund) e a proteína recombinante PspA4 foi reconhecida somente pelo soro anti-PspA4 produzido em camundongo.

Portanto, a imunização com a vacina conjunta induz produção de anticorpos capazes de amplo reconhecimento, reagindo contra as diferentes proteínas da formulação vacinal e que

apresentam reatividade de intensidade modulada dependendo do adjuvante utilizado por cada uma das formulações.

Figura 29. Western-blot da análise da reatividade do *pool* de soros de camundongos BALB/c imunizados por via intraperitoneal. M: Marcador de massa molecular, foram aplicados 20 ng das proteínas L2 HPV 16, L2 HPV 18, L2 Multimérica, PspA4 (proteína de *Streptococcus pneumoniae*).

5 Discussão

Em vista da alta incidência do câncer cervical, que é causado pelo Papilomavírus Humano em virtualmente todos os casos, a utilização de uma vacina como método de prevenção da infecção tem um grande potencial no combate a essa doença, sobretudo se a abrangência e eficácia do estabelecimento de um programa nacional de vacinação forem consideradas. O desenvolvimento de uma vacina nacional viabilizaria o declínio significativo do número de casos de câncer cervical e mortalidade causados pelo vírus, além de diminuir os gastos do governo com o tratamento da doença.

Em países como Austrália, Suécia e Inglaterra, que já adotaram as vacinas contra o HPV em seus programas nacionais de imunização, foi documentado um declínio significativo na incidência dos casos de verrugas anogenitais após a vacinação (Donovan et al., 2011; Read et al., 2011; Leval et al., 2012).

Estudos de custo-efetividade da imunização com as vacinas bivalente e quadrivalente em conjunto com o rastreamento através de exame Papanicolaou no Brasil relatam que a combinação destas estratégias, com uma cobertura de vacinação de 70% e com valor total das três doses da vacina de US\$ 25,00, promoveria uma redução do risco de câncer cervical em cerca de 60%, além de apresentar uma estratégia com custo/efetividade viável para implementação no país (Goldie et al., 2007; Vanni et al., 2012).

O trabalho que desenvolvemos faz parte de um amplo projeto em andamento no Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan que visa o desenvolvimento de uma vacina profilática de baixo custo contra o Papilomavírus Humano. Neste trabalho, avaliamos a capacidade de produção de candidatos vacinais baseados nas duas proteínas do capsídio viral, a L1 e a L2. O desenvolvimento de um novo sistema de expressão e purificação da proteína L1 recombinante objetiva a produção de VLPs, constituintes das vacinas profiláticas utilizadas com sucesso atualmente. Por outro lado, também produzimos e avaliamos

candidatos vacinais compostos por proteínas recombinantes baseadas na proteína minoritária do capsídio viral, a proteína L2.

Parte A – Produção e purificação de VLPs da proteína L1

Diversas estratégias alternativas para a produção e o desenvolvimento de uma vacina profilática têm sido avaliadas, baseadas tanto em sistemas de expressão procarióticos (Aires et al., 2006; Cho et al., 2007; Jagu et al., 2009; Maciag et al., 2009; Baek et al., 2012) como eucarióticos (Bazan et al., 2009; Hanumantha Rao et al., 2011; Waheed et al., 2011). A produção de proteínas heterólogas em leveduras tornou-se uma das principais plataformas biotecnológicas por proporcionar as vantagens de fácil manipulação genética, rápido crescimento em cultura, fermentação em alta densidade (150g/L) e capacidade de realizar modificações pós-traducionais. Além disso, as leveduras são organismos seguros, não são patogênicos ou pirogênicos, e apresentam menor risco de contaminação por patógenos humanos e vírus (Gellissen, 2000; Gellissen et al., 2005).

Apenas um número limitado de leveduras possui a capacidade de fermentar até altas densidades em meios de cultura simples e de baixo custo. As leveduras metilotróficas fazem parte desse grupo. Elas podem utilizar metanol como fonte única de carbono, pois apresentam um conjunto de enzimas metabolizadoras de metanol. Entre essas, incluem-se *H. polymorpha* (*Pichia angusta*), *Pichia pastoris*, *Candida boidinii* e *Pichia methanolica* (Gellissen, 2000), sendo que a espécie *Pichia pastoris* tem mostrado um potencial promissor para aplicação biotecnológica. Diversas proteínas já foram expressas utilizando esta espécie de levedura levando a um rendimento de expressão variando de 1g/L a mais de 10 g/L (Higgins e Cregg, 1998; Cereghino et al., 2002). Como o desenvolvimento de um novo sistema de expressão de L1 recombinante precisa ser economicamente viável, baseamos nossas estratégias de produção desta proteína utilizando leveduras metilotróficas do gênero *Pichia*. As duas

estratégias utilizadas diferenciam-se pelo tipo de vetor utilizado (epissomal ou integrativo) em função dos objetivos distintos.

O clone de *Pichia pastoris* que utilizamos inicialmente continha um vetor epissomal com o gene L1 (pPICHOLI/L1) inserido, e que mostrou ser capaz de produzir a proteína L1 recombinante. Vale ressaltar que o clone já havia sido usado com sucesso em projeto anterior (Bazan, 2007). Na análise das preparações obtidas ao final da etapa de purificação com a resina Heparina-Sepharose (figura 8), a fração correspondente ao não adsorvido à resina apresentou uma significativa presença da proteína L1. Nas frações da eluição, foram observadas bandas imunoreativas com massa correspondente à proteína L1 e também com massas moleculares inferiores. Já a análise do perfil das proteínas nas membranas coradas com vermelho de Ponceau evidenciou a presença de possíveis contaminantes não-imunoreativos, cujas massas moleculares apresentam-se inferiores às da proteína L1.

Os grupos de Rommel e Wang confirmaram experimentalmente a dependência de estrutura superficial correta das VLPs para interação com heparina (Rommel et al., 2005; Wang et al., 2005), portanto, a presença de VLPs não estruturadas corretamente – capsômeros, monômeros - na amostra introduzida na resina poderia explicar a presença da proteína L1 observada na fração não adsorvida. Outra possibilidade para a presença da proteína na fração não adsorvida à resina seria a introdução de uma quantidade de proteína L1 que ultrapassou a capacidade máxima de retenção da resina. Em trabalho de produção de VLPs utilizando os métodos de cromatografia de troca iônica e de afinidade, as capacidades máximas de ligação da proteína L1 às resinas foi de 2,39 e 1,88 mg/mL de resina, respectivamente (Lai e Middelberg, 2002). De fato, no nosso caso, a análise preliminar da quantidade de proteína L1 expressa por 1 litro de cultura indicou que a expressão obtida supera, em média, 9 vezes a quantidade de proteína que poderia ser adsorvida por 5 mL de resina (quantidade que usamos). Embora a massa de L1 expressa tenha sido calculada com

pouca precisão, devido à limitação da quantidade de proteína L1 disponível para a produção de uma curva-padrão para a análise densitométrica, os valores calculados superam em muitas vezes a capacidade de retenção da resina, sugerindo que teríamos um excesso de proteína L1 mesmo com o uso de uma análise mais precisa.

Alguns grupos descreveram a ocorrência de fragmentação da proteína L1 após os processos de expressão da proteína (Kirnbauer et al., 1992; Aires et al., 2006) e purificação (Cook et al., 1999; Lai e Middelberg, 2002). Portanto, a presença de bandas imunoreativas de massa molecular inferior à da proteína L1 poderia possivelmente ser um produto de degradação, provavelmente derivada da ação de proteases e que se manteve presente mesmo após a etapa de purificação por ainda reter propriedades similares às da proteína intacta.

As VLPs são consideradas estruturas sujeitas a instabilidades tendendo a ser adsorvida a superfícies dos recipientes de estocagem, permitindo a formação de agregados protéicos. A utilização de um agente estabilizador como o surfactante não iônico polissorbato 80 (Tween 80), gera um ambiente onde se minimizam tanto as instabilidades estruturais quanto a sua tendência à adsorção das VLPs (Shi et al., 2005), diminuindo a perda de proteína devido a esses fenômenos. No entanto, apesar da utilização do Tween 80 seguindo o protocolo anteriormente estabelecido (Bazan et al., 2009), ao final da purificação ainda foram detectadas bandas imunoreativas com massa molecular superior ao da proteína L1, indicando uma possível presença de agregação.

Existem outros aspectos que devem ser levados em consideração a respeito deste protocolo de produção de VLPs, como a utilização do vetor episomal. O uso de vetores episomais pode gerar instabilidade nas leveduras transformantes, pois necessita de pressão seletiva para manutenção de sua integridade (Gellissen et al., 2005; Boer et al., 2007). Além disso, o antibiótico requerido, a zeocina, tem efeito citotóxico e possui alto custo. Isto torna a

utilização de clones com vetores episomais de custo proibitivo e incompatível para os processos em planta de produção.

Em seguida, foi realizada uma tentativa de aperfeiçoamento do protocolo de purificação anterior. Nesta nova estratégia, utilizamos um clone de *Pichia pastoris* contendo o vetor pINTA/L1 integrado em seu genoma, além de incluirmos alterações metodológicas ao processo de purificação. Os vetores integrados no genoma do hospedeiro são mitoticamente estáveis (Gellissen et al., 2005; Boer et al., 2007) e, portanto, não necessitam de pressão seletiva contínua para a sua manutenção. Dessa forma, o uso do clone de *Pichia pastoris* com vetor integrado em seu genoma elimina o uso do antibiótico zeocina diminuindo conseqüentemente o custo de produção, e viabilizando sua utilização na escala industrial de produção de VLPs. Quanto à purificação, bandas imunoreativas correspondentes à massa molecular da proteína L1 foram observadas no produto final (figura 9).

Ao contrário do resultado obtido com o protocolo anterior, não foram detectadas bandas imunoreativas com massa molecular diferente daquela esperada para a proteína L1, sugerindo que os fenômenos de agregação e degradação da proteína foram minimizados em consequência das alterações metodológicas realizadas. A agregação foi eliminada provavelmente pelo aumento na concentração de polissorbato 80 utilizado, uma vez que a utilização do surfactante proporciona um ambiente no qual a tendência à agregação da proteína é minimizada. Nesse ambiente, as VLPs são mais estáveis e tenderiam a interagir menos com as outras moléculas presentes na amostra. Similarmente, o aumento na concentração de polissorbato 80 e a coleta das eluições em tubos de poliestireno (cuja superfície é menos reativa) provavelmente promoveram uma menor perda de VLPs devido à interação com superfícies. Por outro lado, a degradação da proteína L1 foi minimizada após aumento da concentração de PMSF utilizado, indicando que a degradação anteriormente

observada ocorria majoritariamente após o processo de lise celular, provavelmente devido à ação de serinoproteases cuja inibição teria sido promovida pelo PMSF.

Apesar das modificações terem produzido um melhor protocolo de purificação, limitando as bandas imunoreativas a somente uma banda de massa compatível com a proteína L1, análise das membranas coradas com Ponceau permitiu a visualização de uma banda com massa molecular inferior à da proteína L1, indicando que, ao final da purificação, as preparações de VLPs ainda encontravam-se semi-purificadas. Estes resultados são similares aos dados apresentados por Kim e colaboradores, que mostraram, durante o desenvolvimento de um método para remoção de contaminantes, que frações purificadas por cromatografia catiônica ou com heparina continham várias proteínas contaminantes que não foram eficientemente removidos e que exigiam a realização de uma etapa de cromatografia adicional para remoção daqueles contaminantes (Kim et al., 2009).

Os clones de *Pichia pastoris* com vetor episomal desenvolvidos pelo nosso laboratório apresentaram uma expressão da proteína L1 de aproximadamente 20 mg/L. Os clones de *Pichia pastoris* contendo o vetor integrativo apresentaram expressão média superior aos clones do vetor episomal, aproximadamente 25 mg/L, indicando que a possível presença de múltiplas cópias do cassete de expressão no genoma da levedura tenha beneficiado a expressão da proteína L1. Efeitos de dosagem gênica na expressão de proteínas utilizando o sistema de *Pichia pastoris* têm sido descritos (Mansur et al., 2005; Norden et al., 2011), onde o número de cópias integradas reflete diretamente no nível de expressão alcançado. Assim, o elevado nível de expressão obtido pelos clones com vetor integrativo pode ter sido uma consequência do efeito de dosagem gênica nos clones, uma vez que ambos os sistemas utilizam o mesmo promotor para a indução da proteína L1. Apesar disso, a correlação apropriada sobre o efeito da dosagem gênica nos clones utilizados durante a expressão da

proteína L1 requer a realização de um ensaio de análise de quantificação do número de cópias integradas na levedura transformante, que ainda não foi realizado.

Os níveis de expressão da proteína L1 obtidos com os dois tipos de vetores mostraram-se superiores aos obtidos a partir de outros sistemas de expressão, como *Saccharomyces cerevisiae* e *Bacillus subtilis* (Cook et al., 1999; Park e Kim, 2008; Baek et al., 2012). Além disso, os maiores níveis de expressão encontrados nos clones com vetor integrativo os tornam clones mais apropriados como possíveis clones produtores para produção de VLPs em grande escala.

Para uma produção ser bem sucedida é necessário que os processos envolvidos na produção e purificação da proteína estejam padronizados, que o clone produtor seja estável e que possua um nível considerável de expressão, resultando ao final, em um alto rendimento da proteína purificada. Além disso, o ideal é que o processo total seja de baixo custo, principalmente quando se pretende produzir a vacina em instituto público e com verba proveniente do Estado, para ser nacionalmente distribuída.

A metodologia de produção das VLPs proposta neste trabalho mostrou-se eficiente em relação à quantidade de proteína expressa, porém, a etapa de purificação ainda não obteve a otimização desejável, sendo produzidas preparações de VLPs semi-purificadas. Diversos processos de purificação de VLPs que envolvem sucessivas etapas, como realização de ultracentrifugação, precipitação de proteínas contaminantes por sulfato de amônio e uso de mais de uma cromatografia, têm sido descritos (Park e Kim, 2008; Hanumantha Rao et al., 2011; Kim et al., 2012) e originam VLPs com alto grau de pureza. No entanto, este projeto foi interrompido, uma vez que o Instituto Butantan iniciou um processo de negociação com a Merck Sharp&Dohme para a produção da vacina quadrivalente de HPV através de um acordo de transferência de tecnologia.

Parte B – Produção de candidatos vacinais baseados na proteína L2

Na segunda parte do projeto, foram produzidos candidatos vacinais baseados na proteína minoritária do capsídio viral, a L2, visando avaliar a sua utilização como uma vacina profilática alternativa às vacinas compostas por VLPs da proteína L1. A utilização desta proteína, de tipos de papilomavírus que infectam animais, como antígeno tem gerado resultados promissores, evidenciando o seu uso como antígeno vacinal. Estudos de imunização de coelhos com peptídeos derivados da proteína L2 e com a porção N terminal da proteína L2 relataram a capacidade destes antígenos de promover proteção cruzada contra desafio com CRPV (*cottontail rabbit papillomavirus*) e ROPV (*rabbit oral papillomavirus*) (Embers et al., 2002; Gambhira et al., 2007). A imunização com o polipeptídio 1-88 baseado na proteína L2 BPV-1 gerou soro contendo anticorpos de neutralização cruzada contra BPV-1, CRPV, HPV 6, 11, 16, 18 e 31 (Pastrana et al., 2005). De fato, algumas seqüências específicas presentes na região N terminal da proteína L2 foram definidas como epitopos neutralizantes e encontram-se entre os resíduos 17-36, 20-38, 36-49 e 69-81 (Kawana et al., 2003; Gambhira et al., 2007; Rubio et al., 2009).

A imunização com VLPs da proteína L1 promove a formação de proteção tipo-restrita, proporcionando proteção contra tipos de HPV presentes na vacina e contra tipos filogeneticamente mais próximos como é o caso do HPV 31 e HPV 45 (Smith et al., 2007; Wheeler et al., 2012). Entretanto, a utilização da proteína L2 como estratégia vacinal subverteria a proteção tipo-restrita produzida pelas VLPs, pois a proteção cruzada contra diversos tipos de papilomavírus observada em trabalhos com a região N terminal da proteína L2 sugere que esta região possa ser um antígeno promissor a ser utilizado em uma vacina profilática contra o HPV de maior abrangência (Karanam et al., 2009).

A maior dificuldade encontrada na imunização utilizando a proteína L2 ou peptídeos derivados da proteína é a reduzida intensidade de produção de anticorpos devido à reduzida

imunogenicidade da proteína L2, principalmente quando comparada à imunogenicidade das VLPs da proteína L1 (Karanam et al., 2009). Então, estratégias que promovam o aumento da imunogenicidade de peptídeos baseados na proteína L2 são necessárias para que essas moléculas possam, de fato, ser utilizadas em imunizações.

O uso de proteínas associadas a moléculas de fusão como antígenos contra infecções causadas pelo HPV tem sido avaliado tanto para fins profiláticos quanto terapêuticos. Em relação ao potencial profilático, peptídeos baseados na proteína L2 do HPV 16 quando fusionados à KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanin*), à P2C (dipalmitoil S gliceril cisteína) e à tioredoxina geraram anticorpos de neutralização cruzada, além de protegerem contra desafio (Embers et al., 2002; Alphas et al., 2008; Rubio et al., 2009). Em todos os casos, a molécula fusionada ao antígeno beneficiou significativamente a resposta imune, agindo como um adjuvante.

A produção de proteínas de fusão contendo o adjuvante-antígeno seria uma alternativa para diminuir a complexidade de utilização de uma formulação contendo mistura de várias moléculas de proteínas L2 de diferentes tipos de HPV, assim como para a redução dos custos de produção em escala industrial, pois esse sistema de fusão envolve a produção de molécula híbrida única.

Além disso, a eficiência da proteção gerada pela imunização pode ser melhorada ao se alterar características próprias do antígeno em si. De fato, a utilização de regiões que contenham epitopos neutralizantes da proteína L2 provenientes de diferentes tipos de HPV gerando concatâmeros multivalentes tem se mostrado uma estratégia promissora. A produção e caracterização de alguns tipos de fusão já foram descritas entre eles a 11-200 x 3, 11-88 x 5 e 17-36 x 22 constituídas por seqüências de aminoácidos de diferentes tipos de HPV (Jagu et al., 2009; Jagu et al., 2010) e a 11-88 x 6 baseada em BPV, COPV, CaPV (Jagu et al., 2011).

Todas foram capazes de gerar anticorpos neutralizantes além de promover proteção contra desafio.

Somando-se às vantagens do uso de adjuvantes fusionados e da maximização da resposta imunoprotetora a partir da utilização de concatâmeros, propusemos uma estratégia de produzir proteínas recombinantes derivadas da concatenação de antígenos da proteína L2 do papilomavírus humano. A escolha da utilização do domínio ZZ da proteína A de *Staphylococcus aureus* como antígeno de fusão foi baseada em dados da literatura que sugerem a intensificação da resposta imune quando esse domínio encontra-se fusionado aos antígenos alvo (Sjolander et al., 1990; Leonetti et al., 1998; Zhao et al., 2005). Diferentemente dos dados descritos nos trabalhos de Jagu e colaboradores, que descrevem a inclusão de diferentes tipos de papilomavírus humano no gene do concatâmero, optamos por incluir apenas tipos oncogênicos (Jagu et al., 2009; Jagu et al., 2010) em nossa construção, com o intuito de maximizar a resposta contra os tipos mais frequentemente associados ao câncer de colo de útero. Além disso, nossa proposta também se diferencia devido ao fato de termos adicionado espaçadores compostos pelos aminoácidos glicina e prolina entre a sequência correspondente a cada tipo de HPV oncogênico (Livingston et al., 2002).

No ensaio de imunização realizado, foram administradas cada uma das proteínas recombinantes, na ausência ou na presença de adjuvante. O adjuvante utilizado é semelhante ao utilizado nas vacinas Fendrix[®] e Cervarix[®] (Glaxo Smith&Kline Biologicals, Rixensart, Bélgica), sendo composto por hidróxido de alumínio e monofosforil lipídio A (Giannini et al., 2006). O monofosforil lipídio A (MPLA) representa um adjuvante de baixo custo desenvolvido pelo Instituto Butantan, produzido a partir do lipopolissacarídeo (LPS) da bactéria Gram-negativa *Bordetella pertussis*. Este adjuvante foi testado na formulação da vacina contra influenza, apresentando uma potente ação adjuvante (Quintilio et al., 2009; Precioso et al., 2011).

Ao final dos regimes de imunizações, os *pools* dos soros obtidos foram utilizados para verificação da indução de anticorpos IgG em cada grupo avaliado. Em todos os soros, foram detectados anticorpos IgG contra as proteínas, embora nos soros dos animais imunizados com as proteínas L2 Multimérica e ZZ-L2 Multimérica os títulos de anticorpos tenham sido reduzidos em comparação com as outras proteínas (figura 20). Na análise dos soros individuais, as preparações que continham as proteínas sem a fusão com domínio ZZ exibiram uma tendência a apresentar níveis de anticorpos mais elevados em comparação com as preparações com fusão (figura 21). As preparações com adição dos adjuvantes exibiram tendência similar, com o grupo da proteína fusionada apresentando níveis mais baixos de anticorpos. Os grupos imunizados com as proteínas L2 Multimérica e ZZ-L2 Multimérica geraram uma indução de anticorpos de baixa e similar magnitude, independentemente da presença da fusão ao domínio ZZ ou da adição dos adjuvantes.

Os níveis de anticorpos apresentados pelos soros dos animais imunizados com as proteínas L2 Multimérica e ZZ-L2 Multimérica foram inferiores àqueles apresentados por Jagu e colaboradores (Jagu et al., 2010). Entretanto, deve-se ressaltar que aquelas preparações não estavam livres de endotoxinas, mantidas em baixas concentrações, enquanto nossas preparações de proteínas, ao contrário, estavam com um nível de endotoxinas provavelmente mais reduzido por terem sido previamente submetidas à retirada de LPS (Aida e Pabst, 1990). Sabe-se que as endotoxinas possuem uma elevada reatogenicidade, podendo causar desde inflamações locais a choque séptico, dano a tecidos e morte (Petsch e Anspach, 2000). Este possível efeito de inflamação local pode ter contribuído para uma indução de anticorpos contra a proteína L2 Multimérica de maior intensidade do que a obtida pelo nosso ensaio de imunização (Jagu et al., 2009) mesmo na presença de baixas concentrações.

Em geral, os níveis de anticorpos IgG presentes nos soros provenientes da imunização com a construção Multimérica foram menores do que os níveis detectados após as

imunizações com as proteínas L2 HPV 16, L2 HPV 18, ZZ-L2 HPV 16 e ZZ-L2 HPV 18. Este fato pode estar relacionado com a exposição de um maior número de antígenos ao sistema imune quando os animais são imunizados com as proteínas inteiras. De fato, outros epitopos de anticorpos não neutralizantes presentes na proteína L2 foram caracterizados, como, por exemplo, as seqüências correspondentes aos aminoácidos 89-100, 108-120 e 121-140 (Kawana et al., 2001; Gambhira et al., 2007). No entanto, este dado se refere à quantidade total de anticorpos, sem levar em consideração quais deles são neutralizantes e protetores. Devido ao fato da L2 Multimérica ser composta somente por antígenos que induzem à produção anticorpos protetores, é possível que a população de anticorpos gerados pela imunização com esta proteína seja mais protetora (embora em menor quantidade absoluta) que a população gerada pelas proteínas inteiras.

A avaliação da reatividade cruzada dos soros individuais mostrou que os anticorpos presentes nos soros gerados contra as proteínas L2 Multimérica e ZZ-L2 Multimérica foram capazes de reconhecer as duas proteínas inteiras (L2 HPV 16 e L2 HPV 18), cujos epitopos foram utilizados na proteína multimérica, o que pode ser visualizado na figura 22. No geral, ambos os grupos (com e sem adjuvante) imunizados com a L2 Multimérica apresentaram um nível de reconhecimento similar da L2 HPV 16 e L2 HPV 18, independentemente da presença de fusão ou adjuvantes, sugerindo que os mesmos não interferem na reatividade cruzada dos soros.

Os reduzidos níveis de anticorpos apresentados pelos soros gerados a partir da imunização com as proteínas fusionadas ao domínio ZZ poderia ser uma consequência do domínio ZZ não encontrar-se em sua forma funcional, o que criaria um efeito direto em sua função de intensificar uma resposta imune. A atividade adjuvante do domínio ZZ em fusão é baseada em sua afinidade por imunoglobulinas. Especula-se que o complexo antígeno-domínio ZZ tenha elevada chance de ser reconhecido pelas células apresentadoras de

antígenos que possuem imunoglobulinas na superfície. Uma vez estabelecida a interação antígeno-domínio ZZ com a imunoglobulina, o complexo seria endocitado e, após ser processado, apresentado ao sistema imune. Portanto, uma falta de atividade do domínio ZZ implicaria na ausência do efeito adjuvante da molécula. Por isso, um ensaio de análise funcional desta fusão foi realizado (figura 23) e os resultados indicam que todas as proteínas apresentam domínio ZZ funcional. Portanto, a possibilidade da fraca indução de anticorpos promovida pelas proteínas estar correlacionada à falta de funcionalidade da fusão foi descartada.

Segundo Jagu e colaboradores, a imunização com a proteína L2 tende a produzir uma menor proporção de anticorpos neutralizantes do que a imunização com a proteína L1 (Jagu et al., 2010), assim, a caracterização da presença de anticorpos neutralizantes e do potencial para neutralizar pseudovírus foram verificados através de ensaio de neutralização (Pastrana et al., 2004). Embora alguns dos soros não tenham apresentado soro-neutralização detectável, dentre aqueles em que a detecção foi positiva, observamos neutralização contra pseudovírus homólogos e até mesmo contra pseudovírus heterólogos, ainda que os soros tenham apresentado baixos títulos de neutralização.

Algumas possibilidades acerca de ambas, a ausência de detecção, e a baixa titulação no ensaio de neutralização, podem ser levantadas, como uma reduzida afinidade de ligação entre anticorpos neutralizantes e pseudovírus, ou uma baixa sensibilidade de detecção dos anticorpos neutralizantes anti-L2 do ensaio. De fato, uma reduzida sensibilidade do ensaio de neutralização foi descrita por Day e colaboradores, relacionada ao fato do ensaio ter sido desenvolvido para detecção de anticorpos neutralizantes direcionados à proteína L1 (Day et al., 2012). Este grupo de pesquisadores concluiu que a caracterização apropriada de anticorpos neutralizantes direcionados especificamente à proteína L2 requer um ensaio específico para detecção destes anticorpos, confirmando ou descartando a presença dos

mesmos nos soros gerados pela imunização. É importante destacar que dados de imunização passiva (Day et al., 2010), onde a transferência de pequenas quantidades de soro imune protege camundongos contra desafio experimental, mesmo quando o nível de anticorpos neutralizantes não é detectado em ensaio de neutralização, indicam a ação protetora de anticorpos neutralizantes mesmo quando se encontram em reduzidos níveis no soro, a ponto de serem indetectáveis no ensaio de neutralização.

Ainda deve ser lembrado que, dentro do contexto do uso de adjuvantes, há a possibilidade de que um adjuvante não atue de maneira esperada em todas as formulações nas quais é inserido. Dessa forma, é aberta a possibilidade de que o domínio ZZ associado a antígenos da proteína L2 do HPV não exerça atividade adjuvante para este caso específico. Um exemplo dessa possibilidade foi descrito para o adjuvante MF59 que, ao ser administrado em formulação com antígenos do vírus influenza intensificou a resposta imune contra o vírus (O'Hagan, 2007), embora uma resposta similar não tenha sido observada quando o adjuvante foi administrado com antígenos do herpes simplex (HSV) (Corey et al., 1999). Neste sentido, uma resposta para esta hipótese só poderia ser obtida através da realização de ensaios de imunização passiva ou desafio experimental (Day et al., 2012).

Um ensaio de imunização foi realizado utilizando uma formulação vacinal conjunta que continha os principais antígenos da proteína L2 utilizados anteriormente no ensaio de imunização (L2 HPV 16, L2 HPV 18 e L2 Multimérica), com o intuito de maximizar a chance de proteção aproveitando a eficiência imunológica de cada antígeno. Ainda neste ensaio, foram testadas as propriedades adjuvantes do hidróxido de alumínio e monofosforil lipídio A, vacina celular *Pertussis* low (wP_{low}) e adjuvante de Freund quando presentes na formulação vacinal conjunta. A vacina celular *Pertussis* low é uma vacina desenvolvida pelo Instituto Butantan e possui conteúdo reduzido de lipopolissacarídeo (LPS), sendo capaz de produzir uma resposta imune semelhante à vacina que utiliza o microorganismo sem redução da

quantidade total de lipopolissacarídeo (Zorzeto et al., 2009). O adjuvante de Freund é uma emulsão água/óleo e, embora tenha sido utilizado na década de 1960 como adjuvante em formulações vacinais administradas em humanos, a sua alta reatogenicidade e seus efeitos em longo prazo tornaram-no inapropriado para uso (O'Hagan e De Gregorio, 2009).

A presença de anticorpos nos soros dos animais imunizados pelas formulações conjuntas foi verificada através do ensaio de ELISA (figura 25 e 26). Como resultado, foram detectadas significativas quantidades de anticorpos IgG, demonstrando que todas as formulações foram imunogênicas. Em geral, a presença dos adjuvantes nas formulações geraram uma elevação na produção de IgG, indicando que os adjuvantes atuaram eficientemente no aumento da resposta imune das formulações. O aumento de anticorpos gerado pela adição de cada adjuvante à formulação conjunta foi significativamente diferente do nível de anticorpos gerado somente pela formulação conjunta. O hidróxido de alumínio/MPLA e a vacina celular *Pertussis* low promoveram os maiores aumentos nos níveis de anticorpos anti-L2 dentre os três adjuvantes testados. A elevada indução de anticorpos promovida pela vacina celular *Pertussis* low pode ser correlacionada à forte imunogenicidade intrínseca apresentada por vacinas constituídas por patógenos íntegros vivos ou atenuados (Reed et al., 2009).

Adicionalmente, realizamos a determinação da proporção entre os subtipos de anticorpos IgG1 e IgG2a (figura 27), cuja presença em soro de camundongos confere um caráter indicativo sobre o direcionamento para uma resposta imune Th2 (T helper tipo 2) ou Th1. Na presença dos adjuvantes hidróxido de alumínio/monofosforil lipídio A e adjuvante de Freund, os níveis do subtipo IgG1 foram preferencialmente induzidos, sendo isso um indicativo do direcionamento para uma resposta Th2. Por outro lado, na presença da vacina celular *Pertussis* low como adjuvante, houve uma tendência à indução superior, mas não significativa, do subtipo IgG2a indicando um possível direcionamento à resposta Th1,

semelhante ao que observado na imunização com a vacina celular *Pertussis* tradicional (Higgins et al., 2006).

Considerando que a adição de adjuvantes intensifica a indução de uma resposta imune, eles também podem prolongar a presença de anticorpos sistêmicos, gerando uma proteção a longo termo. Entretanto, para as vacinas baseadas na proteína L2 o tempo de duração dessa proteção ainda não está definido, embora exista estudo, em bovinos, que indica a duração de proteção de pelo menos um ano (Chandrachud et al., 1995).

A longevidade da presença de anticorpos induzidos pela imunização foi avaliada quatro meses após a administração da última dose (figura 28). Nos soros, os níveis de anticorpos IgG induzidos na presença dos adjuvantes hidróxido de alumínio/monosfosforil lipídio A e vacina celular *Pertussis* low puderam ser detectados e apresentavam títulos de magnitude similar aos detectados após a 3ª dose, indicando que os adjuvantes proporcionam uma indução de anticorpos sistêmicos que pode ser mantida por um tempo prolongado. É preciso lembrar que títulos de anticorpos gerados pelas proteínas L2 não apresentam correlação direta com títulos de anticorpos neutralizantes gerados (Jagu et al., 2010) e, portanto, os níveis de anticorpos neutralizantes L2-específicos devem ser verificados (Day et al., 2012) para que uma possível correlação com a proteção a longo prazo possa ser estabelecida.

Como a formulação conjunta utilizada constituía-se de três proteínas, foi analisada a reatividade dos soros obtidos pelo ensaio de imunização contra cada uma das proteínas da formulação. As três proteínas presentes na formulação foram reconhecidas pelos soros experimentais (figura 29), confirmando a capacidade de ampla reatividade cruzada da proteína L2 (Roden et al., 2000; Pastrana et al., 2005; Gambhira et al., 2007). Entretanto, foram detectadas algumas diferenças de intensidade de reconhecimento entre as proteínas, com uma ampliação do reconhecimento gerado pela presença dos adjuvantes nas formulações

conjuntas verificadas pela maior intensidade das bandas imunoreativas. Além disso, entre os adjuvantes, houve uma polarização do reconhecimento entre as três proteínas, sugerindo a existência de uma possível modulação no reconhecimento de acordo com o adjuvante utilizado. Para induzir um reconhecimento equilibrado entre os antígenos, deverá ser feita uma formulação alterando as concentrações dos antígenos a exemplo do que ocorre com outras vacinas, como a quadrivalente de HPV.

A produção de uma vacina de ampla cobertura contra os HPVs oncogênicos seria o ideal no combate ao câncer cervical subvertendo a proteção tipo-restrita conferida pelas vacinas comercialmente disponíveis e reduzindo o custo de produção. Dentre as estratégias testadas, o domínio ZZ não apresentou efeito adjuvante quando associado aos antígenos baseados na proteína L2. A estratégia envolvendo a formulação vacinal conjunta (L2 HPV-16, L2 HPV-18 e L2 Multimérica) mostrou-se promissora como vacina alternativa contra o HPV pela forte indução de anticorpos contra a proteína L2 e por promover a estabilidade dos níveis de anticorpos por um longo período. No entanto, estudos deverão ser realizados no sentido de se obter uma reatividade balanceada dos anticorpos produzidos contra os antígenos. Além disso, ainda seria importante determinar se a resposta balanceada de anticorpos reativos correspondem a uma resposta balanceada de anticorpos neutralizantes.

Em vacinas profiláticas contra o HPV, é desejável que uma forte resposta imune do tipo Th2, caracterizada pela produção de anticorpos neutralizantes, seja induzida além do estabelecimento de células B de memória. Assim, entre os adjuvantes testados, o hidróxido de alumínio/MPLA e a vacina celular *Pertussis* low encorajam a sua utilização na formulação vacinal devido ao alto nível de anticorpos gerados, ainda que a vacina *Pertussis* tenha apresentado uma tendência ao direcionamento à resposta Th1. No Programa de Imunização do Sistema Único de Saúde, a vacina contra *Pertussis* é administrada em conjunto com a vacina contra difteria e tétano sob a forma DTwP em crianças nos primeiros meses de vida. Existe

uma preocupação crescente sobre os novos casos de *Pertussis* na população, estimulando o seu uso como reforço em idade escolar (Wood e McIntyre, 2008). Uma associação das vacinas de HPV com *Pertussis* seria de grande interesse para o Programa de Imunização e poderia cobrir o reforço contra *Pertussis* assim como a proteção contra a infecção pelo papilomavírus na idade entre 9 a 12 anos. Isso direciona a uma nova possibilidade de imunização, tornando a incorporação da vacina conjunta contra o HPV na vacina DTwP uma interessante estratégia de imunização a ser analisada.

6 Conclusões

- As preparações de VLPs produzidas a partir de um clone de *Pichia pastoris* transformado com o vetor episomal, e obtidas através do protocolo de purificação previamente estabelecido em nosso laboratório, apresentaram degradação e agregação da proteína L1, além de contaminantes;
- As modificações inseridas no protocolo de purificação diminuíram a degradação e agregação da proteína L1. Após o processo de purificação, as preparações de VLPs não apresentaram degradação nem agregação da proteína L1, mas ainda apresentaram contaminantes;
- Ao final do processo de purificação, foram produzidas preparações de VLPs semi-purificadas;
- O nível de expressão dos clones de *Pichia pastoris* transformados com o vetor integrativo foi superior ao nível de expressão da proteína L1 dos clones transformados com o vetor episomal;
- Foi possível purificar as proteínas L2 HPV-16, L2 HPV-18, L2 Multimérica, ZZ-L2 HPV-16, ZZ-L2 HPV-18, ZZ-L2 Multimérica em condição desnaturante a partir dos corpúsculos de inclusão;
- Os pools de soros dos animais imunizados apresentaram baixos títulos de anticorpos neutralizantes, mas com atividade neutralizante contra VLPs homólogas e heterólogas;
- O domínio ZZ, ao menos quando fusionado a antígenos do Papilomavírus Humano, não exerce função de adjuvante, mesmo em sua forma funcional, pois induziu baixos títulos de anticorpos L2-específicos;
- A formulação vacinal conjunta, contendo as proteínas L2 HPV-16, L2 HPV-18 e L2 Multimérica, quando combinada com o adjuvante hidróxido de alumínio/MPLA e com

a vacina celular *Pertussis* low, induziram elevados títulos de anticorpos L2-específicos;

- Os anticorpos L2-específicos gerados com a formulação conjunta e mantiveram os títulos elevados mesmo após 4 meses da imunização;
- A imunogenicidade de cada antígeno presente na formulação vacinal depende da combinação com os adjuvantes testados.

7 Referências Bibliográficas

- Agência Senado. Imunização de Meninas contra o HPV pelo SUS é Aprovada em Turno Suplementar. Portal Senado. 2012. [acesso em 12/09/2012]. Disponível em: <http://www12.senado.gov.br/noticias/materias/2012/09/12/imunizacao-contr-o-hpv-pelo-sus-e-aprovada-em-turno-suplementar>.
- Aida, Y. e M. J. Pabst. Removal of Endotoxin from Protein Solutions by Phase-Separation Using Triton X-114. *Journal of Immunological Methods*. 1990;132(2): 191-195.
- Aires, K. A., A. M. Cianciarullo, S. M. Carneiro, L. L. Villa, E. Boccardo, G. Perez-Martinez, I. Perez-Arellano, M. L. Oliveira e P. L. Ho. Production of human papillomavirus type 16 L1 virus-like particles by recombinant *Lactobacillus casei* cells. *Appl Environ Microbiol*. 2006; 72(1): 745-752.
- Alphs, H. H., R. Gambhira, B. Karanam, J. N. Roberts, S. Jagu, J. T. Schiller, W. Zeng, D. C. Jackson e R. B. Roden. Protection against heterologous human papillomavirus challenge by a synthetic lipopeptide vaccine containing a broadly cross-neutralizing epitope of L2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(15): 5850-5855.
- Amin, A. A., S. Titolo, A. Pelletier, D. Fink, M. G. Cordingley e J. Archambault. Identification of domains of the HPV11 E1 protein required for DNA replication in vitro. *Virology*. 2000;272(1): 137-150.
- Baek, J. O., J. W. Seo, O. Kwon, S. M. Park, C. H. Kim e I. H. Kim. Production of human papillomavirus type 33 L1 major capsid protein and virus-like particles from *Bacillus subtilis* to develop a prophylactic vaccine against cervical cancer. *Enzyme Microb Technol*. 2012;50(3): 173-180.
- Baseman, J. G. e L. A. Koutsky. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol*. 2005;32 Suppl 1: S16-24.
- Bazan, S. B. Expressão da proteína L1 do capsídio de HPV-16 em leveduras metilotróficas [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Química. 2007;[acesso 2012-09-11]. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/46/46131/tde-18102007-171459/>.
- Bazan, S. B., A. D. M. Chaves, K. A. Aires, A. M. Cianciarullo, R. L. Garcea e P. L. Ho. Expression and characterization of HPV-16 L1 capsid protein in *Pichia pastoris*. *Archives of Virology*. 2009;154(10): 1609-1617.
- Bernard, H. U., R. D. Burk, Z. Chen, K. van Doorslaer, H. Hausen e E. M. de Villiers. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*. 2010;401(1): 70-79.
- Bhandari, P. e J. Gowrishankar. An *Escherichia coli* host strain useful for efficient overproduction of cloned gene products with NaCl as the inducer. *Journal of Bacteriology*. 1997;179(13): 4403-4406.
- Boer, E., G. Steinborn, G. Kunze e G. Gellissen. Yeast expression platforms. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007;77(3): 513-523.
- Bosch, F. X. e S. de Sanjose. Human papillomavirus in cervical cancer. *Curr Oncol Rep*. 2002;4(2): 175-183.
- Bosch, F. X. e S. de Sanjose. The epidemiology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Dis Markers*. 2007;23(4): 213-227.
- Boshart, M., L. Gissmann, H. Ikenberg, A. Kleinheinz, W. Scheurlen e H. zur Hausen. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J*. 1984;3(5): 1151-1157.
- Brinkman, J. A., W. E. Jones, A. M. Gaffga, J. A. Sanders, A. K. Chaturvedi, I. J. Slavinsky, J. L. Clayton, J. Dumestre e M. E. Hagensee. Detection of human papillomavirus DNA in urine specimens from human immunodeficiency virus-positive women. *J Clin Microbiol*. 2002;40(9): 3155-3161.
- Bruni, L., M. Diaz, X. Castellsague, E. Ferrer, F. X. Bosch e S. de Sanjose. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *J Infect Dis*. 2010;202(12): 1789-1799.

- Buck, C. B., N. Cheng, C. D. Thompson, D. R. Lowy, A. C. Steven, J. T. Schiller e B. L. Trus. Arrangement of L2 within the papillomavirus capsid. *J Virol*. 2008;82(11): 5190-5197.
- Castellsague, X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecol Oncol*. 2008;110(3 Suppl 2): S4-7.
- Castellsague, X. e N. Munoz. Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis--role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003;(31): 20-28.
- Cereghino, G. P., J. L. Cereghino, C. Ilgen e J. M. Cregg. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Curr Opin Biotechnol*. 2002;13(4): 329-332.
- Chandrachud, L. M., G. J. Grindlay, G. M. McGarvie, B. W. O'Neil, E. R. Wagner, W. F. Jarrett e M. S. Campo. Vaccination of cattle with the N-terminus of L2 is necessary and sufficient for preventing infection by bovine papillomavirus-4. *Virology*. 1995;211(1): 204-208.
- Chen, X. S., R. L. Garcea, I. Goldberg, G. Casini e S. C. Harrison. Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. *Mol Cell*. 2000;5(3): 557-567.
- Cho, H. J., Y. K. Oh e Y. B. Kim. Advances in human papilloma virus vaccines: a patent review. *Expert Opin Ther Pat*. 2011;21(3): 295-309.
- Cho, H. J., H. J. Shin, I. K. Han, W. W. Jung, Y. B. Kim, D. Sul e Y. K. Oh. Induction of mucosal and systemic immune responses following oral immunization of mice with *Lactococcus lactis* expressing human papillomavirus type 16 L1. *Vaccine*. 2007;25(47): 8049-8057.
- Conrad, M., V. J. Bubbs e R. Schlegel. The human papillomavirus type 6 and 16 E5 proteins are membrane-associated proteins which associate with the 16-kilodalton pore-forming protein. *J Virol*. 1993;67(10): 6170-6178.
- Cook, J. C., J. G. Joyce, H. A. George, L. D. Schultz, W. M. Hurni, K. U. Jansen, R. W. Hepler, C. Ip, R. S. Lowe, P. M. Keller e E. D. Lehman. Purification of virus-like particles of recombinant human papillomavirus type 11 major capsid protein L1 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expr Purif*. 1999;17(3): 477-484.
- Corey, L., A. G. Langenberg, R. Ashley, R. E. Sekulovich, A. E. Izu, J. M. Douglas, Jr., H. H. Handsfield, T. Warren, L. Marr, S. Tyring, R. DiCarlo, A. A. Adimora, P. Leone, C. L. Dekker, R. L. Burke, W. P. Leong e S. E. Straus. Recombinant glycoprotein vaccine for the prevention of genital HSV-2 infection: two randomized controlled trials. Chiron HSV Vaccine Study Group. *JAMA*. 1999;282(4): 331-340.
- Cui, Z. R. e L. Huang. Liposome-polycation-DNA (LPD) particle as a carrier and adjuvant for protein-based vaccines: Therapeutic effect against cervical cancer. *Cancer Immunology Immunotherapy*. 2005;54(12): 1180-1190.
- Day, P. M., C. C. Baker, D. R. Lowy e J. T. Schiller. Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(39): 14252-14257.
- Day, P. M., R. C. Kines, C. D. Thompson, S. Jagu, R. B. Roden, D. R. Lowy e J. T. Schiller. In vivo mechanisms of vaccine-induced protection against HPV infection. *Cell Host Microbe*. 2010;8(3): 260-270.
- Day, P. M., Y. Y. Pang, R. C. Kines, C. D. Thompson, D. R. Lowy e J. T. Schiller. A Human Papillomavirus (HPV) In Vitro Neutralization Assay That Recapitulates the In Vitro Process of Infection Provides a Sensitive Measure of HPV L2 Infection-Inhibiting Antibodies. *Clin Vaccine Immunol*. 2012;19(7): 1075-1082.
- Day, P. M. e J. T. Schiller. The role of furin in papillomavirus infection. *Future Microbiol*. 2009;4(10): 1255-1262.
- de Sanjose, S., M. Diaz, X. Castellsague, G. Clifford, L. Bruni, N. Munoz e F. X. Bosch. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2007;7(7): 453-459.
- de Villiers, E. M., C. Fauquet, T. R. Broker, H. U. Bernard e H. zur Hausen. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004;324(1): 17-27.
- Donovan, B., N. Franklin, R. Guy, A. E. Grulich, D. G. Regan, H. Ali, H. Wand e C. K. Fairley. Quadrivalent human papillomavirus vaccination and trends in genital warts in Australia: analysis of national sentinel surveillance data. *Lancet Infectious Diseases*. 2011;11(1): 39-44.

- Doorbar, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)*. 2006;110(5): 525-541.
- Doorbar, J., S. Ely, J. Sterling, C. Mclean e L. Crawford. Specific Interaction between Hpv-16 E1-E4 and Cytokeratins Results in Collapse of the Epithelial-Cell Intermediate Filament Network. *Nature*. 1991;352(6338): 824-827.
- Drevet, P., C. Lemaire, S. Gasparini, S. ZinnJustin, E. Lajeunesse, F. Ducancel, S. Pinkasfeld, M. Courcon, O. Tremeau, J. C. Boulain e A. Menez. High-level production and isotope labeling of snake neurotoxins, disulfide-rich proteins. *Protein Expression and Purification*. 1997;10(3): 293-300.
- Durst, M., L. Gissmann, H. Ikenberg e H. zur Hausen. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983;80(12): 3812-3815.
- Einstein, M. H., A. S. Kadish, R. D. Burk, M. Y. Kim, S. Wadler, H. Strelcher, G. L. Goldberg e C. D. Runowicz. Heat shock fusion protein-based immunotherapy for treatment of cervical intraepithelial neoplasia III. *Gynecologic Oncology*. 2007;106(3): 453-460.
- Einstein, M. H., J. T. Schiller, R. P. Viscidi, H. D. Strickler, P. Coursaget, T. Tan, N. Halsey e D. Jenkins. Clinician's guide to human papillomavirus immunology: knowns and unknowns. *Lancet Infect Dis*. 2009;9(6): 347-356.
- Embers, M. E., L. R. Budgeon, M. Pickel e N. D. Christensen. Protective immunity to rabbit oral and cutaneous papillomaviruses by immunization with short peptides of L2, the minor capsid protein. *J Virol*. 2002;76(19): 9798-9805.
- Evans, M., L. K. Borysiewicz, A. S. Evans, M. Rowe, M. Jones, U. Gileadi, V. Cerundolo e S. Man. Antigen processing defects in cervical carcinomas limit the presentation of a CTL epitope from human papillomavirus 16 E6. *J Immunol*. 2001;167(9): 5420-5428.
- Fausch, S. C., D. M. Da Silva, M. P. Rudolf e W. M. Kast. Human papillomavirus virus-like particles do not activate Langerhans cells: a possible immune escape mechanism used by human papillomaviruses. *J Immunol*. 2002;169(6): 3242-3249.
- Finnen, R. L., K. D. Erickson, X. S. Chen e R. L. Garcea. Interactions between papillomavirus L1 and L2 capsid proteins. *J Virol*. 2003;77(8): 4818-4826.
- Florin, L., C. Sapp, R. E. Streeck e M. Sapp. Assembly and translocation of papillomavirus capsid proteins. *J Virol*. 2002;76(19): 10009-10014.
- Franceschi, S., R. Herrero, G. M. Clifford, P. J. Snijders, A. Arslan, P. T. Anh, F. X. Bosch, C. Ferreccio, N. T. Hieu, E. Lazcano-Ponce, E. Matos, M. Molano, Y. L. Qiao, R. Rajkumar, G. Ronco, S. de Sanjose, H. R. Shin, S. Sukvirach, J. O. Thomas, C. J. Meijer e N. Munoz. Variations in the age-specific curves of human papillomavirus prevalence in women worldwide. *Int J Cancer*. 2006;119(11): 2677-2684.
- Frazer, I. H. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(1): 46-54.
- Gambhira, R., S. Jagu, B. Karanam, P. E. Gravitt, T. D. Culp, N. D. Christensen e R. B. Roden. Protection of rabbits against challenge with rabbit papillomaviruses by immunization with the N terminus of human papillomavirus type 16 minor capsid antigen L2. *J Virol*. 2007;81(21): 11585-11592.
- Gambhira, R., B. Karanam, S. Jagu, J. N. Roberts, C. B. Buck, I. Bossis, H. Alphs, T. Culp, N. D. Christensen e R. B. Roden. A protective and broadly cross-neutralizing epitope of human papillomavirus L2. *J Virol*. 2007;81(24): 13927-13931.
- Garcon, N., P. Chomez e M. Van Mechelen. GlaxoSmithKline Adjuvant systems in vaccines: concepts, achievements and perspectives. *Expert Review of Vaccines*. 2007;6(5): 723-739.
- Gellissen, G. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2000;54(6): 741-750.
- Gellissen, G., G. Kunze, C. Gaillardin, J. M. Cregg, E. Berardi, M. Veenhuis e I. van der Klei. New yeast expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* and on dimorphic *Arxula adeninivorans* and *Yarrowia lipolytica* - a comparison. *FEMS Yeast Res*. 2005;5(11): 1079-1096.
- Giannini, S. L., E. Hanon, P. Moris, M. Van Mechelen, S. Morel, F. Dessy, M. A. Fourneau, B. Colau, J. Suzich, G. Losonksy, M. T. Martin, G. Dubin e M. A. Wettendorff. Enhanced humoral and

- memory B cellular immunity using HPV16/18 L1 VLP vaccine formulated with the MPL/aluminium salt combination (AS04) compared to aluminium salt only. *Vaccine*. 2006;24(33-34): 5937-5949.
- Giuliano, A. R., J. M. Palefsky, S. Goldstone, E. D. Moreira, Jr., M. E. Penny, C. Aranda, E. Vardas, H. Moi, H. Jessen, R. Hillman, Y. H. Chang, D. Ferris, D. Rouleau, J. Bryan, J. B. Marshall, S. Vuocolo, E. Barr, D. Radley, R. M. Haupt e D. Guris. Efficacy of quadrivalent HPV vaccine against HPV Infection and disease in males. *N Engl J Med*. 2011;364(5): 401-411.
- Goldie, S. J., J. J. Kim, K. Kobus, J. D. Goldhaber-Fiebert, J. Salomon, K. O'Shea M, F. Xavier Bosch, S. de Sanjose e E. L. Franco. Cost-effectiveness of HPV 16, 18 vaccination in Brazil. *Vaccine*. 2007;25(33): 6257-6270.
- Grgacic, E. V. L. e D. A. Anderson. Virus-like particles: Passport to immune recognition. *Methods*. 2006;40(1): 60-65.
- Guy, B. The perfect mix: recent progress in adjuvant research. *Nat Rev Microbiol*. 2007;5(7):505-517.
- Hanumantha Rao, N., P. Baji Babu, L. Rajendra, R. Sriraman, Y. Y. Pang, J. T. Schiller e V. A. Srinivasan. Expression of codon optimized major capsid protein (L1) of human papillomavirus type 16 and 18 in *Pichia pastoris*; purification and characterization of the virus-like particles. *Vaccine*. 2011;29(43): 7326-7334.
- Harper, D. M., E. L. Franco, C. Wheeler, D. G. Ferris, D. Jenkins, A. Schuind, T. Zahaf, B. Innis, P. Naud, N. S. De Carvalho, C. M. Roteli-Martins, J. Teixeira, M. M. Blatter, A. P. Korn, W. Quint e G. Dubin. Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial. *Lancet*. 2004;364(9447): 1757-1765.
- Harper, D. M. e S. L. Vierthaler. Next Generation Cancer Protection: The Bivalent HPV Vaccine for Females. *ISRN Obstet Gynecol*. 2011;2011: 457204.
- Hegde, R. S. e E. J. Androphy. Crystal structure of the E2 DNA-binding domain from human papillomavirus type 16: implications for its DNA binding-site selection mechanism. *J Mol Biol*. 1998;284(5): 1479-1489.
- Herd, K. A., T. Harvey, A. A. Khromykh e R. W. Tindle. Recombinant Kunjin virus replicon vaccines induce protective T-cell immunity against human papillomavirus 16 E7-expressing tumour. *Virology*. 2004;319(2): 237-248.
- Higgins, D. R. e J. M. Cregg. Introduction to *Pichia pastoris*. *Methods Mol Biol*. 1998;103: 1-15.
- Higgins, S. C., A. G. Jarnicki, E. C. Lavelle e K. H. G. Mills. TLR4 mediates vaccine-induced protective cellular immunity to *Bordetella pertussis*: Role of IL-17-producing T cells. *Journal of Immunology*. 2006;177(11): 7980-7989.
- Ho, G. Y., R. D. Burk, S. Klein, A. S. Kadish, C. J. Chang, P. Palan, J. Basu, R. Tachezy, R. Lewis e S. Romney. Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. *J Natl Cancer Inst*. 1995;87(18): 1365-1371.
- Holmgren, S. C., N. A. Patterson, M. A. Ozbun e P. F. Lambert. The minor capsid protein L2 contributes to two steps in the human papillomavirus type 31 life cycle. *J Virol*. 2005;79(7): 3938-3948.
- INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil. (Coordenação de Prevenção e Vigilância). Rio de Janeiro. Inca. 2011. ISBN 978-85-7318-194-4.
- Jagu, S., B. Karanam, R. Gambhira, S. V. Chivukula, R. J. Chaganti, D. R. Lowy, J. T. Schiller e R. B. Roden. Concatenated multitype L2 fusion proteins as candidate prophylactic pan-human papillomavirus vaccines. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101(11): 782-792.
- Jagu, S., K. Kwak, R. L. Garcea e R. B. Roden. Vaccination with multimeric L2 fusion protein and L1 VLP or capsomeres to broaden protection against HPV infection. *Vaccine*. 2010;28(28): 4478-4486.
- Jagu, S., N. Malandro, K. Kwak, H. Yuan, R. Schlegel, K. E. Palmer, W. K. Huh, M. S. Campo e R. B. Roden. A multimeric L2 vaccine for prevention of animal papillomavirus infections. *Virology*. 2011;420(1): 43-50.
- Johnson, K. M., R. C. Kines, J. N. Roberts, D. R. Lowy, J. T. Schiller e P. M. Day. Role of heparan sulfate in attachment to and infection of the murine female genital tract by human papillomavirus. *J Virol*. 2009;83(5): 2067-2074.

- Kanodia, S., L. M. Fahey e W. M. Kast. Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. *Curr Cancer Drug Targets*. 2007;7(1): 79-89.
- Karanam, B., S. Jagu, W. K. Huh e R. B. Roden. Developing vaccines against minor capsid antigen L2 to prevent papillomavirus infection. *Immunol Cell Biol*. 2009;87(4): 287-299.
- Karanam, B., S. Peng, T. Li, C. Buck, P. M. Day e R. B. Roden. Papillomavirus infection requires gamma secretase. *J Virol*. 2010;84(20): 10661-10670.
- Kaufmann, A. M., P. L. Stern, E. M. Rankin, H. Sommer, V. Nuessler, A. Schneider, M. Adams, T. S. Onon, T. Bauknecht, U. Wagner, K. Kroon, J. Hickling, C. M. Boswell, S. N. Stacey, H. C. Kitchener, J. Gillard, J. Wanders, J. S. Roberts e H. Zwierzina. Safety and immunogenicity of TA-HPV, a recombinant vaccinia virus expressing modified human papillomavirus (HPV)-16 and HPV-18 E6 and E7 genes, in women with progressive cervical cancer. *Clin Cancer Res*. 2002;8(12): 3676-3685.
- Kawana, K., T. Yasugi, T. Kanda, N. Kino, K. Oda, S. Okada, Y. Kawana, T. Nei, T. Takada, S. Toyoshima, A. Tsuchiya, K. Kondo, H. Yoshikawa, O. Tsutsumi e Y. Taketani. Safety and immunogenicity of a peptide containing the cross-neutralization epitope of HPV16 L2 administered nasally in healthy volunteers. *Vaccine*. 2003;21(27-30): 4256-4260.
- Kawana, Y., K. Kawana, H. Yoshikawa, Y. Taketani, K. Yoshiike e T. Kanda. Human papillomavirus type 16 minor capsid protein L2 N-terminal region containing a common neutralization epitope binds to the cell surface and enters the cytoplasm. *J Virol*. 2001;75(5): 2331-2336.
- Kim, H. J., S. J. Lim, J. Y. Kim e S. Y. Kim. A method for removing contaminating protein during purification of human papillomavirus type 18 L1 protein from *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Pharm Res*. 2009;32(12): 1759-1766.
- Kim, H. J., S. J. Lim e H. L. Kwag. The choice of resin-bound ligand affects the structure and immunogenicity of column-purified human papillomavirus type 16 virus-like particles. *PLoS One*. 2012;7(4): e35893.
- Kirnbauer, R., F. Booy, N. Cheng, D. R. Lowy e J. T. Schiller. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(24): 12180-12184.
- Kirnbauer, R., J. Taub, H. Greenstone, R. Roden, M. Durst, L. Gissmann, D. R. Lowy e J. T. Schiller. Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. *J Virol*. 1993;67(12): 6929-6936.
- Klabunde, J., G. Kunze, G. Gellissen e C. P. Hollenberg. Integration of heterologous genes in several yeast species using vectors containing a *Hansenula polymorpha*-derived rDNA-targeting element. *FEMS Yeast Res*. 2003;4(2): 185-193.
- Koutsky, L. A., D. A. Galloway e K. K. Holmes. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Epidemiol Ver*. 1988;10: 122-163.
- Kwak, K., A. Yemelyanova e R. B. Roden. Prevention of cancer by prophylactic human papillomavirus vaccines. *Curr Opin Immunol*. 2011;23(2): 244-251.
- Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature*. 1970;227(5259): 680-&.
- Lai, W. B. e A. P. Middelberg. The production of human papillomavirus type 16 L1 vaccine product from *Escherichia coli* inclusion bodies. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2002;25(2): 121-128.
- Leechanachai, P., L. Banks, F. Moreau e G. Matlashewski. The E5 gene from human papillomavirus type 16 is an oncogene which enhances growth factor-mediated signal transduction to the nucleus. *Oncogene*. 1992;7(1): 19-25.
- Leonetti, M., R. Thai, J. Cotton, S. Leroy, P. Drevet, F. Ducancel, J. C. Boulain e A. Menez. Increasing immunogenicity of antigens fused to Ig-binding proteins by cell surface targeting. *Journal of Immunology*. 1998;160(8): 3820-3827.
- Leval, A., E. Herweijer, L. Arnheim-Dahlstrom, H. Walum, E. Frans, P. Sparen e J. F. Simard. Incidence of Genital Warts in Sweden Before and After Quadrivalent Human Papillomavirus Vaccine Availability. *J Infect Dis*. 2012.
- Li, N., S. Franceschi, R. Howell-Jones, P. J. Snijders e G. M. Clifford. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. *Int J Cancer* 2011;128(4): 927-935.

- Liu, B., D. X. Ye, X. X. Song, X. H. Zhao, L. A. Yi, J. T. Song, Z. Y. Zhang e Q. Z. Zhao. A novel therapeutic fusion protein vaccine by two different families of heat shock proteins linked with HPV16 E7 generates potent antitumor immunity and antiangiogenesis. *Vaccine*. 2008;26(10): 1387-1396.
- Liu, X. S., I. Abdul-Jabbar, Y. M. Qi, I. H. Frazer e J. Zhou. Mucosal immunisation with papillomavirus virus-like particles elicits systemic and mucosal immunity in mice. *Virology*. 1998;252(1): 39-45.
- Livingston, B., C. Crimi, M. Newman, Y. Higashimoto, E. Appella, J. Sidney e A. Sette. A rational strategy to design multiepitope immunogens based on multiple th lymphocyte epitopes. *Journal of Immunology*. 2002;168(11): 5499-5506.
- Lowy, D. R. e I. H. Frazer. Chapter 16: Prophylactic human papillomavirus vaccines. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003;(31): 111-116.
- Ma, B., R. Roden e T. C. Wu. Current status of human papillomavirus vaccines. *J Formos Med Assoc*. 2010;109(7): 481-483.
- Maciag, P. C., S. Radulovic e J. Rothman. The first clinical use of a live-attenuated *Listeria monocytogenes* vaccine: a Phase I safety study of Lm-LLO-E7 in patients with advanced carcinoma of the cervix. *Vaccine*. 2009;27(30): 3975-3983.
- Mahdavi, A. e B. J. Monk. Vaccines against human papillomavirus and cervical cancer: promises and challenges. *Oncologist*. 2005;10(7): 528-538.
- Mansur, M., C. Cabello, L. Hernandez, J. Pais, L. Varas, J. Valdes, Y. Terrero, A. Hidalgo, L. Plana, V. Besada, L. Garcia, E. Lamazares, L. Castellanos e E. Martinez. Multiple gene copy number enhances insulin precursor secretion in the yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology Letters*. 2005;27(5): 339-345.
- Massa, S., P. Simeone, A. Muller, E. Benvenuto, A. Venuti e R. Franconi. Antitumor activity of DNA vaccines based on the human papillomavirus-16 E7 protein genetically fused to a plant virus coat protein. *Hum Gene Ther*. 2008;19(4): 354-364.
- Mbow, M. L., E. De Gregorio, N. M. Valiante e R. Rappuoli. New adjuvants for human vaccines. *Current Opinion in Immunology*. 2010;22(3): 411-416.
- McCredie, M. R., K. J. Sharples, C. Paul, J. Baranyai, G. Medley, R. W. Jones e D. C. Skegg. Natural history of cervical neoplasia and risk of invasive cancer in women with cervical intraepithelial neoplasia 3: a retrospective cohort study. *Lancet Oncol*. 2008;9(5): 425-434.
- McMurray, H. R., D. Nguyen, T. F. Westbrook e D. J. McAnce. Biology of human papillomaviruses. *Int J Exp Pathol*. 2001;82(1): 15-33.
- Moreno, A. T., M. L. S. Oliveira, D. M. Ferreira, P. L. Ho, M. Darrieux, L. C. C. Leite, J. M. C. Ferreira, F. C. Pimenta, A. L. S. S. Andrade e E. N. Miyaji. Immunization of Mice with Single PspA Fragments Induces Antibodies Capable of Mediating Complement Deposition on Different Pneumococcal Strains and Cross-Protection. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2010;17(3): 439-446.
- Mota, F., N. Rayment, S. Chong, A. Singer e B. Chain. The antigen-presenting environment in normal and human papillomavirus (HPV)-related premalignant cervical epithelium. *Clin Exp Immunol*. 1999;116(1): 33-40.
- Muller, M., L. Gissmann, R. J. Cristiano, X. Y. Sun, I. H. Frazer, A. B. Jenson, A. Alonso, H. Zentgraf e J. Zhou. Papillomavirus capsid binding and uptake by cells from different tissues and species. *J Virol*. 1995;69(2): 948-954.
- Munger, K., B. A. Werness, N. Dyson, W. C. Phelps, E. Harlow e P. M. Howley. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J*. 1989;8(13): 4099-4105.
- Munoz, N., X. Castellsague, A. B. de Gonzalez e L. Gissmann. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*. 2006;24 Suppl 3: S3/1-10.
- Norden, K., M. Agemark, J. A. Danielson, E. Alexandersson, P. Kjellbom e U. Johanson. Increasing gene dosage greatly enhances recombinant expression of aquaporins in *Pichia pastoris*. *BMC Biotechnol*. 2011;11(1): 47.
- O'Hagan, D. T. MF59 is a safe and potent vaccine adjuvant that enhances protection against influenza virus infection. *Expert Review of Vaccines*. 2007;6(5): 699-710.

- O'Hagan, D. T. e E. De Gregorio. The path to a successful vaccine adjuvant - 'The long and winding road'. *Drug Discovery Today*. 2009;14(11-12): 541-551.
- Oh, J. M., S. H. Kim, Y. I. Lee, M. Seo, S. Y. Kim, Y. S. Song, W. H. Kim e Y. S. Juhnn. Human papillomavirus E5 protein induces expression of the EP4 subtype of prostaglandin E2 receptor in cyclic AMP response element-dependent pathways in cervical cancer cells. *Carcinogenesis*. 2009;30(1): 141-149.
- Ohlschlager, P., M. Quetting, G. Alvarez, M. Durst, L. Gissmann e A. M. Kaufmann. Enhancement of immunogenicity of a therapeutic cervical cancer DNA-based vaccine by co-application of sequence-optimized genetic adjuvants. *International Journal of Cancer*. 2009;125(1): 189-198.
- Park, M. A. e H. J. Kim. Optimum conditions for production and purification of human papillomavirus type 16 L1 protein from *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expr Purif*. 2008;59(1): 175-181.
- Pastrana, D. V., C. B. Buck, Y. Y. Pang, C. D. Thompson, P. E. Castle, P. C. FitzGerald, S. Kruger Kjaer, D. R. Lowy e J. T. Schiller. Reactivity of human sera in a sensitive, high-throughput pseudovirus-based papillomavirus neutralization assay for HPV16 and HPV18. *Virology*. 2004;321(2): 205-216.
- Pastrana, D. V., R. Gambhira, C. B. Buck, Y. Y. Pang, C. D. Thompson, T. D. Culp, N. D. Christensen, D. R. Lowy, J. T. Schiller e R. B. Roden. Cross-neutralization of cutaneous and mucosal Papillomavirus types with anti-sera to the amino terminus of L2. *Virology*. 2005;337(2): 365-372.
- Pastrana, D. V., R. Gambhira, C. B. Buck, Y. Y. S. Pang, C. D. Thompson, T. D. Culp, N. D. Christensen, D. R. Lowy, J. T. Schiller e R. B. S. Roden. Cross-neutralization of cutaneous and mucosal Papillomavirus types with anti-sera to the amino terminus of L2. *Virology*. 2005;337(2): 365-372.
- Peres, J. For cancers caused by HPV, two vaccines were just the beginning. *J Natl Cancer Inst*. 2011;103(5): 360-362.
- Peto, J., C. Gilham, O. Fletcher e F. E. Matthews. The cervical cancer epidemic that screening has prevented in the UK. *Lancet*. 2004;364(9430): 249-256.
- Petsch, D. e F. B. Anspach. Endotoxin removal from protein solutions. *Journal of Biotechnology*. 2000;76(2-3): 97-119.
- Pett, M. R., W. O. Alazawi, I. Roberts, S. Dowen, D. I. Smith, M. A. Stanley e N. Coleman. Acquisition of high-level chromosomal instability is associated with integration of human papillomavirus type 16 in cervical keratinocytes. *Cancer Res*. 2004;64(4): 1359-1368.
- Precioso, A. R., J. L. Miraglia, L. M. A. Campos, A. C. Goulart, M. D. S. T. Timenetsky, M. R. A. Cardoso, E. Luna, G. Mondini, J. D. Guedes e I. Raw. A phase I randomized, double-blind, controlled trial of 2009 influenza A(H1N1) inactivated monovalent vaccines with different adjuvant systems. *Vaccine*. 2011;29(48): 8974-8981.
- Quintilio, W., F. S. Kubrusly, D. Iourtov, C. Miyaki, M. A. Sakauchi, F. Lucio, S. D. Dias, C. S. Takata, E. N. Miyaji, H. G. Higashi, L. C. C. Leite e I. Raw. Bordetella pertussis monophosphoryl lipid A as adjuvant for inactivated split virion influenza vaccine in mice. *Vaccine*. 2009;27(31): 4219-4224.
- Ramos, C. R. R., P. A. E. Abreu, A. L. T. O. Nascimento e P. L. Ho. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal histagged fusion peptide. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2004;37(8): 1103-1109.
- Read, T. R. H., J. S. Hocking, M. Y. Chen, B. Donovan, C. S. Bradshaw e C. K. Fairley. The near disappearance of genital warts in young women 4 years after commencing a national human papillomavirus (HPV) vaccination programme. *Sexually Transmitted Infections*. 2011;87(7): 544-547.
- Reed, S. G., S. Bertholet, R. N. Coler e M. Friede. New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends in Immunology*. 2009;30(1): 23-32.
- Richards, R. M., D. R. Lowy, J. T. Schiller e P. M. Day. Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(5): 1522-1527.

- Roberts, S., I. Ashmole, L. J. Gibson, S. M. Rookes, G. J. Barton e P. H. Gallimore. Mutational Analysis of Human Papillomavirus E4 Proteins - Identification of Structural Features Important in the Formation of Cytoplasmic E4 Cytokeratin Networks in Epithelial-Cells. *Journal of Virology*. 1994;68(10): 6432-6445.
- Roden, R. B., P. M. Day, B. K. Bronzo, W. H. t. Yutzy, Y. Yang, D. R. Lowy e J. T. Schiller. Positively charged termini of the L2 minor capsid protein are necessary for papillomavirus infection. *J Virol*. 2001;75(21): 10493-10497.
- Roden, R. B. S., W. H. Yutzy, R. Fallon, S. Inglis, D. R. Lowy e J. T. Schiller. Minor capsid protein of human genital papillomaviruses contains subdominant, cross-neutralizing epitopes. *Virology*. 2000;270(2): 254-257.
- Rommel, O., J. Dillner, C. Fligge, C. Bergsdorf, X. Wang, H. C. Selinka e M. Sapp. Heparan sulfate proteoglycans interact exclusively with conformationally intact HPV L1 assemblies: basis for a virus-like particle ELISA. *J Med Virol*. 2005;75(1): 114-121.
- Rubio, I., A. Bolchi, N. Moretto, E. Canali, L. Gissmann, M. Tommasino, M. Muller e S. Ottonello. Potent anti-HPV immune responses induced by tandem repeats of the HPV16 L2 (20 -- 38) peptide displayed on bacterial thioredoxin. *Vaccine*. 2009;27(13): 1949-1956.
- Scheffner, M., J. M. Huibregtse, R. D. Vierstra e P. M. Howley. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* (1993) 75(3): 495-505.
- Schneider, M. A., G. A. Spoden, L. Florin e C. Lambert. Identification of the dynein light chains required for human papillomavirus infection. *Cell Microbiol*. 2011;13(1): 32-46.
- Schuck, S. e A. Stenlund. Mechanistic analysis of local ori melting and helicase assembly by the papillomavirus E1 protein. *Mol Cell*. 2011;43(5): 776-787.
- Sheinfeld Gorin, S. N., B. A. Glenn e R. B. Perkins. The human papillomavirus (HPV) vaccine and cervical cancer: uptake and next steps. *Adv Ther*. 2011;28(8): 615-639.
- Shi, L., G. Sanyal, A. Ni, Z. Luo, S. Doshna, B. Wang, T. L. Graham, N. Wang e D. B. Volkin. Stabilization of human papillomavirus virus-like particles by non-ionic surfactants. *J Pharm Sci*. 2005;94(7): 1538-1551.
- Silva, J. R. N. S. Construção de vetores para superexpressão da proteína L1 do HPV16 em *Pichia pastoris*. [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Química. 2010. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/46/46131/tde-26112010-104443/>.
- Sjolander, A., S. Stahl, P. A. Nygren, L. Aslund, N. Ahlborg, B. Wahlin, A. Scherf, K. Berzins, M. Uhlen e P. Perlmann. Immunogenicity and Antigenicity in Rabbits of a Repeated Sequence of Plasmodium-Falciparum Antigen Pf155/Resa Fused to 2 Immunoglobulin-G-Binding Domains of Staphylococcal Protein-A. *Infection and Immunity*. 1990;58(4): 854-859.
- Smith, J. F., M. Brownlow, M. Brown, R. Kowalski, M. T. Esser, W. Ruiz, E. Barr, D. R. Brown e J. T. Bryan. Antibodies from women immunized with Gardasil cross-neutralize HPV 45 pseudovirions. *Hum Vaccin*. 2007;3(4): 109-115.
- Stanley, M. A. Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus. *Clin Microbiol Rev*. 2012;25(2): 215-222.
- Stewart, T. J., D. Drane, J. Malliaros, H. Elmer, K. M. Malcolm, J. C. Cox, S. J. Edwards, I. H. Frazer e G. J. Fernando. ISCOMATRIX adjuvant: an adjuvant suitable for use in anticancer vaccines. *Vaccine*. 2004;22(27-28): 3738-3743.
- Stubenrauch, F., H. B. Lim e L. A. Laimins. Differential requirements for conserved E2 binding sites in the life cycle of oncogenic human papillomavirus type 31. *J Virol*. 1998;72(2): 1071-1077.
- Tindle, R. W. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(1): 59-65.
- Trimble, C. L., S. Peng, F. Kos, P. Gravitt, R. Viscidi, E. Sugar, D. Pardoll e T. C. Wu. A phase I trial of a human papillomavirus DNA vaccine for HPV16+ cervical intraepithelial neoplasia 2/3. *Clin Cancer Res*. 2009;15(1): 361-367.
- Trottier, H. e E. L. Franco. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine*. 2006;24 Suppl 1: S1-15.
- Vanni, T., P. Mendes Luz, A. Foss, M. Mesa-Frias e R. Legood. Economic modelling assessment of the HPV quadrivalent vaccine in Brazil: A dynamic individual-based approach. *Vaccine*. 2012.

- Venuti, A., D. Salani, F. Poggiali, V. Manni e A. Bagnato. The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 enhances endothelin-1-induced keratinocyte growth. *Virology*. 1998;248(1): 1-5.
- Villa, L. L., R. L. Costa, C. A. Petta, R. P. Andrade, K. A. Ault, A. R. Giuliano, C. M. Wheeler, L. A. Koutsky, C. Malm, M. Lehtinen, F. E. Skjeldestad, S. E. Olsson, M. Steinwall, D. R. Brown, R. J. Kurman, B. M. Ronnett, M. H. Stoler, A. Ferenczy, D. M. Harper, G. M. Tamms, J. Yu, L. Lupinacci, R. Railkar, F. J. Taddeo, K. U. Jansen, M. T. Esser, H. L. Sings, A. J. Saah e E. Barr. Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. *Lancet Oncol*. 2005;6(5): 271-278.
- Villa, L. L., R. L. Costa, C. A. Petta, R. P. Andrade, J. Paavonen, O. E. Iversen, S. E. Olsson, J. Hoyer, M. Steinwall, G. Riis-Johannessen, A. Andersson-Ellstrom, K. Elfgrén, G. Krogh, M. Lehtinen, C. Malm, G. M. Tamms, K. Giacoletti, L. Lupinacci, R. Railkar, F. J. Taddeo, J. Bryan, M. T. Esser, H. L. Sings, A. J. Saah e E. Barr. High sustained efficacy of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus types 6/11/16/18 L1 virus-like particle vaccine through 5 years of follow-up. *Br J Cancer*. 2006;95(11): 1459-1466.
- Waheed, M. T., N. Thones, M. Muller, S. W. Hassan, N. M. Razavi, E. Lossel, H. P. Kaul e A. G. Lossel. Transplastomic expression of a modified human papillomavirus L1 protein leading to the assembly of capsomeres in tobacco: a step towards cost-effective second-generation vaccines. *Transgenic Res*. 2011;20(2): 271-282.
- Walboomers, J. M., M. V. Jacobs, M. M. Manos, F. X. Bosch, J. A. Kummer, K. V. Shah, P. J. Snijders, J. Peto, C. J. Meijer e N. Munoz. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*. 1999;189(1): 12-19.
- Wang, X., M. Sapp, N. D. Christensen e J. Dillner. Heparin-based ELISA reduces background reactivity in virus-like particle-based papillomavirus serology. *J Gen Virol*. 2005;86(Pt 1): 65-73.
- Welters, M. J., G. G. Kenter, S. J. Piersma, A. P. Vloon, M. J. Lowik, D. M. Berends-van der Meer, J. W. Drijfhout, A. R. Valentijn, A. R. Wafelman, J. Oostendorp, G. J. Fleuren, R. Offringa, C. J. Melief e S. H. van der Burg. Induction of tumor-specific CD4+ and CD8+ T-cell immunity in cervical cancer patients by a human papillomavirus type 16 E6 and E7 long peptides vaccine. *Clin Cancer Res*. 2008;14(1): 178-187.
- Wheeler, C. M., X. Castellsague e S. M. Garland. Cross-protective efficacy of HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by non-vaccine oncogenic HPV types: 4-year end-of-study analysis of the randomised, double-blind PATRICIA trial (vol 13, pg 100, 2012). *Lancet Oncology*. 2012;13(1): E1-E1.
- Wheeler, C. M., X. Castellsague, S. M. Garland, A. Szarewski, J. Paavonen, P. Naud, J. Salmeron, S. N. Chow, D. Apter, H. Kitchener, J. C. Teixeira, S. R. Skinner, U. Jaisamrarn, G. Limson, B. Romanowski, F. Y. Aoki, T. F. Schwarz, W. A. J. Poppe, F. X. Bosch, D. M. Harper, W. Huh, K. Hardt, T. K. Zahaf, D. Descamps, F. Struyf, G. Dubin, M. Lehtinen e H. P. S. Grp. Cross-protective efficacy of HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by non-vaccine oncogenic HPV types: 4-year end-of-study analysis of the randomised, double-blind PATRICIA trial. *Lancet Oncology*. 2012;13(1): 100-110.
- WHO. Human Papillomavirus and Related Cancers in Americas. Summary Report 2010. WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre). [acesso em 01/07/2012]. Disponível em: www.who.int/hpvcentre.
- Wilson, V. G., M. West, K. Woytek e D. Rangasamy. Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features. *Virus Genes*. 2002;24(3): 275-290.
- Wood, N. e P. McIntyre. Pertussis: review of epidemiology, diagnosis, management and prevention. *Paediatric Respiratory Reviews*. 2008;9(3): 201-212.
- Woodman, C. B., S. I. Collins e L. S. Young. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(1): 11-22.
- Xu, Y. F., Y. Q. Zhang, X. M. Xu e G. X. Song. Papillomavirus virus-like particles as vehicles for the delivery of epitopes or genes. *Arch Virol*. 2006;151(11): 2133-2148.

- Yugawa, T. e T. Kiyono. Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins. *Rev Med Virol.* 2009;19(2): 97-113.
- Zhao, Y. X., Y. Benita, M. Lok, B. Kuipers, P. van der Ley, W. Jiskoot, W. E. Hennink, D. J. A. Crommelin e R. S. Oosting. Multi-antigen immunization using IgG binding domain ZZ as carrier. *Vaccine.* 2005;23(43): 5082-5090.
- Ziegert, C., N. Wentzensen, S. Vinokurova, F. Kisseljov, J. Eibenkel, M. Hoeckel e M. von Knebel Doeberitz. A comprehensive analysis of HPV integration loci in anogenital lesions combining transcript and genome-based amplification techniques. *Oncogene.* 2003;22(25): 3977-3984.
- Zorzeto, T. Q., H. G. Higashi, M. T. N. da Silva, E. D. Carniel, W. O. Dias, V. D. Ramalho, T. N. Mazzola, S. C. B. S. Lima, A. M. Morcillo, M. A. Stephano, M. A. R. D. Antonio, M. D. Zanolli, I. Raw e M. M. D. Vilela. Immunogenicity of a Whole-Cell Pertussis Vaccine with Low Lipopolysaccharide Content in Infants. *Clinical and Vaccine Immunology.* 2009;16(4): 544-550.
- zur Hausen, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(5): 342-350.

8 Anexos

ANEXO A – Sequência de nucleotídeos do gene L1 com códons otimizados para *Pichia pastoris*

```

ATG TCT TTG TGG TTG CCA TCT GAG GCT ACT GTT TAC TTG CCA CCA GTT CCA GTT TCC AAA GTT GTT TCC ACT GAC GAG
Met S L W L P S E A T V Y L P P V P V S K V V S T D E

TAC GTT GCT AGA ACT AAC ATC TAC TAC CAC GCT GGT ACT TCC AGA TTG TTG GCT GTT GGT CAC CCA TAC TTC CCA ATC
Y V A R T N I Y Y H A G T S R L L A V G H P Y F P I

AAG AAG CCA AAC AAC AAC AAG ATC TTG GTT CCA AAG GTT TCC GGA TTG CAG TAC AGA GTT TTC AGA ATC CAC TTG CCA
K K P N N N K I L V P K V S G L Q Y R V F R I H L P

GAC CCA AAC AAG TTT GGT TTC CCA GAC ACT TCC TTC TAC AAC CCA GAC ACT CAG AGA TTG GTT TGG GCT TGT GTT GGT
D P N K F G F P D T S F Y N P D T Q R L V W A C V G

GTT GAA GTT GGT AGA GGA CAG CCA TTG GGT GTT GGT ATT TCC GGT CAC CCA TTG TTG AAC AAG TTG GAC GAC ACT GAA
V E V G R G Q P L G V G I S G H P L L N K L D D T E

AAC GCT TCT GCT TAC GCT GCT AAC GCT GGT GTT GAC AAC AGA GAA TGT ATC TCC ATG GAC TAC AAG CAG ACT CAG TTG
N A S A Y A A N A G V D N R E C I S M D Y K Q T Q L

TGT TTG ATC GGT TGT AAG CCA CCA ATT GGT GAA CAT TGG GGA AAG GGT TCC CCA TGT ACA AAC GTT GCT GTT AAC CCT
C L I G C K P P I G E H W G K G S P C T N V A V N P

GGT GAT TGT CCA CCA TTG GAG TTG ATC AAC ACT GTT ATC CAG GAC GGT GAC ATG GTT GAT ACT GGT TTC GGT GCT ATG
G D C P P L E L I N T V I Q D G D M V D T G F G A M

GAC TTC ACT ACT TTG CAG GCT AAC AAG TCC GAA GTT CCA TTG GAC ATC TGT ACT TCC ATC TGT AAG TAC CCA GAC TAC
D F T T L Q A N K S E V P L D I C T S I C K Y P D Y

ATC AAG ATG GTT TCC GAA CCA TAC GGT GAC TCT TTG TTC TTC TAC TTG AGA AGA GAA CAG ATG TTT GTT AGA CAC TTG
I K M V S E P Y G D S L F F Y L R R E Q M F V R H L

TTC AAC AGA GCT GGT GCT GTT GGT GAA AAC GTT CCA GAC GAC TTG TAC ATT AAG GGT TCC GGT TCC ACT GCT AAC TTG
F N R A G A V G E N V P D D L Y I K G S G S T A N L

GCT TCC TCC AAC TAC TTT CCA ACT CCA TCC GGT TCT ATG GTT ACT TCC GAC GCT CAG ATC TTC AAT AAG CCA TAC TGG
A S S N Y F P T P S G S M V T S D A Q I F N K P Y W

TTG CAA AGA GCA CAA GGT CAC AAC AAC GGT ATC TGT TGG GGT AAC CAG TTG TTC GTT ACT GTT GTT GAC ACT ACT AGA
L Q R A Q G H N N G I C W G N Q L F V T V V D T T R

TCC ACT AAC ATG TCC TTG TGT GCT GCT ATT TCC ACT TCC GAG ACT ACT TAC AAG AAC ACT AAC TTC AAG GAG TAC TTG
S T N M S L C A A I S T S E T T Y K N T N F K E Y L

AGA CAC GGT GAA GAG TAC GAC TTG CAG TTC ATC TTC CAG TTG TGT AAG ATC ACT TTG ACT GCT GAC GTT ATG ACT TAC
R H G E E Y D L Q F I F Q L C K I T L T A D V M T Y

ATC CAC TCC ATG AAC TCC ACT ATT TTG GAG GAC TGG AAC TTC GGA TTG CAA CCA CCA CCA GGT GGT ACT TTG GAG GAC
I H S M N S T I L E D W N F G L Q P P P G G T L E D

ACT TAC AGA TTC GTT ACT TCC CAG GCT ATT GCT TGT CAA AAG CAC ACT CCA CCT GCT CCA AAG GAA GAT CCA TTG AAG
T Y R F V T S Q A I A C Q K H T P P A P K E D P L K

AAG TAC ACT TTC TGG GAG GTT AAC TTG AAG GAG AAG TTC TCT GCT GAC TTG GAC CAA TTC CCA TTG GGT AGA AAG TTC
K Y T F W E V N L K E K F S A D L D Q F P L G R K F

TTG TTG CAG GCT GGA TTG AAG GCT AAG CCA AAG TTC ACT TTG GGA AAG AGA AAG GCT ACT CCT ACT ACT TCT TCC ACT
L L Q A G L K A K P K F T L G K R K A T P T T S S T

TCC ACT ACT GCT AAG AGA AAG AAG AGA AAA TTG TAA TAG TAG
S T T A K R K K R K L Stop Stop Stop

```

ANEXO B – Sequência de nucleotídeos do gene L2

L2 HPV 16

ATGCGACACAAACGTTCTGCAAAACGCACAAACGTCATCGGCTACCCAACCTTTATAAAACATGCAA
ACAGGCAGGTACATGTCCACCTGACATTATACCTAAGGTTGAAGGCAAACTATTGCTGAACAAATAT
TACAATATGGAAGTATGGGTGTATTTTTTGGTGGGTTAGGAATTGGAACAGGGTCGGGTACAGGCGGA
CGCACTGGGTATATTCCATTGGGAACAAGGCCTCCCACAGCTACAGATACACTTGCTCCTGTAAGACC
CCCTTTAACAGTAGATCCTGTGGGCCCTTCTGATCCTTCTATAGTTTCTTTAGTGGGAAGAACTAGTT
TTATTGATGCTGGTGCACCAACATCTGTACCTTCCATTCCCCCAGATGTATCAGGATTTAGTATTACT
ACTTCAACTGATACCACACCTGCTATATTAGATATTAATAATACTGTTACTACTGTTACTACACATAA
TAATCCCACCTTTCCTGACCCATCTGTATTGCAGCCTCCAACACCTGCAGAACTGGAGGGCATTTTTA
CACTTTCATCATCCACTATTAGTACACATAATTATGAAGAAATTCCTATGGATACATTTATTGTTAGC
ACAAACCCTAACACAGTAACTAGTAGCACACCCATACCAGGGTCTCGCCCAGTGGCACGCCTAGGATT
ATATAGTCGCACAACACAACAGGTTAAAGTTGTAGACCCTGCTTTTGTAACCACTCCCCTAACTTA
TTACATATGATAATCCTGCATATGAAGGTATAGATGTGGATAATACATTATTTTTCTAGTAATGAT
AATAGTATTAATATAGCTCCAGATCCTGACTTTTTGGATATAGTTGCTTTACATAGGCCAGCATTAAC
CTCTAGGCGTACTGGCATTAGGTACAGTAGAATTGGTAATAAACAACACTACGTACTCGTAGTGGA
AATCTATAGGTGCTAAGGTACATTATTATTATGATTTAAGTACTATTGATCCTGCAGAAGAAATAGAA
TTACAACTATAACACCTTCTACATATACTACCCTTACATGCAGCCTCACCTACTTCTATTAATAA
TGGATTATATGATATTTATGCAGATGACTTTATTACAGATACTTCTACAACCCCGGTACCATCTGTAC
CCTCTACATCTTTATCAGGTATATTTCCTGCAAATACAACAATTTCCTTTGGTGGTGCATACAATATT
CCTTTAGTATCAGGTCCTGATATACCCATTAATATAACTGACCAAGCTCCTTCATTAATTCCTATAGT
TCCAGGGTCTCCACAATATAACAATTATTGCTGATGCAGGTGACTTTTTATTACATCCTAGTTATTACA
TGTTACGAAAACGACGTAAACGTTTACCATATTTTTTTTTCAGATGTCTCTTTGGCTGCCTAG

L2 HPV 18

ATGGTATCCCACCGTGCCGCACGACGCAAACGGGCTTCGGTAACTGACTTATATAAAACATGTAAACA
ATCTGGTACATGTCCACCTGATGTTGTTCCCTAAGGTGGAGGGCACCACGTTAGCAGATAAAATATTGC
AATGGTCAAGCCTTGGTATATTTTTGGGTGGACTTGGCATAGGTACTGGCAGTGGTACAGGGGGTCGT
ACAGGGTACATTCCATTGGGTGGGCGTTCCAATACAGTGGTGGATGTTGGTCCTACACGTCCCCCAGT
GGTTATTGAACCTGTGGGCCCCACAGACCCATCTATTGTTACATTAATAGAGGACTCCAGTGTGGTTA
CATCAGGTGCACCTAGGCCTACGTTTACTGGCACGTCTGGGTTTGATATAACATCTGCGGGTACAAC
ACACCTGCGGTTTTGGATATCACACCTTCGTCTACCTCTGTGTCTATTTCCACAACCAATTTTACCAA
TCCTGCATTTTTCTGATCCGTCCATTATTGAAGTTCACAACTGGGGAGGTGGCAGGTAATGTATTTG
TTGGTACCCCTACATCTGGAACACATGGGTATGAGGAAATACCTTTACAAACATTTGCTTCTTCTGGT
ACGGGGGAGGAACCCATTAGTAGTACCCCATTCCTACTGTGCGGCGTGTAGCAGGTCCCCGCCTTTA
CAGTAGGGCCTACCAACAAGTGTGAGTGGCTAACCTGAGTTTCTTACACGTCCATCCTCTTTAATTA
CATATGACAACCCGGCCTTTGAGCCTGTGGACACTACATTAACATTTGATCCTCGTAGTGATGTTCCCT
GATTCAGATTTTATGGATATTATCCGTCTACATAGGCCTGCTTTAACATCCAGGCGTGGGACTGTTTCG
CTTTAGTAGATTAGGTCAACGGGCAACTATGTTTACCCGCAGCGGTACACAAATAGGTGCTAGGGTTC
ACTTTTATCATGATATAAGTCCATTATGCACCTTCCCCAGAATATATTGAACTGCAGCCTTTAGTATCT
GCCACGGAGGACAATGACTTGTGTTGATATATATGCAGATGACATGGACCCTGCAGTGCCTGTACCATC
GCGTTCTACTACCTCCTTTGCATTTTTTTAAATATTGCCCCACTATATCTTCTGCCTCTTCCTATAGTA
ATGTAACGGTCCCTTTAACCTCCTCTTGGGATGTGCCTGTATACACGGGTCCTGATATTACATTACCA
TCTACTACCTCTGTATGGCCCATTTGTATCACCACGGCCCCCTGCCTCTACACAGTATATTGGTATACA
TGGTACACATTATTATTTGTGGCCATTATATTATTTTATTCCTAAGAAACGTAAACGTGTTCCCTATT
TTTTTGCAGATGGCTTTGTGGCGGCCTAG

ANEXO C – Sequência de nucleotídeos do gene L2 Multimérico com cotons otimizados para *Escherichia coli*

CTC GAG CAT ATG TCG AGC TCG AAA CGC GCA TCG GCT ACG CAA CTG TAT AAA ACG TGT AAA GGT GCT GGC ACC
 L E H M S S S K R A S A T Q L Y K T C K G A G T

TGC CCG CCG GAC ATC ATC CCG AAA GTG GAA GGC AAA ACC ATT GCA GAT GGT ATC CTG CAG TAT GGC AGC ATG
 C P P D I I P K V E G K T I A D G I L Q Y G S M

GGT GTG TTT TTC GGC GGT CTG GGC ATT GGT ACG GGT TCT GGC ACC GGC GGT CGT ACG GGT TAC ATC CCG CTG
 G V F F G G L G I G T G S G T G G R T G Y I P L

GGC ACC CGC CCG CCG ACC GCG ACG GAT ACC CTG GCA CCG GGT CCG GGT CCG GGT CGT GCA TCA GTG ACC GAC
 G T R P P T A T D T L A P G P G P G R A S V T D

CTG TAT AAA ACG TGC AAA CAG TCG GGC ACC TGT CCG CCG GAT GTG GTT CCG AAA GTT GAA GGC ACC ACG CTG
 L Y K T C K Q S G T C P P D V V P K V E G T T L

GCT GAC AAA ATT CTG CAA TGG TCT TCT CTG GGC ATT TTT CTG GGC GGT CTG GGT ATC GGC ACC GGT AGT GGT
 A D K I L Q W S S L G I F L G G L G I G T G S G

ACG GGC GGT CGT ACC GGC TAT ATC CCG CTG GGC GGT CGT AGC AAC ACC GTC GTG GAT GTG GGT CCG ACG CGT
 T G G R T G Y I P L G G R S N T V V D V G P T R

GGT CCG GGT CCG GGT CGC GCA AGC GCT ACC GGC CTG TAC GGC ACG TGC AAA GCA ACG GGC ACC TGT CCG CCG
 G P G P G R A S A T G L Y G T C K A T G T C P P

GAT GTT ATT CCG AAA GTC GAA GGC AGC ACC ATT GCC GAC GGT ATC CTG AAA TAT GGC TCT CTG GGT GTC TTT
 D V I P K V E G S T I A D G I L K Y G S L G V F

TTC GGT GGC CTG GGC ATT GGC ACC GGT TCA GGT TCG GGC GGT CGC ACC GGT TAC GTG CCG ATC GGC ACC ACG
 F G G L G I G T G S G S G G R T G Y V P I G T T

CCG CCG ACC GCA GCC ATT CCG CTG CAG CCG ATC GGC CCG GGC CCG GGT CGT GCG AGT GCC ACC GGC CTG TAT
 P P T A A I P L Q P I G P G P G R A S A T G L Y

GGC ACG TGC AAA GCA TCC GGT ACG TGC CCG CCG GAT GTG ATC CCG AAA GTG GAA GGC ACC ACG ATT GCT GAC
G T C K A S G T C P P D V I P K V E G T T I A D

CAA ATC CTG CGT TAT GGC AGT CTG GGT GTG TTT TTC GGT GGT CTG GGT ATC GGT ACG GGT TCC GGC ACC GGC
Q I L R Y G S L G V F F G G L G I G T G S G T G

GGT CGC ACG GGT TAC GTC CCG CTG GGT AGC ACC CCG CCG TCT GAA GCG ATC CCG CTG CAG CCG ATC GGT CCG
G R T G Y V P L G S T P P S E A I P L Q P I G P

GGC CCG GGC CGT GCA TCA GCT ACC CAA CTG TAT GGC ACC TGC AAA GCG AGC GGC ACG TGC CCG CCG GAT GTC
G P G R A S A T Q L Y G T C K A S G T C P P D V

ATT CCG AAA GTG GAA GGC ACC ACG ATC GCC GAC CAG CTG CTG AAA TAT GGC AGC CTG GGC GTG TTT TTC GGC
I P K V E G T T I A D Q L L K Y G S L G V F F G

GGC CTG GGT GTC GGC ACC GGT GCA GGT AGT GGC GGT CGT GCT GGT TAC GTT CCG CTG TCC ACC CGT CCG CCG
G L G V G T G A G S G G R A G Y V P L S T R P P

ACG AGT TCC ATT ACC ACG TCT ACG ATT TCG GTA CCC GGT CCG GGT CCG GGT **CAT CAT CAT CAT CAT CAT** TCG
T S S I T T S T I S V P G P G P G **H H H H H H** S

GTA CCC TGA CCA TGG
V P **STOP** P G

SÚMULA CURRICULAR

Dados Pessoais

Nome: Agtha de Alencar Muniz Chaves

Local e data de nascimento: 04/01/1981 – Osasco – São Paulo – Brasil

Formação Acadêmica

2002 – 2005

Graduação em Ciências Biológicas

Licenciatura/Bacharelado

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho,

UNESP, São Paulo, Brasil.

2007 – 2009

Especialização em Biotecnologia em Saúde

Programa de Aperfeiçoamento Profissional.

Instituto Butantan

Bolsista da Fundação do Desenvolvimento Administrativo.

2009 – 2012

Mestrado, Programa de Ciências Biológicas (Bioquímica)

Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil.

Orientador: Paulo Lee Ho

Bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

Formação Complementar

2002 – 2005

Iniciação Científica

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP,

São Paulo, Brasil.

Orientadora: Dr^a Regina Coeli Cunha Dórea

Publicações

- 1) Dórea RCC, Barboza-Filho CG, Moreira DF, Mirian Guirro, Chaves AAM, Dunder RJ, Soares EA, Santos-Júnior V; Spinosa W. Behavior of *Leishmania major* metacyclic promastigotes during the course of infection and immune response development in resistant versus susceptible hosts. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2003; 34:17-20, 2003.
- 2) Bazan, SB; de Alencar Muniz Chaves, A; Aires, KA; Cianciarullo, AM; Garcea, RL.; Ho, PL. Expression and characterization of HPV-16 L1 capsid protein in *Pichia pastoris*. *Archives of Virology*, 2009; 154(10):1609-1617,.
- 3) Cianciarullo AM, Szulczewski V, Chaves AAM, Bazan SB, Aires KA, Müller M, Armbruster-Moraes E. Production of HPV16 L1L2 VLPs in cultures of human epithelial cells. *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education*. 2010; 2:1073-1082.
- 4) Ching, ATC; Fávaro, RD; Lima, SS; Chaves, AAM; Lima, MA; Nader, HB; Abreu, PAE; Ho, PL. *Lepstospira interrogans* shotgun phage display identified LigB as a heparin-binding protein. 2012 [artigo aceito para publicação].