LILIANE MARIA FERNANDES DE OLIVEIRA

**Avaliação imunológica da vacina proteica E6E7
fusionada à Ubiquitina contra câncer cervical
induzido por HPV16**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo
2012

LILIANE MARIA FERNANDES DE OLIVEIRA

**Avaliação imunológica da vacina proteica E6E7
fusionada à Ubiquitina contra câncer cervical
induzido por HPV16**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Paulo Lee Ho

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2012

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

reprodução não autorizada pelo autor

Oliveira, Liliane Maria Fernandes de.

Avaliação imunológica da vacina proteica E6E7 fusionada à Ubiquitina contra câncer cervical induzido por HPV16 / Liliane Maria Fernandes de Oliveira. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Lee Ho.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Desenvolvimento de vacina contra HPV.

Versão do título para o inglês: Immunological evaluation of E6E7 protein vaccine fused to Ubiquitin against cervical cancer induced by HPV16.

1. HPV16 2. Câncer cervical 3. Vacina Terapêutica 4. Ubiquitina
5. Proteína E6 6. Proteína E7 I. Lee Ho, Prof. Dr. Paulo II.
Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0185/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Liliane Maria Fernandes de Oliveira.

Título da Avaliação imunológica da vacina proteica E6E7 fusionada à
Ubiquitina contra câncer cervical induzido por HPV16.

Orientador(a): Prof. Dr. Paulo Lee Ho.

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

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA

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

Aos meus pais e às minhas irmãs pelo
apoio e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Paulo Lee Ho pelo incentivo, pela confiança e por esses anos de discussão e muito aprendizado.

Aos pesquisadores do laboratório Dr. Enéas, Dra. Eliane Miyaji, Dra. Maria Leonor, Dra. Josefa pelos conselhos e por me auxiliarem em muitas etapas deste trabalho.

À Mirian Morale por ter iniciado os estudos com algumas vacinas deste trabalho, estudos estes que tive orgulho de dar continuidade.

A todos os professores e colegas da Pós-graduação por participarem da minha formação e à professora Dra. Marilene Demasi e ao Dr. Luís Carlos Ferreira pela colaboração neste trabalho.

Aos meus colegas e amigos do laboratório Fernanda, Henrique, Vivian, Ana, Regiane, Juliana, Leo Kobashi, Ju IC, Cintia, Cynthinha, Patrícia, Carolina, Lívia, Nídia, Aline, Izilda, Marília, Giovana, que tornaram os dias e as noites de trabalho sempre gratificantes e engraçadas. À Agatha pelas trocas de conhecimentos e por ser sempre prestativa.

Aos colegas vizinhos de laboratório, em especial ao Leo Farias, à Mariana Diniz, ao Adrian e à Aline Soriano Lopes por me auxiliarem em alguns experimentos.

À minha amiga Swiany ou Hermione pela ajuda, pelos ensinamentos, pelas críticas sempre construtivas, pela companhia nos almoços, pela acolhida, obrigada por tudo.

Às minhas amigas Luciane, Carol e Adriana por compartilharem alegrias, mimimis, happy hours. Na companhia de vocês este trabalho foi uma diversão.

Um agradecimento especial aos meus pais e irmãs, pelo apoio, pela compreensão. Sou eternamente grata por tudo que vocês fazem por mim.

À Fapesp, ao CNPQ, à Fundação Butantan e Instituto Butantan pelo apoio financeiro.

A todos os meus mais sinceros agradecimentos.

RESUMO

Fernandes LMO. Avaliação imunológica da vacina proteica E6E7 fusionada à Ubiquitina contra câncer cervical induzido por HPV16. [dissertação (Mestrado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Responsável pela morte de 250 mil mulheres por ano, o câncer do colo do útero é considerado o terceiro tipo de câncer mais comum entre as mulheres, sendo a infecção por HPV16 o principal fator de risco para sua etiopatogênese. As oncoproteínas E6 e E7 do HPV16, envolvidas no descontrole da proliferação e transformação celular, têm sido de especial interesse para o desenvolvimento de vacinas terapêuticas. Em vista disso, nosso objetivo foi avaliar em camundongos o potencial profilático e terapêutico contra tumor da vacina proteica E6E7, constituída de epítomos imunogênicos de E6 e E7, sem ou com Ubiquitina fusionada na sua extremidade C-terminal (E6E7Ub). A vacina E6E7 em modelo profilático e em regime de três doses vacinais conferiu total proteção à formação de tumores em animais C57BL/6 selvagens, nocautes para CD4 e TLR4 deficientes, desafiados com células TC-1. Entretanto, quando a Ubiquitina é fusionada no C-terminal de E6E7 (E6E7Ub), observou-se uma redução na eficácia da vacina na prevenção ao tumor, apresentando E6E7Ub 60% de efeito protetor em animais selvagens. A resposta imune gerada pela vacinação com E6E7 ou E6E7Ub mostrou-se dependente de linfócitos T CD8⁺ e independente de linfócitos T CD4⁺, e *in vitro* foi possível verificar a ativação de células T específicas para E6 e/ou E7. Na tentativa de melhorar a resposta adjuvante de Ubiquitina, testamos uma vacina proteica em que a Ubiquitina foi fusionada no N-terminal de E6E7 (UbE6E7). Essa nova construção, UbE6E7, no ensaio de imunização profilática em regime de três doses vacinais, foi capaz de proteger contra o desenvolvimento do tumor 80% dos animais. No experimento de modelo terapêutico em que a vacinação com três doses foi iniciada após três dias do desafio com células TC-1, não foi observada diferença significativa de efeito terapêutico contra o tumor dos antígenos E6E7, E6E7Ub e UbE6E7, apresentando estas vacinas eficácia terapêutica de 80-100%. Porém, quando realizada a imunização em estágio mais avançado de desenvolvimento tumoral, após sete dias do desafio, a fusão da Ubiquitina na extremidade N-terminal (UbE6E7) promoveu 60% de proteção terapêutica, enquanto E6E7Ub a proteção foi de 40% e de E6E7 foi nula. *In vitro*, a vacina UbE6E7 parece ter sido acentuadamente poliubiquitinada, o que reforça a hipótese de que esta estratégia de fusão da Ubiquitina ao antígeno em vacina proteica aumenta a cinética de degradação do antígeno pelo proteassomo 26S e, consequentemente, induz a apresentação dos epítomos a linfócitos T citotóxicos por moléculas MHC I, sendo promissora para o desenvolvimento de vacinas terapêuticas contra neoplasias cervicais e também contra outros tipos de câncer ou doenças que necessitem de uma resposta imune mediada por linfócitos T CD8⁺.

Palavras-chave: HPV16. Câncer cervical. Vacina terapêutica. Ubiquitina. Proteína E6. Proteína E7.

ABSTRACT

Fernandes LMO. Immunological evaluation of E6E7 protein vaccine fused to Ubiquitin against cervical cancer induced by HPV16. [Master thesis (Biotechnology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

The cervical cancer is the third most common cancer among women worldwide and HPV infection is a major risk factor for its etiopathogenesis. The HPV16 is the most commonly identified papilloma type in cervical cancer. The E6 and E7 oncoproteins, involved in uncontrolled proliferation and cellular transformation, have been of particular interest for the development of therapeutic vaccines. In view of this, we evaluated in mice the prophylactic and therapeutic potential of an E6E7 protein vaccine, consisting of a string of immunogenic HPV16 E6 and E7 epitopes, with or without Ubiquitin fused at its C-terminus (E6E7Ub). The E6E7 vaccine, when administered in a three-dose vaccine regimen in the prophylactic model, induced complete protection against tumor growth in C57BL/6 wild-type, CD4 knockout and TLR4-deficient mice challenged with TC-1 cells. However, the fusion of Ubiquitin at C-terminus of E6E7 (E6E7Ub) reduced the vaccine effectiveness to 60% in wild-type animals. The protection generated by immunization with E6E7 or E6E7Ub was CD8⁺T-cell-dependent and CD4⁺T-cell-independent and the activation of E6 and E7-specific IFN- γ -producing T cells could be verified *in vitro*. In an attempt to improve the adjuvant effects of Ubiquitin, we developed a protein vaccine in which Ubiquitin was fused to N-terminus of E6E7 (UbE6E7). This new construction, UbE6E7, when administered in a three-dose vaccine regimen, was able to inhibit tumor growth in 80% of mice. In the therapeutic model, in which the mice were vaccinated three days after challenge with TC-1 cells, there was no significant difference in the therapeutic effect against tumor between E6E7, E6E7Ub and UbE6E7, showing therapeutic efficacy of 80-100 %. In the advanced stages of tumor growth (seven days after challenge with TC-1 cells), Ubiquitin fused to N-terminus (UbE6E7) promoted an effective immunotherapeutic response against the tumor. The vaccine UbE6E7 seems to be highly polyubiquitinated *in vitro*, which reinforces the hypothesis that this Ubiquitin-antigen fusion strategy as a proteic antigen vaccine increases the degradation kinetics of antigens by the 26S proteasome, enhancing the presentation of epitopes to cytotoxic T lymphocytes by MHC I molecules, representing a promise for the development of therapeutic vaccines for cervical cancer as well as for other type of cancers and diseases that depends on CD8⁺ T cell responses.

Keywords: HPV16. Cervical cancer. Therapeutic vaccines. Ubiquitin. E6 protein. E7 protein

LISTA DE ABREVIATURAS

ACK - Ammonium-Chloride-Potassium

APC – célula apresentadora de antígeno

BTZ – bortezomibe

CDKs: quinases dependentes de ciclina

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

EGFR – *epidermal growth factor receptor* (Receptor do fator de crescimento epidermal)

Elispot - *Enzyme-linked immunosorbent spot*

HLA - *human leukocyte antigen* (antígeno leucocitário humano)

HPV – *Human papillomavirus* (papilomavírus humano)

HSP60 - 60 kDa *heat shock protein* (proteína de choque térmico de 60 kDa)

IFN- γ - interferon-gama

IL - interleucina

IPTG - isopropyl- β -D-Thiogalactopyranoside

LB – meio Luria Bertani

LPS – lipopolissacarídeo

MHC - *major histocompatibility complex* (complexo principal de histocompatibilidade)

NIC – neoplasia intraepitelial cervical

PBMC - peripheral blood mononuclear cell (células mononucleares do sangue periférico)

PBS – phosphate buffered saline (tampão fosfato-salina)

PCR – *polymerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase)

PE – ficoeritrina

Percp - *peridinin chlorophyll protein*

PM – padrão de massa molecular

pRb – proteína do Retinoblastoma

SDS-PAGE – *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

SFB – soro fetal bovino

TAP – *transport associate protein* (transportador associado ao processamento de antígenos)

Th1 – *T helper cell type I* (células T auxiliares do tipo 1)

TLR – *toll Like receptor* (receptor do tipo toll)

Tregs – células T reguladoras

Ub – Ubiquitina

VLP – *Virus-like-particles* (partículas semelhantes a vírus)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação esquemática do genoma do HPV 16.....	14
Figura 2 - Representação esquemática do ciclo do HPV e sua associação com a progressão para o câncer cervical.....	17
Figura 3 - Apresentação de antígenos aos CLTs via MHC classe I.....	25
Figura 4 - Poliubiquitinação de proteínas.....	31
Figura 5 - Esquema da fusão gênica entre regiões da proteína E6 e E7 do HPV16 com Ubiquitina.....	39
Figura 6 - Esquema do vetor de expressão em <i>E.coli</i> , pAE contendo o gene E6E7Ub no sítio de múltipla clonagem (MCS).....	40
Figura 7 - Esquema da construção do vetor pAE-E6E7.....	41
Figura 8 - Esquema da construção do vetor pAE-Ub.....	46
Figura 9 - Esquema da construção do vetor pAE-UbE6E7.....	55
Figura 10 - Gel de agarose da digestão do vetor pAE-E6E7Ub com EcoRI para formação do vetor pAE E6E7.....	58
Figura 11 - Gel de agarose da digestão do vetor pGEM-T- Ub com EcoRI e HindIII.....	59
Figura 12 - Gel de agarose da digestão do vetor pAE-UbE6E7 com NdeI e BamHI.....	59
Figura 13 - SDS-PAGE da expressão dos antígenos proteicos recombinantes E6E7, E6E7Ub, Ub e UbE6E7.....	60
Figura 14 - SDS-PAGE da solubilização dos antígenos.....	61
Figura 15 - SDS-PAGE dos antígenos recombinantes purificados.....	61
Figura 16 - Identificação de peptídeos dos antígenos por espectrometria de massas.....	62
Figura 17 - Imunomarcção com anticorpo anti-ubiquitina.....	63
Figura 18 - Ensaios de imunização profilática em animais C57BL/6.....	64
Figura 19 - Ensaio de imunização profilática em animais TLR4-Deficiente.....	65
Figura 20 - Ensaio de imunização profilática em animais nocautes para CD4 ou para CD8.....	66
Figura 21 - Ensaio de imunização terapêutica em animais C57BL/6. Vacinação iniciada após três dias do desafio.....	68
Figura 22 - Ensaio de imunização terapêutica em animais TLR4-Deficiente.....	69
Figura 23 - Ensaio de imunização terapêutica em animais C57BL/6. Vacinação iniciada após sete dias do desafio.....	71
Figura 24 - Análise por citometria de fluxo de células T CD8 ⁺ produtoras de IFN- γ mediante estímulo <i>in vitro</i> de PBMC com peptídeos específicos de E6 e E7.....	73
Figura 25 - Análise por Elispot de células produtoras de IFN- γ mediante estímulo <i>in vitro</i> de PBMC com peptídeos específicos de E6 e de E7.....	74

Figura 26 - Análise por Elispot de células produtoras de IFN- γ de animais TLR4-Deficiente.....	75
Figura 27 - Análise por Elispot de células produtoras de IFN- γ de animais C57BL/6 selvagens.....	76
Figura 28 - Análise por Elispot de células produtoras de IFN- γ de animais C57BL/6 nocautes para CD4.....	77
Figura 29 - Degradação <i>in vitro</i> dos antígenos pelo proteassomo 20S.....	78
Figura 30 - Ensaio de poliubiquitinação dos antígenos E6E7, E6E7Ub e UbE6E7.....	79

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
<i>1.1 Papilomavírus humano</i>	<i>14</i>
<i>1.2 Ciclo de vida do HPV.....</i>	<i>16</i>
<i>1.3 Oncoproteínas E6 e E7</i>	<i>18</i>
<i>1.4 Câncer do colo do útero</i>	<i>19</i>
<i>1.5 Papilomavírus humano e o câncer do colo do útero.....</i>	<i>20</i>
<i>1.6 Progressão do câncer do colo do útero.....</i>	<i>21</i>
<i>1.7 Resposta imune do hospedeiro contra o HPV e contra o tumor.....</i>	<i>22</i>
<i>1.8 Estratégias de evasão do vírus e do tumor</i>	<i>23</i>
<i>1.9 Vacina profilática contra HPV</i>	<i>26</i>
<i>1.10 Vacina terapêutica contra lesões intraepiteliais e câncer cervical.....</i>	<i>27</i>
<i>1.11 Poliubiquitinação de proteínas</i>	<i>29</i>
<i>1.12 Vacina recombinante E6E7 fusionada à Ubiquitina.....</i>	<i>32</i>
2 OBJETIVOS	34
3 JUSTIFICATIVA	35
4 MATERIAL E MÉTODOS	36
<i>4.1 Linhagens</i>	<i>36</i>
<i>4.2 Vetores.....</i>	<i>37</i>
<i>4.3 Oligonucleotídeos.....</i>	<i>37</i>
<i>4.4 Meios de cultura</i>	<i>38</i>
<i>4.5 Construção do vetor pAE-E6E7Ub</i>	<i>38</i>
<i>4.6 Construção do vetor pAE-E6E7</i>	<i>40</i>
<i>4.7 Construção do vetor pAE-Ub</i>	<i>42</i>
<i>4.8 Construção do vetor pAE-UbE6E7</i>	<i>44</i>
<i>4.9 Expressão das proteínas em BL21(DE3)pLysS</i>	<i>45</i>
<i>4.10 Lise das bactérias e solubilização das proteínas.....</i>	<i>46</i>
<i>4.11 Purificação dos antígenos proteicos E6E7, E6E7Ub, UbE6E7 e Ubiquitina</i>	<i>46</i>
<i>4.12 Diálise dos antígenos proteicos.....</i>	<i>47</i>
<i>4.13 Quantificação dos antígenos</i>	<i>47</i>
<i>4.14 Caracterização dos antígenos</i>	<i>48</i>
<i>4.15 Cultura de células TC-1</i>	<i>49</i>

4.16 Cultura de células RAW 264.7	50
4.17 Ensaios de imunização profilática	50
4.18 Ensaios de imunização terapêutica	52
4.18.1 Vacinação após 3 dias do desafio	52
4.18.2 Vacinação após 7 dias do desafio	53
4.19 Ensaio de marcação intracelular de IFN- γ	54
4.20 Elispot	55
4.21 Ensaios de degradação pelo PT20S e de poliubiquitinação dos antígenos	55
4.21.1 Degradação pelo PT20S.....	56
4.21.2 Ensaio de poliubiquitinação	56
5 RESULTADOS	58
5.1 Clonagem, expressão, purificação e caracterização de E6E7, E6E7Ub, UbE6E7 e Ubiquitina	58
5.1.1 Construção dos vetores pAE-E6E7Ub, pAE-E6E7, pAE-Ub e pAE-UbE6E7.....	58
5.1.2 Expressão e purificação dos antígenos E6E7, E6E7Ub, UbE6E7 e Ubiquitina	60
5.1.3 Caracterização das proteínas	62
5.2 Imunização com antígenos E6E7, E6E7Ub, UbE6E7 e Ubiquitina	63
5.2.1 Ensaios de imunização profilática	63
5.2.2 Ensaios de imunização terapêutica	67
5.3 Avaliação da resposta imune celular induzida por E6E7 e E6E7Ub	72
5.3.1 Análise da indução de células T CD8+ específicas para E6 e/ou para E7	72
5.3.2 Detecção de células produtoras de IFN- γ	73
5.4 Caracterização preliminar da degradação e poliubiquitinação dos antígenos	77
6 DISCUSSÃO	80
7 CONCLUSÕES	87
REFERÊNCIAS	88

1 INTRODUÇÃO

1.1 Papilomavírus humano

Os HPV são vírus classificados atualmente na família Papillomaviridae. O capsídeo é icosaédrico, com um diâmetro de 50 a 60 nm e não é revestido por envelope lipídico. Seu genoma é composto por um DNA dupla fita, circular, que contém cerca de 8.000 pares de bases (Buck et al., 2008).

O genoma desse vírus é dividido em região reguladora (LCR - *long control region*), que contém a origem de replicação (ORI) e a maioria dos promotores de transcrição, e em regiões codificadoras que são denominadas ORF (*open reading frame*), e são divididas nas regiões precoce e tardia, segundo a fase do ciclo viral em que seus genes são expressos. A região precoce (*Early Region*) contém sete genes (E1, E2, E4, E5, E6, E7 e E8) e a região tardia (*Late Region*), contém 2 genes (L1 e L2) (Southern, Herrington, 1998) (Figura 1).

A região precoce contém o DNA para a replicação viral (E1, E2), regulação da expressão (E2), montagem e liberação do vírus (E4) e imortalização e transformação celular (E5, E6 e E7). E3 e E8 não têm ação conhecida, estando presentes em apenas uma minoria dos papilomavírus. Os genes L1 e L2 codificam duas proteínas do capsídeo (Garland, 2002). As funções das proteínas codificadas por estes genes estão descritas no quadro 1.

Figura 1 - Representação esquemática do genoma do HPV 16

Fonte: Adaptada de Lie e Kristensen (2008)

Quadro 1 – Funções das proteínas do HPV16

	Genes	Função da proteína
Região Tardia	E1	Participa na replicação do DNA viral DNA Helicase
	E2	Controle da transcrição dos genes virais
	E4	Montagem e liberação das partículas virais
	E5	Estimula a proliferação celular Ativa EGFR
	E6	Previne a diferenciação celular Degradação da p53 Ativação da telomerase
	E7	Imortalização celular Inativação da pRb Previne a diferenciação celular
Região Tardia	L1	Formação do capsídeo viral
	L2	Formação do capsídeo viral

Nota: Abreviatura (Inglês):

EGFR: Receptor do fator de crescimento epidermal;

pRb: Proteína do retinoblastoma.

Fonte: Adaptada de Frazer (2004)

Diferentemente de outros grupos virais, os HPV não são referidos por sorotipos. Sua classificação em tipos distintos se baseia no grau de relação dos genomas virais. Considera-se um novo tipo de HPV quando o seu genoma apresenta variações maiores que 10% no gene L1 (De Villiers et al., 2004; Leto et al., 2011).

Atualmente, mais de 120 tipos de HPV foram descritos e todos parecem ser estritamente epiteliotrópicos. Eles são capazes de infectar o epitélio pavimentoso estratificado queratinizado da pele e o epitélio pavimentoso estratificado não queratinizado do trato anogenital e da laringe (Ault, 2006; Mahdavi, Monk, 2005).

Aproximadamente 40 tipos infectam a área genital. Destes, alguns têm potencial oncogênico, particularmente os HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 54, 56, 58, 59, 60 e 66 (Garland, 2002). Os demais tipos genitais, HPV 6, 11, 42, 43 e 44, são considerados de baixo risco ou sem qualquer risco oncogênico (Munoz et al., 2003) e podem causar verruga cutâneas, tumores verruciformes e verrugas anogenitais (Hildesheim et al., 1999).

A infecção pelo HPV é muito comum e acomete principalmente indivíduos jovens e com vida sexual ativa. Cerca de 80% da população feminina será infectada ao longo da vida (Weaver, 2006), sendo que metade dos novos casos acontece nos três primeiros anos de atividade sexual (Cox, 2006).

Estima-se que 99% dos casos de câncer cervical têm como etiologia a infecção por HPV. Além disso, estudos evidenciam a associação da infecção por HPV no desenvolvimento de câncer na vagina, vulva, ânus, pênis, além de carcinomas da mucosa oral, orofaríngea e laríngea (D'souza, Dempsey, 2011; Da Silva et al., 2007; Fox, 2006; Gillison, Shah, 2001; Schwartz et al., 2001), caracterizando um sério problema de saúde pública.

1.2 Ciclo de vida do HPV

O ciclo de vida do HPV está intimamente associado com a diferenciação das células do epitélio. Através de fissuras no epitélio (Figura 2), o vírus infecta as células basais do epitélio escamoso estratificado que possuem, além da atividade mitótica, um menor grau de diferenciação. À medida que se dividem as células basais migram em direção à superfície e tornam-se diferenciadas.

Primeiramente o HPV liga-se à membrana basal pela interação da proteína L1 à molécula de heparan sulfato e, posteriormente, o vírus penetra nas células pela interação das proteínas do capsídeo viral com receptores específicos da superfície celular (Kwak et al., 2011). Uma vez no interior da célula hospedeira, o genoma do HPV se estabelece na forma epissomal e replica-se simultaneamente com o DNA da célula.

As proteínas dos genes precoces do HPV, E6 e E7, são produzidas em baixa concentração nas camadas basal e suprabasal do epitélio sob regulação do gene E2 e coordenam um ambiente favorável na célula hospedeira para a replicação do DNA viral, assim como impedem a apoptose (Stanley, 2008). Além de E6 e E7, as proteínas codificadas pelos genes precoces (E1, E2, E4 e E5) são expressas, em baixa concentração, a fim de garantir a manutenção da replicação do epissoma viral (Middleton et al., 2003).

Para a produção dos vírus infecciosos, além de amplificar seu genoma viral, o papilomavírus deve empacotá-lo em partículas virais. Para tanto, os papilomavírus codificam as proteínas estruturais L1 e L2 nas células diferenciadas da superfície do epitélio, formando-se a partícula viral madura que é então liberada para a mucosa pela descamação do epitélio, longe da vigilância do sistema imune (Doorbar, 2005).

A resposta imune inata limitada, os baixos níveis de expressão das proteínas codificadas pelo gene viral no epitélio basal e a ausência de efeitos citopáticos, geralmente resultam numa resposta tardia do sistema imune adaptativo frente à infecção inicial por HPV, favorecendo assim o estabelecimento da infecção viral (Einstein et al., 2009).

Em lesões malignas associadas aos HPV de alto risco, o evento chave na progressão das neoplasias cervical de alto grau é a integração do DNA viral no genoma da célula infectada. Essa integração resulta na ruptura e perda de função do gene E2 (Figura 2) e, consequentemente, na superexpressão das proteínas dos genes E6 e E7, promovendo a transformação da célula hospedeira (Doorbar, 2005; Tindle, 2002).

Figura 2 – Representação esquemática do ciclo do HPV e sua associação com a progressão para o câncer cervical

O vírus HPV acessa as células basais do epitélio escamoso através de fissuras no epitélio. Após a infecção, inicia-se a expressão das proteínas da região precoce E1, E2, E4, E5, E6 e E7 e a replicação do DNA episossomal do vírus na camada suprabasal. Na camada superficial, o genoma viral é altamente replicado e há a expressão da proteína E4 e das proteínas L1 e L2, responsáveis pela montagem e liberação da partícula viral. A partícula viral madura é então liberada para a mucosa pela descamação do epitélio e inicia-se uma nova infecção. Durante a infecção persistente com HPV de alto risco pode ocorrer a integração do genoma viral no DNA do hospedeiro (núcleo em vermelho), que culmina na ruptura do gene E2 e subsequente superexpressão das oncoproteínas E6 e E7, promovendo a transformação da célula hospedeira e o desenvolvimento do câncer cervical.

Fonte: Adaptada de Woodman et al. (2007).

1.3 Oncoproteínas E6 e E7

HPV possui dois oncogenes, E6 e E7, que desempenham papel importante na carcinogênese (Munger et al., 2004). A proteína E6 liga-se a sítios específicos da proteína supressora de tumor p53 levando-a a degradação e à consequente perda tanto da resposta de apoptose da célula alterada quanto da regulação do ciclo celular (Scheffner et al., 1990).

Parecido com as funções de E6, as funções da oncoproteína E7 também são pleiotrópicas. A oncoproteína E7 liga-se a pRb (proteína do retinoblastoma), uma proteína que regula negativamente o ciclo celular por associar-se ao fator de transcrição E2F, prevenindo a progressão da fase G1 para a fase S. A ligação de E7 à pRb causa a liberação do fator E2F, o qual estimulará a transcrição de genes associados à replicação do DNA o que promoverá a proliferação desordenada da célula (Giarre et al., 2001; Tommasino, Crawford, 1995). Embora a inativação de p53 e pRb seja crucial para a oncogênese cervical associada à infecção por HPV, outras funções destas oncoproteínas também contribuem para a carcinogênese. E6, por exemplo, também é capaz de reativar a atividade da telomerase humana, resultando na imortalização da célula infectada (Klingelutz et al., 1996). Diversas atividades das proteínas E6 e E7 contribuem para a imortalização celular e para o desenvolvimento do câncer, e algumas dessas atividades estão resumidas no quadro 2.

Quadro 2 – Atividades das oncoproteínas E6 e E7

E6	E7
Prevenção da diferenciação celular	Prevenção da diferenciação celular
Degradação da p53	Ativação de ciclinas E e A
Efeito antiapoptótico	Inativação da pRb
Instabilidade do cromossomo	Indução da apoptose
Aumento da integração do DNA exógeno e da mutagênese	Aumento da integração do DNA exógeno e da mutagênese
Ativação da telomerase	Inibição de inibidores de CDKs

Nota: Abreviatura (Inglês):

pRb: Proteína do retinoblastoma;

CDKs: Quinases dependentes de ciclina.

Fonte: Adaptada de zur Hausen (2000)

1.4 Câncer do colo do útero

O câncer do colo do útero é o terceiro câncer mais comum em mulheres em todo o mundo. Segundo a Organização Mundial da Saúde, a cada ano são registrados cerca de 500.000 novos casos e cerca de 250.000 mortes por câncer do colo do útero. Só no Brasil são estimados para 2012 mais de 17.500 novos casos dessa doença, com um risco estimado de 17 casos a cada 100 mil mulheres, segundo o INCA (Instituto Nacional do Câncer, 2011).

Quase 80% dos novos casos ocorrem em países em desenvolvimento. Estima-se que o Carcinoma Cervical (CC) seja responsável por 15% dos tumores em mulheres nos países em desenvolvimento e para os países desenvolvidos esta taxa cai para 3,6%. As maiores taxas de câncer cervical foram observadas em regiões da África, América Central e América do Sul (Parkin et al., 2005). No Brasil, o câncer do colo do útero está entre os tumores mais incidentes na população feminina, inferior apenas aos casos de tumores de pele não melanoma (71 mil casos novos) e tumores da mama (53 mil novos casos) (INCA, 2011).

Na análise regional do país, o câncer do colo do útero se destaca como o primeiro mais incidente na região Norte do Brasil, com 23 casos por 100 mil mulheres. Nas regiões Centro-Oeste e Nordeste ocupa a segunda posição, com taxas de 20/100 mil e 18/100 mil, respectivamente, e é o terceiro mais incidente nas regiões Sudeste (21/100 mil) e Sul (16/100 mil) (INCA, 2009).

A incidência de câncer de colo uterino torna-se evidente na faixa etária de 20 a 29 anos e o risco aumenta rapidamente até atingir seu pico, geralmente na faixa etária de 50 a 60 anos (INCA, 2011).

O câncer do colo do útero é uma doença crônica caracterizada pela replicação desordenada do epitélio de revestimento do órgão, comprometendo o tecido subjacente (estroma) e no período médio de 5 a 6 anos pode evoluir para um quadro invasivo. Em cerca de 90% dos casos, evolui a partir de neoplasia cervical (NIC), mas nem toda NIC progride para um processo invasor (INCA, 2000).

As NIC podem ser divididas em NIC grau 1 (lesão de baixo grau), NIC grau 2 e NIC grau 3 (lesões de alto grau). As NIC 1 são alterações celulares que se restringem ao terço inferior do epitélio cervical e há baixo risco para a progressão agressiva. Cerca de 20% das lesões do tipo NIC I torna-se lesões de alto risco (NIC 2). Na NIC 2, as alterações chegam até o terço médio do epitélio cervical e na NIC 3, as alterações celulares ocupam todo o epitélio, incluindo o terço superior deste (Fernandes et al., 2004). Tanto na NIC 2 quanto na NIC 3 o genoma viral pode ser encontrado integrado no genoma da célula e são consideradas lesões

precursoras do câncer cervical. Cerca de 30% das lesões do tipo NIC 2 progridem para NIC3, e desta, cerca de 40% progridem para o câncer cervical (Peto et al., 2004).

O principal fator de risco para o desenvolvimento das Neoplasias Intraepiteliais Cervicais e do câncer cervical é a persistência da infecção pelos HPV de alto risco (Munoz et al., 2003). Outros fatores tais como, imunidade, genética, comportamento sexual, idade, tabagismo e uso de contraceptivo oral parecem influenciar na regressão, persistência da infecção e à progressão para lesões precursoras ou câncer (Burger et al., 1993; Pinto et al., 2002).

O diagnóstico precoce e o controle dessas neoplasias baseia-se, há mais de 40 anos, na observação de alterações morfológicas de esfregaços cervicais estabelecidos por George Papanicolaou. Em países onde o teste de Papanicolaou foi ampliado para a maior parte da população, observou-se uma diminuição significativa da incidência e mortalidade por esse tumor (Linhares, Villa, 2006).

1.5 Papilomavírus humano e o câncer do colo do útero

Na década de 80, o cientista alemão, Harald zur Hausen, verificou a presença do vírus HPV 16 e 18 em 70% das biopsias de pacientes com câncer cervical (Hausen, 1991). A descoberta da associação do HPV com o câncer cervical resultou, ao cientista Harald zur Hausen o prêmio Nobel de Medicina de 2008. A partir daí, diversos estudos têm mostrado que a infecção com tipos de HPV de alto risco pode levar a baixo ou a alto grau de neoplasias intraepiteliais.

A maioria das mulheres infectadas por tipos de HPV associados ao desenvolvimento do câncer cervical não desenvolve a doença devido à ação do sistema imune que combate a infecção em um período de 12 a 24 meses, após o diagnóstico inicial e sem nenhum tratamento. Em 10 a 30% dos casos a infecção por HPV persiste, aumentando o risco de desenvolvimento de NIC e câncer (Ho et al., 1993; Tabet et al., 1997).

HPV16 e HPV18 são os tipos mais frequentemente identificados no câncer cervical. O HPV16 é detectado em 40-60% dos cânceres cervicais e o HPV18 em 10-20%. A maioria dos demais cânceres cervicais contem DNA de outros tipos de HPV, tais como HPV31, HPV33 e HPV45 (Lowy et al., 1994).

Cerca de 20 anos é o tempo necessário para o desenvolvimento gradual do câncer invasivo (aquisição de HPV, infecção persistente, desenvolvimento de lesões precursoras do câncer e a invasão), embora haja casos em que se desenvolvem mais rapidamente (Hildesheim

et al., 1999). Isso reflete, em parte, o tempo necessário para eventos aleatórios genéticos (por exemplo, integração do HPV e acumulação de mutações nos genes das células infectadas por HPV). O efeito oncogênico do HPV nas células é exercido através de duas oncoproteínas virais precoces E6 e E7 e parte de E5 dos HPV de alto risco (Zur Hausen, 2000). Essas oncoproteínas perturbam diversos mecanismos de regulação da célula hospedeira, permitindo assim que as células infectadas se repliquem de forma descontrolada (Duensing, Munger, 2004; Munger, Howley, 2002).

1.6 Progressão do câncer do colo do útero

As mulheres que apresentam infecção persistente por tipos de HPV de alto risco, especialmente por HPV16 e HPV18, são consideradas os verdadeiros grupos de risco para o desenvolvimento do câncer cervical (Bosch et al., 2002; Rama et al., 2008).

O genoma do HPV pode replicar-se como um epissomo extra-cromossomal em lesões benignas associadas aos HPV de baixo risco, e em displasias leves e moderadas associadas aos HPV de alto risco (Garland, 2002).

No caso de uma infecção persistente os genomas que estão mantidos de forma epissomal podem se integrar no genoma da célula do hospedeiro, causando alterações morfológicas na célula, no controle do ciclo celular e levando a lesões precursoras (Rosa et al., 2009) (Figura 2).

O sítio de integração viral, geralmente ocorre próximo às regiões reguladoras da transcrição de E1 e E2. Este processo leva a um aumento da expressão das proteínas virais E6 e E7, que além de controlar o ciclo celular, essas oncoproteínas modulam o sistema imune de forma que as células tumorais tornam-se pouco imunogênicas, podendo acarretar até na tolerância imunológica ao tumor (Garland, 2002; Tindle, 2002).

A expressão de oncoproteínas E6 e E7 de HPV de alto risco pode, em parte, induzir instabilidades genéticas no DNA da célula do hospedeiro. Agentes mutagênicos químicos e físicos também devem interagir cooperativamente no desenvolvimento dessas mudanças. Assim, a integração do DNA viral contribui ainda mais na alteração do DNA da célula hospedeira.

1.7 Resposta imune do hospedeiro contra o HPV e contra o tumor

A maioria dos indivíduos imunocompetentes infectados com HPV, é capaz de eliminar o vírus, sem maiores consequências e mesmo nos casos de infecções persistentes verifica-se a regressão espontânea das lesões de menor gravidade (Schwartz et al., 2001).

Esses fatos, que somados ao aumento e/ou persistência das lesões cervicais associadas às infecções por HPV de alto risco em pacientes imunodeprimidos apontam para o envolvimento da imunidade humoral e celular do hospedeiro em resposta à infecção viral (Hagensee et al., 2004).

Para algumas lesões progressivas do colo do útero, o sistema imunológico não pode ser ativado após a integração de genoma viral no DNA da célula hospedeira e de outros eventos celulares. Esse comprometimento da resposta imune para resolver a lesão maligna contribui para a transformação maligna e o desenvolvimento do câncer (Duggan-keen et al., 1998).

Estudos sorológicos em mulheres infectadas com HPV16 avaliaram a soropositividade para as proteínas do capsídeo viral, e verificaram que 50% a 60% das mulheres tinham anticorpos séricos contra a proteína L1 do HPV16, demonstrando uma boa correlação com a resposta humoral nas mucosas (Carter et al., 2000). A descoberta de que a proteína L1 é capaz de organizar-se em VLPs (*virus like particles*), quando produzidas em sistema heterólogo de expressão, mas sem o DNA do vírus, possibilitou o desenvolvimento das vacinas profiláticas contra HPV (Christensen et al., 1994).

Embora a neutralização das proteínas do capsídeo viral pelos anticorpos contribua na prevenção da infecção, a resposta imune contra a infecção crônica, de uma forma geral é mediada por uma resposta imune celular, principalmente por linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. Além de seus efeitos diretos, as células T CD4⁺ são necessárias tanto para sustentar as respostas de células T CD8⁺ como para ativar as células do sistema inato, possuindo um papel importante na cura da infecção por HPV (Harari et al., 2006; Zajac et al., 1998).

As células T CD8⁺ são o principal mecanismo de defesa imune contra tumores. Não só são capazes de lisar as células tumorais que expõe na sua membrana fragmentos do antígeno do tumor ligados ao complexo principal de histocompatibilidade, MHC de classe I, mas também secretam mediadores celulares, como o interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Tanto IFN- γ quanto TNF- α têm potentes efeitos antitumorais (Lamikanra et al., 2001; Prevost-Blondel et al., 2000).

Regressão da infecção por HPV está associada a uma resposta imune, mediada por citocinas do tipo Th1 (IL-2, IFN- α e TNF- α) (Grassegger et al., 1997) que é caracterizada por um massivo infiltrado de células mononucleares, regulação positiva de moléculas de adesão, e apoptose de queratinócitos infectados, sugerindo que este perfil de resposta imune tem um importante papel na defesa do hospedeiro (Evans et al., 1997).

Em vários cânceres humanos, um elevado número de linfócitos infiltrados no tumor (TIL) foi associado à maior sobrevivência dos pacientes. Outros estudos, ao contrário, sugerem que as células tumorais atraem células inflamatórias e que o número elevado de TIL esteja associado com a redução da sobrevida dos pacientes. Assim, o resultado clínico pode não ser dependente do número total de células infiltradas, mas sim do tipo de células do sistema imunológico presentes (por exemplo, células citotóxicas T CD8⁺, células T CD4⁺ e células T reguladoras). Estudos demonstraram que uma alta relação de células T CD8⁺/CD4⁺ está associada à regressão tumoral, sendo, portanto, um indicativo de um satisfatório resultado clínico para terapia do câncer cervical e câncer no geral (Diederichsen et al., 2003; Kondratiev et al., 2004; Piersma et al., 2007).

Foi demonstrado que as células T reguladoras (Tregs), com o fenótipo CD4⁺ CD25⁺ expressando o fator de transcrição Foxp3 que secreta IL-10 e TGF- β , estão associadas com a progressão e prognóstico desfavorável de vários tipos de câncer epitelial (Kobayashi et al., 2007; Petersen et al., 2006), incluindo o câncer cervical (Piersma et al., 2007), baseado no fato de que a prevalência de células T reguladoras foi significativamente maior nas mulheres com carcinoma do que no tecido normal (Woo et al., 2008). Foi demonstrado que a alta taxa intraepitelial de CD8⁺/Treg é fundamental para sobrevivência de pacientes com câncer cervical, sugerindo que uma expressiva infiltração de células T CD8⁺ pode superar os mecanismos de evasão do tumor (Jordanova et al., 2008).

1.8 Estratégias de evasão do vírus e do tumor

Os mecanismos de evasão viral e tumoral do sistema imune permitiram ao papilomavírus humano se tornar uma das infecções sexualmente transmissíveis mais comuns em todo o mundo e o câncer do colo do útero ser um dos tumores mais incidentes na população feminina.

O ciclo de vida do HPV evoluiu de maneira a evitar o reconhecimento imunológico e, dessa forma, promover a persistência da infecção. A capacidade de se replicar sem induzir citólise ou necrose celular (ciclo de vida não lítico), ausência de sinais inflamatórios, e o

controle estrito da expressão gênica viral nas camadas basais, limitam a ação das células de Langerhans (células apresentadoras de antígeno – APCs) sobre os linfonodos regionais, impedindo a apresentação antigênica e inibindo a resposta imune do tipo específica (Einstein et al., 2009; Stanley, 2009).

A ativação incompleta de APCs promove um fenômeno conhecido como tolerância imunológica, no qual a resposta imune primária não ativa células T específicas contra o agente patogênico, resultando na proliferação de linfócitos tolerantes que são incapazes de responder a uma exposição subsequente ao antígeno, mesmo em um ambiente de ativação. A fim de atacar o câncer, imunoterapias enfrentam vários desafios para superar esses grandes obstáculos e quebrar este meio tolerogênico.

Células T reguladoras (Treg) $CD4^+$, outro subgrupo de células T, tem um importante papel na tolerância a antígenos próprios, prevenindo as reações auto-imunes, especificamente pela supressão das respostas imunes. A presença de células Treg em lesões cervicais pode impedir uma resposta imune efetiva contra infecções por HPV e promover a persistência e o potencial para desenvolver lesões pré-cancerosas (Einstein et al., 2009). Células Treg têm sido associadas com várias formas de infecção por HPV, persistência e lesões de alto grau (Piersma et al., 2007; Van Der Burg et al., 2007).

Outros mecanismo do HPV em subverter a resposta imune inata do hospedeiro é a regulação negativa do receptor do tipo Toll 9 (TLR9) pelas oncoproteínas E6 e E7, que limita a capacidade de TLR9 de induzir a expressão de genes pró-inflamatórios essenciais para ativação da resposta imune a infecção viral. Além disso, as oncoproteínas E6 e E7 interagem diretamente com componentes das vias de sinalização do $IFN-\alpha$, inibindo-as (Barnard, Mcmillan, 1999; Ronco et al., 1998). Esta estratégia de evasão poderia promover o estabelecimento da infecção persistente dos vírus dos tipos de alto risco (Einstein et al., 2009).

O vírus HPV tem a capacidade de suprimir um resposta de linfócitos T citotóxicos (CTL) através da baixa expressão do transportador associado ao processamento de antígenos (TAP), necessários para a apresentação de antígenos aos CTLs via MHC classe I (Figura 3) (Cromme et al., 1993; Vambutas et al., 2000; Vambutas et al., 2001). Essa intervenção poderia explicar a redução da apresentação dos peptídeos do HPV por MHC I em células infectadas (Einstein et al., 2009).

A oncogenicidade do vírus também está relacionada à sua capacidade de escapar da vigilância imunológica do hospedeiro, atuando sobre a modulação das citocinas. Como por exemplo, o $TNF-\alpha$ e interleucina 10 (IL-10) são citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, respectivamente, e são importante na regulação da função das células de

Langerhans. No decorrer do desenvolvimento da neoplasia cervical verificou-se uma mudança no padrão de expressão destas citocinas - acentuada expressão de IL-10 e o decaimento da expressão do TNF- α , favorecendo, dessa forma, a evolução das lesões intraepiteliais cervicais (Einstein et al., 2009; Mota et al., 1999).

Figura 3 - Apresentação de antígenos aos CLTs via MHC classe I

(a) Na via clássica de apresentação de antígeno, os antígenos intracelulares são poliubiquitinados e b) degradados no proteassomo 26S. c) Uma fração resultante dos peptídeos associa-se com o transportador associado ao processamento de antígenos (TAP) na membrana do retículo endoplasmático d) no qual moléculas de MHC de classe I recém-sintetizadas são presas até serem carregadas com peptídeos. e) As cadeias α e β_2 -microglobulina da molécula MHC I são sintetizadas ao longo do retículo endoplasmático (ER) por um processo que envolve inúmeros passos e participação de chaperonas, como BiP, calreticulina e ERp57. f) O complexo MHC classe I-peptídeo, em seguida, deixa o ER e é transportado para a membrana plasmática. g) A ligação do complexo MHC I-peptídeo ao receptor de antígenos de células T (TCR) citotóxicas estimula a proliferação dos linfócitos e a lise da célula alvo.

Fonte: Adaptada de Klotzel (2001).

1.9 Vacina profilática contra HPV

As estratégias atuais para o desenvolvimento seguro e eficaz de vacinas profiláticas contra HPV são baseadas na indução de anticorpos neutralizantes contra as proteínas do capsídeo do HPV, L1 e L2. Hoje duas vacinas estão disponíveis no mercado e são administradas em três doses num período de 6 meses, sendo o custo de cada dose de aproximadamente R\$ 350,00. Ambas as vacinas são compostas pela proteína L1 do capsídeo do HPV que se auto-organiza em VLPs (virus-like particles), que quando expressa em sistemas recombinantes induzem forte resposta humoral pela geração de anticorpos neutralizantes (Hagensee et al., 1993; Zhou et al., 1991).

Uma das vacinas, Gardasil (Merck & Co., Inc.) contém VLPs L1 dos HPV de alto risco (HPV16 e 18) e dos HPV causadores das verrugas genitais (HPV6 e 11), adsorvida no adjuvante sulfato de hidroxifosfato de alumínio. A vacina foi aprovada em 2006, pela *Food and Drug administration* (FDA) para mulheres entre 9 e 26 anos e atualmente é licenciada em mais de 100 países. Em 2009 foi aprovado o uso da vacina em homens nesta mesma faixa etária, após dados clínicos comprovarem a eficácia da vacina na prevenção de verrugas genitais em ambos os sexos (D'souza, Dempsey, 2011).

A vacina quadrivalente induziu, no período de cinco anos, altos títulos de anticorpo anti-HPV e apresentou de 95,5% a 100% de eficácia na prevenção de infecção persistente, neoplasias e verrugas genitais causadas pelo HPV 6, 11, 16 e 18, em um estudo realizado com mulheres que não tinham sido expostas a estes tipos de HPV (Villa et al., 2006). Em mulheres de 35 a 45 anos, com evidência de exposição prévia aos tipos 6, 11, 16 e 18 do HPV, a vacina apresentou eficácia de 66,9% a 81,3%, sugerindo o benefício da vacinação em mulheres que já entraram em contato com o vírus (Castellsague et al., 2011).

A vacina Cervarix (Glaxo Smith Kline), formulada com o adjuvante (ASO4) que contém hidróxido de alumínio e monofosforil lipídio A, é bivalente e protege contra os HPV de alto risco (HPV16 e 18). A vacina demonstrou, ao longo de um período de 8,4 anos, eficácia de 100% contra infecção persistente e NIC2⁺ associadas aos HPV 16 e 18, sendo verificados, ao longo deste período, altos títulos de anticorpos neutralizantes (Roteli-Martins et al., 2012). Além de proteger contra os tipos 16 e 18 do HPV, a vacina conferiu proteção cruzada contra os HPV 31, 33, 45 e 51 (Monie et al., 2008; Wheeler et al., 2012).

Apesar das vacinas profiláticas serem eficazes na prevenção da infecção pelo HPV de alto risco, segundo a Organização Mundial da Saúde, a incidência do câncer do colo do útero não seria reduzida até 2050, mesmo que essa vacina seja amplamente utilizada. Por outro

lado, se uma vacina terapêutica fosse hoje desenvolvida e comercializada haveria um impacto imediato na redução do risco de mulheres já infectadas com o HPV morrerem por câncer cervical.

Em vista disso, muitos estudos estão sendo realizados para se encontrar estratégias vacinais terapêuticas que sejam capazes de reduzir a progressão das lesões do colo do útero provocadas pela infecção estabelecida do HPV de alto risco, e assim diminuir a alta incidência de morte por câncer cervical.

Uma nova geração de vacina, mais efetiva que as atuais, estão sendo desenvolvidas. Uma nova vacina da Merck, constituída da proteína L1 de nove tipos de HPV (6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 52 e 58), está em fase III do estudo clínico e provavelmente prevenirá mais de dois terços dos cânceres cervicais (Peres, 2011).

1.10 Vacina terapêutica contra lesões intraepiteliais e câncer cervical

Por serem constitutivamente expressas nas células tumorais infectadas por HPV, as oncoproteínas E6 e E7 têm sido de particular interesse para o desenvolvimento de vacinas terapêuticas contra neoplasias cervicais. Uma resposta imune apropriada dirigida a essas oncoproteínas do HPV de alto risco pode eliminar as células alteradas que compõem a NIC e, portanto, prevenir a progressão para o câncer cervical.

A maioria das vacinas profiláticas baseia-se na indução de anticorpos neutralizantes contra moléculas de superfície de vírus e bactérias. Vacinas terapêuticas, ao contrário, requerem a indução da imunidade mediada por células capaz de atacar e eliminar o antígeno ou células que apresentam alguma anormalidade. Isto exige a estreita colaboração entre células do sistema imune inato e adaptativo, em particular, células apresentadoras de antígeno (APC), linfócitos T auxiliares CD4⁺ e linfócitos T citotóxicos CD8⁺ (Van Der Burg, 2008).

As vacinas terapêuticas apresentam mais desafios que as vacinas profiláticas para a sua aprovação. Os desafios incluem o estado dos pacientes imunocomprometidos, a dificuldade em estimular o sistema imunológico, os mecanismos de escape imunológico utilizado por tumores e células infectadas pelo vírus, e as preocupações de segurança. Apesar disso, há muitos resultados encorajadores sugerindo que as respostas de células T às proteínas E6 e E7 podem ser geradas em modelos animais como em seres humanos (Mahdavi, Monk, 2005).

Vacinas de DNA capazes de expressar a proteína E7 do HPV16 geneticamente fusionada a adjuvantes (HSP60, calreticulina, glicoproteína gD do vírus da herpes) foram

capazes de desencadear uma resposta citotóxica específica para a proteína E7. Vetores virais e bacterianos, como *Salmonella* recombinante expressando E6 e E7 do HPV 16 e adenovírus expressando E7 fusionada ao HSP 70, foram estudados e mostraram capacidade de provocar uma forte resposta imunológica. Além dessas, VLPs quiméricos que contém as oncoproteínas E6 e E7 tem sido explorada pelo seu potencial tanto terapêutico quanto profilático contra o HPV (Diniz, Ferreira, 2011; Frazer, 2004; Govan, 2005; Jochmus et al., 1999; Lasaro et al., 2005; Mahdavi, Monk, 2005; Padilla-Paz, 2005).

Em modelo pré-clínico, a vacina constituída de longos peptídeos sintéticos das proteínas E6 e E7 do HPV16, em formulação com o adjuvante Montanide ISA-51, foi capaz de induzir uma forte resposta de células T $CD4^+$ e $CD8^+$, sendo, além de segura, altamente imunogênica (Vambutas et al., 2005).

Em consonância com estes resultados pré-clínicos, os estudos clínicos de fase I mostram que a vacinação com longos peptídeos de E6 e E7 do HPV16 induz uma ampla resposta de células T HPV16-específica $CD4^+$ e $CD8^+$ em pacientes com lesões pré-malignas de baixo grau, como neoplasia intraepitelial vulvar e em pacientes em estágio inicial de câncer cervical (Kenter et al., 2008). Outros estudos pré-clínicos evidenciam o maior potencial terapêutico das proteínas recombinantes E6 e E7 quando estas são administradas com adjuvante (ISCOMATRIX ou HSP60) (Huang et al., 2007; Stewart et al., 2004).

Em todos estes modelos animais a alta taxa de sucesso está associada a um curto período da doença, no qual não ocorre a imunossupressão e, portanto, estes modelos animais dificilmente simulam a situação encontrada em pacientes com câncer. Apesar de sua capacidade de induzir uma forte resposta imunológica, as vacinas terapêuticas apresentaram um limitado sucesso clínico em pacientes com lesões de alto grau e em estágios avançados de câncer cervical.

Em humanos, os tumores imunogênicos sofrem uma influência decisiva do tipo e da polarização de células T específicas que são induzidas espontaneamente após a apresentação dos epítomos tumorais. Nestes pacientes, a resposta imune sistêmica contra os antígenos E6 e E7 pode não ser detectável ou apresenta um perfil de citocinas não inflamatórias (De Jong et al., 2004).

Em lesões de alto grau o microambiente pode favorecer o crescimento das células tumorais pela expressão de citocinas imunossupressoras, como IL-10 e TGF- β , e impedir a infiltração de células dendríticas e de linfócitos T com efetiva resposta contra as oncoproteínas virais.

Os estudos da vacinação com peptídeos de E6 e de E7 em pacientes, agrupados de acordo com o tamanho da lesão intraepitelial vulvar, permitiu observar, após a vacinação, uma robusta resposta efetora de IFN- γ no grupo de pacientes com menor lesão, enquanto nos pacientes com lesões maiores observou-se uma resposta mais expressiva de linfócitos T reguladores, demonstrando uma relação IFN- γ /IL-10 significativamente mais baixa e uma porcentagem maior de células T CD4+CD25+Foxp3+ (Welters et al., 2010). Os altos níveis de IL-10 poderiam inibir a ação de citocinas, como IL-2, IL-12 e TNF, envolvidas na imunoregulação Th1/Th2 e diminuir a expressão de moléculas MHC de classe I e II (Azar et al., 2004). Além disso, a presença de um elevado número de células T efectoras circulantes não é o suficiente para induzir uma eficiente resposta clínica (Baldwin et al., 2003; Dannull et al., 2005; Rosenberg et al., 2005).

Notavelmente, a maioria das vacinas terapêuticas contra o câncer cervical é projetada para aumentar a resposta imune específica de células T CD4⁺ e CD8⁺ contra os antígenos reconhecidos pelas células T previamente induzidas pelo tumor. Isto significa que é possível que a vacinação resulte também na ativação e expansão de células reguladoras T específicas. O efeito disso na eficácia da vacina clínica é desconhecida e pode variar de paciente para paciente, mas pode assumir formas extremas (Van Der Burg, 2008).

Em vista do fato de muitas estratégias terapêuticas atualmente desenvolvidas e testadas visarem impulsionar uma resposta efetora de células T específicas aos antígenos E6 e E7 do HPV16, há a necessidade de se verificar se essas vacinas são capazes de estimular células reguladoras. Assim, se a resposta imune não for modulada de maneira ideal, a resultante pode até mesmo privilegiar o crescimento tumoral.

1.11 Poliubiquitinação de proteínas

Ubiquitina é uma proteína de 76 resíduos de aminoácidos, peso molecular 8500 Da, que é altamente conservada em eucariotos. A conjugação covalente da ubiquitina a outras proteínas, um processo chamado ubiquitinação, é essencial para a degradação de proteínas cujos níveis são regulados constitutivamente ou em resposta a alterações no ambiente celular. Proteínas poliubiquitinadas são direcionadas para a degradação pelo proteassomo 26S e os peptídeos gerados podem ser apresentados na superfície da célula por moléculas MHC classe I (Coux et al., 1996; Hochstrasser, 1996; Hershko, Ciechanover, 1998).

Além de seu importante papel na degradação de proteínas através do proteassomo, a ubiquitinação proteica é parte integrante de muitos processos celulares, como apoptose,

progressão do ciclo celular; biogênese de organela; proliferação celular, diferenciação celular, transporte de proteínas, transcrição e reparo do DNA (Weissman, 2001).

A ubiquitinação de uma proteína como sinalização para degradação envolve uma cascata de reações catalisadas por três enzimas. Inicialmente, a ubiquitina é ativada pela enzima E1 (enzima ativadora de ubiquitina) que, à custa de ATP, forma uma ligação tiol-éster com o resíduo de glicina carboxi-terminal da ubiquitina. A ubiquitina ativada é transferida para a E2 (enzima conjugadora) pela qual é carregada transitoriamente. Finalmente, a ubiquitina pode ser transferida diretamente para o substrato associado à enzima ligase E3-Ring ou transferida para a enzima ligase E3-HECT que transfere a ubiquitina para o substrato. A primeira molécula de ubiquitina é covalentemente ligada no resíduo interno NH₂-Lys do substrato. Após a adição da primeira ubiquitina, diversas outras ubiquitinas podem ser adicionadas através da mesma cascata de reações enzimáticas, mas com a modificação de que a ligação peptídica é, agora, formada entre a glicina 76 da ubiquitina ativada e uma das três lisinas (K29, K48 e K63) da ubiquitina já adicionada. A cadeia de poliubiquitina formada atuará como sinal de reconhecimento para degradação pelo proteassomo 26S (PT26S). (Hershko, Ciechanover, 1998, Weissman, 2001; Perrett et al., 2011).

O proteassomo 26S é um complexo multimérico e multicatalítico responsável pela degradação de proteínas intracelulares. Ele consiste de uma unidade catalítica central, denominada proteassomo 20S (PT20S) e por duas unidades regulatórias (19S ou 11S). O 19S ativa a hidrólise pelo PT20S (Chu-Ping et al., 1994) e é responsável pelo reconhecimento das proteínas poliubiquitinadas (Deveraux et al., 1994). Essa unidade regulatório contém seis diferentes ATPases que, provavelmente, promove o desdobramento do substrato proteico e facilita a sua entrada no PT20S (Kisselev et al., 1999; Glickman et al, 1998; Larsen, Finley, 1997).

A unidade catalítica 20S do proteassomo tem uma estrutura cilíndrica e é composta por quatro anéis heptaméricos empilhados em forma de barril. Os dois anéis idênticos externos alfa (α) contêm sete diferentes subunidades e controla o acesso de substratos à câmara catalítica. Já o anel interno beta (β), também heptamérico, é responsável pela hidrólise dos substratos e possui três subunidades catalíticas distintas com atividade pós-ácida (subunidade β 1), tipo-tripsina (subunidade β 2) e tipo-quimiotripsina (subunidade β 5) (Orlowski, 1990; Heinemeyer et al., 1997; Arendt, Hochstrasser, 1997; Chen, Hochstrasser, 1996). O proteassomo 20S pode existir como partícula livre capaz de degradar proteínas independentemente de poliubiquitinação e também gera peptídeos para apresentação por MHC classe I (Yang et al., 1995, Kisselev et al, 1999, Baugh, 2009).

A grande maioria dos peptídeos gerados pelo proteassomo é degradada rapidamente por peptidases citosólicas. Alguns dos produtos da degradação escapam da completa degradação e são apresentados ao sistema imune na superfície da célula por moléculas MHC classe I. Os peptídeos de 8-9 aminoácidos podem se ligar diretamente a essas moléculas, entretanto dois terços dos peptídeos gerados são mais curtos e não podem ser usados para apresentação por MHC I. Os outros 15% dos peptídeos gerados pelo proteassomo são mais extensos e podem ser apresentados após subsequente clivagem por aminopeptidases no citoplasma (Goldberg et al., 1995; Rammensee et al., 1995; Craiu et al., 1997, Kisselev e al., 1999).

Figura 4 – Poliubiquitinação de proteínas

Inicialmente, a ubiquitina (Ub) é ativada pela enzima ativadora de ubiquitina (E1) que, à custa de ATP, forma uma ligação tiol-éster com o resíduo carboxi-terminal da ubiquitina. A ubiquitina ativada é transferida por E1 a enzima conjugadora (E2) por uma ligação tiol-éster. A partir do complexo E2-Ub, a ubiquitina pode ser transferida diretamente para o substrato associado a ligase E3-Ring ou transferida para a E3-HECT que conhecerá o substrato, ubiquitinando-o. A primeira molécula de Ub é covalentemente ligada no resíduo interno NH₂-Lys do substrato. Após a adição da primeira Ub ao substrato, diversas outras ubiquitinas podem ser adicionadas através da ligação peptídica entre a glicina 76 da Ub ativada e a lisina da ubiquitina já adicionada. A cadeia de poliubiquitina formada atuará como sinal de reconhecimento para degradação da proteína pelo proteassomo 26S.

Fonte: Adaptada de Demasi e Laurindo, 2012.

1.12 Vacina recombinante E6E7 fusionada à Ubiquitina

A concepção de que células neoplásicas adaptam-se e podem evadir-se de respostas imunológicas antitumorais é convidativa para o desenvolvimento de imunoterapias que contornem tais mecanismos de escape.

Quando expressas nas células tumorais e presentes no citosol, as oncoproteínas E6 e E7 são degradadas proteoliticamente no proteassomo, gerando peptídeos (epítomos) capazes de se ligar às moléculas de MHC da classe I. Este complexo peptídeo-MHC I formado é reconhecido na membrana plasmática por linfócitos T citotóxicos (CTLs) CD8⁺ que efetua uma resposta imune contra a célula apresentadora deste antígeno (Figura 3). Em vista disso, diversas estratégias de vacinas com epítomos imunogênicos de E6 e E7 do HPV16 têm sido desenvolvidas de forma a acentuar a apresentação desses antígenos às CTLs e ativar uma resposta imune celular eficaz contra o tumor.

O desenvolvimento de vacina de DNA têm sido uma das estratégias terapêuticas estudadas devido a sua capacidade de induzir uma acentuada resposta imune celular específica contra os antígenos tumorais. A vacina de DNA que codifica as proteínas E6, E7 e L2 fusionada à calreticulina humana induziu uma robusta resposta imune celular T CD8⁺ E6/E7-específica, resultando em um significativo efeito terapêutico contra células tumorais expressando E6 e E7 (Kim et al., 2008).

A vacina de DNA tem se mostrado vantajosa devido à possibilidade de direcionamento de antígenos para a via proteolítica ubiquitina-proteassomo, acentuando, assim, a formação do complexo peptídeo-MHC classe I e sua ligação às células efectoras da resposta imune CTLs CD8⁺ (Abbas, Lichtman, 2006).

Foi testada em camundongos uma vacina de DNA contendo epítomos CTL, Th e de células B da proteína E7 do HPV16. Neste caso, a adição de separadores entre os epítomos foi crucial para a indução de proteção e, somente após a associação com Ubiquitina, houve erradicação de 100% dos tumores de sete dias estabelecidos em camundongo (Velders et al., 2001).

A rápida degradação de proteínas específicas pelo percurso ubiquitina-proteassomo dependente é um componente de muitos mecanismos reguladores da célula. A complexidade do sistema ubiquitina reflete-se no amplo leque de processos de regulação celular; estas incluem as medidas essenciais na progressão do ciclo celular, processamento de proteínas para a apresentação por moléculas MHC de classe I, e o controle da proliferação celular (Hochstrasser, 1995).

Embora a abordagem da vacina de DNA tenha se apresentado segura até o momento e com grande potencial imunoterapêutico, a vacinação com DNA abriga o risco de integração do plasmídeo ao genoma do hospedeiro, e também o risco de promover a transformação das células pela expressão dos oncogenes pela inserção do DNA exógeno. Assim, as vacinas de proteínas, que não possuem os riscos apresentados pela vacina de DNA, têm sido consideradas as mais promissoras estratégias de vacinação contra câncer do colo do útero.

Com base em estudos que demonstraram que a vacinação com múltiplos epítomos é mais eficaz na indução de resposta imune que as vacinas constituídas de um único epítopo (Kenter et al., 2008), procuramos desenvolver uma vacina constituída de epítomos das oncoproteínas E6 e E7 do HPV16 capaz de estimular a proliferação tanto de linfócitos T citotóxicos via HLA do tipo I (constituído por alelos dos tipos HLA A, HLA B e HLA C) quanto de linfócitos auxiliares via HLA do tipo II (constituído por alelos dos tipos HLA DR, HLA DQ, HLA DP). Sabendo-se que os genes dos HLAs são altamente polimórficos na população, procurou-se escolher as regiões das proteínas E6 e E7 que apresentassem maior variedade de epítomos com diferentes tipos de HLA, o que proporcionaria uma ampla cobertura ao ser utilizada em imunização na população (Morale, 2009).

Outra estratégia utilizada para potencializar uma resposta citotóxica da vacina, foi ligar E6E7 à proteína Ubiquitina. A Ubiquitina é conhecida por aumentar a apresentação de antígenos ao sistema imune direcionando as proteínas às quais está fusionada ao proteassomo (Figura 3). Alguns estudos pré-clínicos evidenciam a maior eficácia terapêutica de vacina de DNA de E6E7 quando ligada a Ubiquitina (e também de outros antígenos de outras modelos de doenças quando ligados à Ubiquitina) (Delogu et al., 2000; Papagatsias et al., 2009; Rodriguez et al., 1998; Velders et al., 2001). A rápida degradação de E6E7Ub pela via do proteassomo-ubiquitina poderá gerar uma resposta mais acentuada de linfócitos TCD8⁺ e aumentar a subpopulação de Th1 de forma a inibir a proliferação de células T regulatórias e favorecer ainda mais a expressão de moléculas de MHC classe I, o que culminaria na eliminação das células transformadas.

Por este motivo, espera-se que a vacina E6E7 fusionada à Ubiquitina melhore o processamento e apresentação dos epítomos à CTL e, conseqüentemente, estimule uma resposta citotóxica mais robusta que a E6E7 sem a fusão.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo principal avaliar, em camundongos, a resposta protetora conferida pelo candidato vacinal proteico contendo epítomos de E6 e E7 do HPV16, com ou sem Ubiquitina geneticamente fusionada, em modelo profilático e terapêutico murino contra células tumorais TC-1.

3 JUSTIFICATIVA

Na estratégia de prevenção do câncer do colo do útero, a chegada ao mercado da vacina anti-HPV abre novas perspectivas de eliminação do risco de infecção por alguns tipos deste vírus responsáveis por 75% dos casos de carcinoma. Entretanto, o combate à doença pode ser prejudicado pelo alto custo da vacina que dificulta o acesso à imunização da população de baixa renda.

Embora essas vacinas sejam eficazes na prevenção da infecção persistente pelo HPV16 e HPV18 e ter potencial para a prevenção da NIC, não há evidência de sua eficácia contra os HPV já estabelecidos nas lesões genitais e nas células tumorais.

Diante disto, o Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan, busca, além de desenvolver uma vacina nacional mais barata contra HPV, desenvolver uma vacina destinada ao tratamento de quem já desenvolveu as lesões pré-malignas e o câncer cervical.

Os resultados animadores com as vacinas de DNA com os oncogenes E6 e E7 fusionados à Ubiquitina nos encorajaram a sintetizar um antígeno proteico constituído de epítomos imunogênicos de E6 e E7 ligados à Ubiquitina.

Procuramos avaliar a resposta imune conferida pela vacina E6E7 com Ubiquitina fusionada tanto no C terminal (E6E7Ub), conforme descrito por Velders et al. (2001), quanto no N terminal (UbE6E7) do antígeno, e o potencial terapêutico destas proteínas contra células tumorais (TC-1) expressando E6 e E7.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Linhagens

➤ Linhagens de camundongos

- Camundongos C57BL/6 selvagens do biotério do Instituto de Biomédicas IV-USP, São Paulo.
- Camundongos C57BL/6 selvagens do biotério da Faculdade de Medicina-USP, São Paulo.
- Camundongos C57BL/6 nocautes para CD4 ou CD8 do biotério do Instituto de Biomédicas IV – USP, São Paulo.
- Camundongos C57BL10/ScCr (TLR4-deficiente) do biotério do Instituto de Biomédicas IV – USP, São Paulo.

➤ Linhagens celulares

- *Escherichia coli* DH5- α : supE44 Δ alcU169(ϕ 80lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyra96 thi-1 relA1 (Sambrook et al., 1989).
- *Escherichia coli* BL21 Star (DE3)pLysS: F- ompT hsdS_B(r_B-, m_B-) gal dcm λ (DE3) [pLysS Cam^r] (Novagen).
- TC-1: Células epiteliais primárias de camundongos C57BL/6 imortalizadas pelas proteínas E6 e E7 do HPV-16 e transformadas com o oncogene c-Ha-ras. A co-transformação resulta numa linhagem celular oncogênica expressando E6 e E7. Esta linhagem celular mimetiza o crescimento do tumor de colo do útero, proporcionando assim um modelo para comparar o potencial de vacinas terapêuticas contra o câncer cervical (Lin et al., 1996). Esta linhagem foi cedida pelo Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira (Depto Microbiologia, ICB-USP).
- Células RAW 264.7: São células com características de monócitos/macrófagos de crescimento semiaderente e foram originalmente estabelecidas a partir de tumor induzido pela injeção do vírus da leucemia de Abelson (A-MuLV) em um camundongo macho. Essas células foram obtidas da ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA).

4.2 Vetores

- pAE: vetor de expressão de 2800 pb construído no nosso laboratório (Ramos et al., 2004). Este vetor de alta cópia contém o promotor T7, sítio de ligação ao ribossomo (RBS), códon ATG de início de tradução, sequência que codifica para 6 histidinas, sequência de terminação de transcrição, T7 terminal e marcador de resistência a ampicilina.
- pGEM-T easy: vetor de 3015 pb do kit pGEM®-T easy Vector System (Promega®, Madison, WI, USA) usado para a clonagem de genes amplificados por PCR. Apresenta no sítio de clonagem alguns sítios de restrição para posterior subclonagem. Ele contém uma timidina na extremidade 3', possibilitando ligação direta de produtos de PCR gerados por algumas polimerases termoestáveis que adicionam um A na extremidade 5'. O vetor possui promotor do fago T7 (pT7), promotor Sp6 (pSp6), sítio múltiplo de clonagem e marca de resistência à ampicilina.
- pUC57-E6E7Ub: vetor contendo o gene codificando a sequência nucleotídica dos epítomos das proteínas E6 e E7 do HPV16 e do gene da proteína Ubiquitina, sintetizado pela GenScript.
- pAE-E6E7Ub: vetor de expressão bacteriano contendo a sequência nucleotídica dos epítomos das proteínas E6 e E7 do HPV16 e do gene da proteína Ubiquitina (fusionada na extremidade C-terminal da proteína E6E7).
- pAE-UbE6E7: vetor de expressão bacteriano contendo a sequência nucleotídica dos epítomos das proteínas E6 e E7 do HPV16 e do gene da proteína Ubiquitina (fusionada na extremidade N-terminal da proteína E6E7).
- pAE-E6E7: vetor de expressão bacteriano contendo a sequência nucleotídica dos epítomos da proteína E6 e E7 do HPV16.
- pAE-Ub: vetor de expressão bacteriano contendo a sequência do gene da proteína Ubiquitina.
- pGEM-T-Ub: vetor de clonagem contendo a sequência do gene da proteína Ubiquitina.

4.3 Oligonucleotídeos

Oligonucleotídeos sintetizados pela Invitrogen (Invitrogen®, Carlsbad, USA).

- Para construção do pAE-Ub
 - EcoRI-Ub FW: 5' TGGAATTCATATGCAGATTTTGTGAAAACCC 3'
 - /HindIII-Ub RV: 5' TCGCAAAGCTTTTAGGCACCACGCAGACGCAGC 3'

➤ Para construção do pAE-UbE6E7

- NdeI-His-Ub FW: 5' CAGATCATATGCATCACCATCACCATCACATGCAGATTTTT GTGAAAACCC 3'
- BamHI-Ub RV: 5' ACGAAGCTTTTAGGATCCGGCACCACGCAGACGCAGC 3'

➤ Para sequenciamento:

Foram utilizados os oligonucleotídeos M13f e M13r, T7f e pRESETr obtidos através da Life Technologies.

4.4 Meios de cultura

- Meio Luria Bertani (LB): triptona 1,0% (m/v); extrato de levedura 0,5% (m/v); NaCl 0,5% (m/v); 10 mM Tris (pH 7,4); 1 mM MgSO₄.
- Meio LB com antibióticos: meio LB estéril acrescido com o antibiótico ampicilina a uma concentração final de 100 µg/mL.
- Meio LB ágar com antibiótico: meio LB acrescido com ágar bacteriológico 3% (m/v) antes da esterilização. Adicionou-se o antibiótico ampicilina para a concentração final de 100 µg/mL antes do meio solidificar em placas de cultura bacteriana.
- Meio DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium contendo 4500 mg/L de glicose, L-glutamina, piruvato de sódio e bicarbonato de sódio.
- Meio DMEM 10% SFB: meio DMEM acrescido de soro fetal bovino 10% (v/v).
- Meio DMEM completo: meio DMEM acrescido de soro fetal bovino 10% (v/v), 1X L-Glutamina (Gibco), 1X antibiótico-antimicótico (Gibco) e 0,4 mg/ml Geneticina.
- Meio RPMI: RPMI Medium 1640 com L-Glutamina e bicarbonato de sódio
- Meio RPMI completo: meio RPMI acrescido de soro fetal bovino 10% (v/v), 1X vitamina, 1X L-Glutamina, 1X antibiótico-antimicótico, 1X aminoácidos essenciais, 1X aminoácidos não essenciais, 12,5 µg/ml gentamicina, 0,1 mg/ml piruvato, 5 mM β-mercaptoetanol, 10 ng/ml IL-2.

4.5 Construção do vetor pAE-E6E7Ub

O vetor pAE-E6E7Ub foi previamente construído por Morale (2009) após levantamento bibliográfico dos epítomos imunogênicos das proteínas E6 e E7 do HPV16 *in vivo* e *in vitro*. Foram selecionadas as regiões dessas proteínas que apresentavam maior

número de epítomos de interesse: E6 29-38, E6 49-67, E6 127-141, E7 7-20, E7 43-77, E7 79-93.

A seguir desenhou-se a sequência nucleotídica envolvendo a fusão das regiões de interesse e da sequência da proteína Ubiquitina (E6E7Ub). Utilizou-se códon otimizado para *E. coli* e espaçadores para evitar formação de epítomos entre as fusões e facilitar o processamento pelo proteassomo (Velders et al., 2001). Foram adicionados sítios de restrição que permitem o remanejamento da sequência para formar E6E7 fusionada sem Ubiquitina (Figura 5) (Morale, 2009).

A sequência foi enviada para a empresa GenScript (GenScript, Inc, USA) onde foi sintetizada. A sequência sintética E6E7Ub foi recebida clonada em vetor pUC57 e utilizada para a subclonagem em vetor de expressão pAE.

Figura 5 - Esquema da fusão gênica entre regiões da proteína E6 e E7 do HPV16 com Ubiquitina

As setas indicam os epítomos imunogênicos, e os retângulos em preto representam os espaçadores. Fonte: Adaptada de Morale (2009).

➤ Subclonagem em vetor pAE

Os vetores pAE e pUC57-E6E7Ub foram digeridos com as enzimas BamHI (Fermentas Life Science, Maryland, USA). e PvuII (New England BioLabs, Ipswich, MA) (Figura 6).

As bandas correspondentes às digestões foram purificadas e submetidas à reação de ligação. Alguns dos clones obtidos dessa reação foram selecionados e suas sequências confirmadas por sequenciamento.

Figura 6 - Esquema do vetor de expressão em *E.coli*, pAE contendo o gene E6E7Ub no sítio de múltipla clonagem (MCS)

O vetor pAE sem o gene possui 2800 pb. Promotor T7 (P_{T7}), cauda de histidina (6XHis), Terminador T7 (T7term), marcador de resistência a ampicilina (AmpR), origem de replicação do plasmídeo ColE1 (ColE1), origem de replicação do fago (F1 ori).

Fonte: Adaptada de Ramos et al. (2004)

4.6 Construção do vetor pAE-E6E7

➤ Digestão por enzimas de restrição

O vetor pAE-E6E7 foi construído retirando-se a sequência de DNA da Ubiquitina por meio da digestão do vetor pAE-E6E7Ub com a enzima de restrição EcoRI (Figura 7).

Para realizar a digestão do vetor pAE-E6E7Ub foi utilizado o Kit Fast Digest® EcoRI (Fermentas).

Em tubo eppendorf foram adicionados 10 µL do vetor pAE-E6E7, 1 µL da enzima EcoRI, 2 µL do tampão React 3 e 7 µL de água milliQ, segundo protocolo do fabricante (Fermentas). A digestão foi realizada a 37 °C por 30 minutos. O produto da digestão foi aplicado no gel de agarose.

Figura 7 - Esquema da construção do vetor pAE-E6E7

O vetor pAE-E6E7Ub foi digerido com a enzima de restrição EcoRI para excisão do gene da Ubiquitina e religado para a formação do vetor pAE-E6E7.

Fonte: Adaptada de Ramos et al. (2004)

➤ Eletroforese em gel de agarose

A análise das amostras de DNA foi feita através de eletroforese em gel de agarose adicionando-se às amostras 1:10 do volume de tampão (azul de bromofenol 0,25% (m/v); xileno cianol 0,25% (m/v); glicerol 30% (v/v)). Os géis foram preparados com agarose 1% (m/v) em tampão 1X TAE e brometo de etídeo (1 µg/mL). O DNA presente no gel foi visualizado em transiluminador de luz ultravioleta.

A banda correspondente ao DNA de interesse, após a digestão, foi cortada e seguiu-se o processo de extração do DNA do gel de agarose.

➤ Extração de DNA de géis de agarose

Para a extração do DNA do gel de agarose foi utilizado o kit de purificação do DNA IllustraTM (GE Healthcare, Ltd, Buckinghamshire, UK) e seguiram-se as instruções do fabricante.

➤ Reação de ligação

Para a ligação das extremidades coesivas do DNA purificado e formação do vetor pAE-E6E7 foi utilizado o Kit T4 DNA ligase (Fermentas).

Em tubo eppendorf foram adicionados 9 µL do DNA, 10 µL do tampão T4 DNA ligase e 1 µL da enzima T4 DNA ligase. A ligação foi realizada por 16 horas a 16 °C e em seguida, realizou-se a transformação de bactérias competentes com o vetor pAE-E6E7.

➤ Quimiotransformação de bactérias competentes

Bactérias quimiocompetentes *E. coli* DH5α (50 µL) junto com o DNA plasmidial (5 µL) foram incubados por 30 minutos a 4 °C, e em seguida foi realizado choque térmico de 2 minutos a 42 °C e 5 minutos a 4 °C. Após o choque térmico foram adicionados 350 µL de meio LB e as bactérias foram mantidas a 37 °C por 1 hora. O volume final da transformação, aproximadamente 400 µL, foi dividido e plaqueado em meio sólido LB ágar com ampicilina. As placas foram mantidas a 37 °C por 16 h.

➤ Extração de plasmídeos em pequena escala

Uma colônia de *E. coli* DH5α transformada com pAE-E6E7, que cresceu em uma placa com meio seletivo, foi inoculada em tubo de cultura contendo 5 mL de meio LB suplementado com ampicilina e incubada durante a noite a 37 °C sob agitação. O vetor pAE-E6E7 foi extraído por *mini-prep* DNA Illustra™ (GE Healthcare) conforme as instruções do fabricante e sua sequência analisada por sequenciamento.

➤ Sequenciamento

As regiões referentes aos genes de interesse foram sequenciadas utilizando o *kit* “ABI Prism®” Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction v 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) e o sequenciador “ABI PRISM 3100 Genetic Analyser” (Applied Biosystems).

A análise das sequências foi realizada através do programa SeqMan II expert sequence analysis software® (DNASTAR, Inc., Madison, Wis., USA).

4.7 Construção do vetor pAE-Ub

Para a construção do vetor pAE-Ub foram utilizados os oligonucleotídeos EcoRI-Ub FW e HindIII-Ub RV.

O gene Ubiquitina foi amplificado a partir do plasmídeo pAE-E6E7Ub através da reação em cadeia de polimerase (PCR) usando-se a enzima Pfu.

➤ Reação de PCR

A reação de PCR foi realizada em termociclador PTC-100™ Programable Thermal Controller (MJ Research, Inc, Watertown, MA, USA) no qual foi utilizado o programa: 94 °C por 2 minutos para desnaturação, seguida de 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 58 °C por 30

segundos e 72 °C por 10 minutos. Após 35 ciclos, seguiu-se a extensão final a 72 °C por 10 minutos. O programa foi encerrado mantendo-se a temperatura de 4 °C.

Para a posterior clonagem em pGEM-T easy, o gene da Ubiquitina amplificado foi incubado na presença de 0,8 mmol/L de dATP e 5 unidades (U) de Taq DNA polimerase seguindo o programa: 94 °C por 5 minutos, 72 °C por 30 segundos. O volume total da reação foi aplicado no gel de agarose 1% (m/v) e o DNA purificado com o kit de purificação do DNA Illustra™ (GE Healthcare). Após a quantificação procedeu-se a clonagem do produto de PCR em pGEM-T easy.

➤ Clonagem no vetor pGEM-T easy

O vetor pGEM T-easy (Promega) facilita a clonagem de produtos de PCR, além de possibilitar o sequenciamento do fragmento antes desse ser subclonado no vetor de expressão final. O protocolo adotado foi o especificado pelo manual do kit da Promega.

Em tubo de 200 µl foi adicionado 4 ng dos produtos de PCR, 50 ng de pGEM-T easy® (Promega), 1 unidade (U) de enzima T4 DNA ligase e solução tampão para a enzima T4 DNA ligase. A reação foi incubada a 16 °C por 16 horas.

Bactérias quimiocompetentes *E. coli* DH5α (50 µL) foram transformadas com pGEM-T-Ub. O vetor pGEM-T-Ub foi extraído por *mini-prep* (DNA Illustra™ (GE Healthcare) conforme as instruções do fabricante e sequenciado.

➤ Subclonagem em vetor de expressão pAE

Os vetores pAE e pGEM-T-Ub foram digeridos com EcoRI e HindIII utilizando-se Kit Fast Digest® (Fermentas). Os produtos da reação foram aplicados no gel de agarose 1% (m/v) e o fragmento de Ubiquitina e o pAE, digeridos e purificados do gel, foram ligadas utilizando o Kit T4 DNA ligase (Fermentas) (Figura 8).

Bactérias quimiocompetentes *E. coli* DH5α foram transformadas com pAE-Ub, e as colônias que cresceram no meio LB ágar com ampicilina foram inoculadas em 5 ml de meio LB com antibiótico. O vetor pAE-Ub foi extraído por *mini-prep* (DNA Illustra™, GE Healthcare) e sua sequência analisada em sequenciador Genetic Analyser 3100.

Figura 8 - Esquema da construção do vetor pAE-Ub

O vetor pAE foi digerido com a enzima de restrição EcoRI e HindIII e religado com o fragmento de Ubiquitina contendo sequências de EcoRI e HindII para a formação do vetor pAE-Ub.

Fonte: Adaptada de Ramos et al. (2004).

4.8 Construção do vetor pAE-UbE6E7

Para a construção do vetor pAE-UbE6E7 foram utilizados os oligonucleotídeos NdeI-His-Ub FW e BamHI-Ub RV.

O gene da Ubiquitina foi amplificado a partir do plasmídeo pAE-E6E7Ub através da reação de PCR usando-se a enzima Platinum Taq (Invitrogen).

➤ Reação de PCR

A reação de PCR foi realizada em termociclador PTC-100™ Programable Thermal Controller (MJ Research) no qual foi utilizado o programa: 94 °C por 2 minutos para desnaturação, seguida de 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 65 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto. Após 35 ciclos, seguiu-se a extensão final a 72 °C por 10 minutos. O programa foi encerrado mantendo-se a temperatura de 4 °C.

O volume total da reação foi aplicado no gel de agarose 1% (m/v) e o DNA correspondente a Ubiquitina foi purificado com o kit de purificação do DNA Illustra™ (GE Healthcare). Após a quantificação procedeu-se a clonagem.

➤ Clonagem em vetor de expressão pAE

O gene da Ubiquitina e o vetor pAE-E6E7 foram digeridos com NdeI e BamHI utilizando-se Kit Fast Digest®. Os produtos da reação foram aplicados no gel de agarose 1%

(m/v) e o fragmento de Ubiquitina e o vetor pAE-E6E7, digeridos e purificados do gel, foram ligadas utilizando o Kit T4 DNA ligase (Fermentas) (Figura 9).

Bactérias quimiocompetentes *E. coli* DH5 α foram transformadas com pAE-UbE6E7, e as colônias que cresceram no meio LB ágar com ampicilina foram inoculadas em 5 ml de meio LB com antibiótico. O vetor pAE-UbE6E7 foi extraído por *mini-prep* DNA IllustraTM (GE Healthcare) e sua sequência confirmada por sequenciamento.

Figura 9 - Esquema da construção do vetor pAE-UbE6E7

O vetor pAE-E6E7 foi digerido com a enzima de restrição NdeI e BamHI e religado com o fragmento de Ubiquitina contendo cauda de histidina e sequências de NdeI e BamHI para a formação do vetor pAE-UbE6E7.

Fonte: Adaptada de Ramos et al. (2004)

4.9 Expressão das proteínas em BL21(DE3)pLysS

Bactérias BL21(DE3)pLysS foram quimiotransformadas com o plasmídeo pAE-E6E6Ub, pAE-UbE6E7, pAE-E6E7 ou pAE-Ub e cultivadas durante 16 horas em 50 mL de meio LB suplementado com ampicilina a 37 °C sob agitação. A seguir, esse cultivo foi transferido para 0,5 L de meio LB com ampicilina e incubado a 37 °C sob agitação. Após atingir a densidade óptica de 0,6 a $\lambda = 600$ nm, iniciou-se a indução da expressão

acrescentando-se ao meio IPTG a uma concentração final de 1 mM. A cultura foi incubada por 4 horas a 37 °C sob agitação.

Antes e ao final do tempo de indução, amostras de 1 mL das bactérias foram centrifugadas a 12.000 rpm por 1 min. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspensionado em solução tampão de amostra SDS-PAGE (250 mM Tris-HCl pH 6,8, SDS 10% (v/v), azul de bromofenol 0,5% (m/v), glicerol 50% (v/v), 1M β -mercaptoetanol. As amostras foram então aquecidas a 100 °C por 10 minutos e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida para análise da expressão protéica. O restante do meio foi centrifugado e o sedimento ressuspensionado em 20 ml de solução de lise (1 X PBS pH 7,5).

4.10 Lise das bactérias e solubilização das proteínas

Após serem ressuspensionadas em 20 ml de solução de lise, as bactérias foram lisadas por sonicação em seis ciclos de 30 segundos (out put 5, duty cycle 10%) (Branson Sonifier, Danbury, CT, USA). Após sonicação, as células foram centrifugadas a 4000 rpm por 15 minutos (Centrifuge 5810R, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). Em seguida, uma amostra do sobrenadante do lisado e uma amostra do sedimento do lisado foram submetidas à SDS-PAGE para verificar se as proteínas estavam sendo expressas sob a forma solúvel ou insolúvel.

Todas as proteínas de interesse foram expressas em corpúsculo de inclusão (forma insolúvel). Para a solubilização das proteínas, o sedimento foi ressuspensionado em 25 ml de solução de lavagem (1 X PBS pH 7,5, 250 mM NaCl, 2 M uréia), centrifugado e o sedimento foi ressuspensionado em 25 ml de solução de solubilização (1 X PBS pH 7,5, 250 mM NaCl, 8 M uréia, 5 mM β -mercaptoetanol, 5 mM imidazol). O sedimento e o sobrenadante de cada lavagem e da solubilização foram analisados em SDS-PAGE. As proteínas, em solução de solubilização, foram estocadas a -20 °C até sua utilização.

4.11 Purificação dos antígenos proteicos E6E7, E6E7Ub, UbE6E7 e Ubiquitina

➤ Preparação da coluna

Foram empacotadas 5 mL de resina Chelating-SepharoseTM Fast Flow (Amersham Pharmacia Biosciences, Ltd, Uppsala, Suécia) em uma coluna cromatográfica de 1,0 cm de diâmetro. Após empacotamento a resina foi carregada com 25 mL de solução 300 mM NiSO₄.

Para retirada do excesso de níquel a resina foi lavada com 25 mL de H₂O e em seguida equilibrada com 25 mL de tampão de equilíbrio (1 X PBS pH 7,5, 250 mM NaCl, 8 M uréia, 5 mM imidazol).

➤ Cromatografia de Afinidade à Níquel

As proteínas em solução de solubilização (25 mL) foram adsorvidas à resina mantendo-se o fluxo através da resina de 1 mL/min. Após a adsorção, a resina foi lavada com 25 ml de tampão de equilíbrio. Em seguida, realizaram-se três lavagens de 50 ml de solução com concentrações de 60 mM, 80 mM e 100 mM de imidazol em 1X PBS pH 7,5, 250 mM NaCl e 8 M uréia.

Eluiu-se a proteína de interesse com 20 mL de solução a 250 mM de imidazol, recolhida em frações de 1 mL, em fluxo de 0,5 mL/min. As lavagens e as alíquotas da eluição foram analisadas por SDS-PAGE.

4.12 Diálise dos antígenos proteicos

As frações com os antígenos purificados foram reunidas e inseridas em membrana de diálise de 7 kDa (E6E7 e Ub) ou 14 kDa (E6E7Ub e UbE6E7) de corte. A diálise foi realizada em etapas, cada uma com diferente concentração decrescente de uréia (6 M, 4 M e 2 M)

A membrana de diálise contendo o antígeno foi imersa em 2 L de solução tampão (1X PBS pH 7,5 e 2 M de uréia) e, em cada etapa de diálise, foi mantida a 4 °C por 16 horas.

4.13 Quantificação dos antígenos

A concentração dos antígenos após diálise foi determinada através da medida de absorbância a 280 nm utilizando-se o aparelho NanoDrop (Thermo Scientific, Inc Wilmington, Delaware, USA).

A partir do coeficiente de extinção molar das proteínas e dos valores de absorbância a 280 nm, determinou-se a concentração molar da proteína através da fórmula a seguir,

$$A_{280} = \epsilon \times L \times C$$

onde A_{280} é a absorbância medida a 280 nm, ϵ é o coeficiente de extinção molar em 280 nm ($M^{-1}cm^{-1}$), L é o caminho ótico em centímetros (cm) e C é a concentração molar da amostra de proteína (M). A amostra de proteína foi centrifugada a 5000 x g por 10 minutos antes de

ser utilizada para medir a concentração. O coeficiente de extinção molar das proteínas foi calculado pelo programa ProtParam (<http://ca.expasy.org>), obtendo os valores a seguir:

- E6E7Ub: $\epsilon = 25245$
- UbE6E7: $\epsilon = 25245$
- E6E7: $\epsilon = 23755$
- Ubiquitina: $\epsilon = 8480$

4.14 Caracterização dos antígenos

➤ SDS-PAGE

Usou-se a eletroforese como ferramenta metodológica para avaliação da expressão, solubilização, grau de pureza dos antígenos e sua massa molecular relativa. As eletroforeses em géis de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) foram realizadas segundo metodologia descrita por Laemmli (1970). O gel de poliacrilamida era composto pelo gel de estaqueamento contendo acrilamida-bisacrilamida 5% (m/v) e pelo gel de resolução contendo acrilamida-bisacrilamida 15% (m/v). Para cada gel foi aplicada uma corrente constante de 25 mA e a eletroforese foi realizada em tampão Tris-glicina. Ao final da eletroforese os géis foram corados com Coomassie Blue[®] e o excesso de corante foi retirado com solução descorante (álcool etílico 30% (v/v), ácido acético glacial 10% (v/v)).

➤ Espectrometria de massa

O sequenciamento parcial das proteínas recombinantes por espectrometria de massa foi realizado no Laboratório de Espectrometria de Massas do Centro de Toxinologia Aplicada/CEPID pela Dra. Aline Soriano Lopes, sob orientação da Dra. Solange Maria de Toledo Serrano, no espectrômetro de massas ESI-Q-TOF MS (do inglês, *Electrospray ionization-Quadrupole-Time-Of-Flight Mass Spectrometer*) Premier Waters-Micromass acoplado a um sistema de nanoACQUITY UPLC[®] (do inglês, *Ultra Performance Liquid Chromatography*).

➤ Western Blot

Para confirmar a presença da Ubiquitina nos antígenos E6E7Ub, UbE6E7 e Ubiquitina, foi realizado o *Western Blot* com anticorpo anti-ubiquitina.

Após as amostras percorrerem o gel de poliacrilamida, as proteínas foram transferidas do gel para membrana de nitrocelulose, durante 1 hora e 30 minutos, em uma voltagem de 0,8 V por cm² de membrana.

Após a transferência, a membrana foi bloqueada durante uma noite em tampão PBS/Tween 0,1% (v/v) com Leite 5% (m/v). Ao término desse período, a membrana foi lavada em PBS/Tween 0,1% (v/v) por quatro vezes, 15 minutos cada lavagem. Foi então, Ao término desse período, a membrana foi lavada em PBS/Tween 0,1% (v/v) por quatro vezes e incubada por 2 horas com anticorpo anti-ubiquitina (1:200) (Sta. Cruz Biotech, inc. California, USA) produzido em camundongo. Após lavagens com PBS/Tween 0,1% (v/v) a membrana foi incubada com anticorpo anti-IgG (1:10000) de camundongo conjugado a peroxidase (Sigma-Aldrich)

A membrana foi novamente lavada e a reatividade específica do anticorpo à proteína foi analisada por quimioluminescência utilizando o kit ECL Prime (GE) de acordo com as instruções do fabricante.

4.15 Cultura de células TC-1

As células TC-1 foram mantidas em nitrogênio líquido (criopreservação) em solução de congelamento composta por meio DMEM suplementado com 10% de Dimetilsulfóxico (DMSO) e 50% de soro fetal bovino (SFB).

As células foram descongeladas à temperatura ambiente e expandidas em frasco de cultura de 75 cm² (Cellstar - Greiner Bio-one, Frickenhausen, Germany) em meio DMEM completo e mantidas em estufa de CO₂ a 37 °C. Para o repique, o tapete celular foi lavado três vezes com 1 X PBS estéril e submetido à ação de 1 ml de Tripsina-EDTA 0,05%. A seguir, foram acrescentados 5 mL do meio DMEM completo para inibir a ação da tripsina e propiciar a desagregação das células. Realizou-se uma diluição de 1:12 das células em suspensão e essas foram então novamente recolocadas em frascos de cultura. Sendo esse procedimento realizado a cada três dias.

Para inoculação das células TC-1 em camundongos, foram utilizadas garrafas médias (75 cm²) confluentes. Após a retirada do meio, o tapete celular foi lavado com 1 X PBS por três vezes, e acrescentou-se tripsina para desagregação das células. A seguir, acrescentou-se 4 mL de meio DMEM 10 % SFB. O meio com as células em suspensão foi passado para um tubo falcon estéril e centrifugado a 1.500 rpm por 5 min.

O meio foi retirado após a centrifugação e o pellet foi ressuspensionado em 10 mL de meio DMEM sem soro e novamente centrifugado, sendo esse passo repetido duas vezes. Por fim, o pellet foi ressuspensionado em 3 mL de meio DMEM sem soro, uma pequena amostra foi diluída para contagem de células em câmara de Neubauer e o material restante foi ajustado à concentração desejada de $7,5 \times 10^5$ células/mL.

4.16 Cultura de células RAW 264.7

As células RAW 264.7 foram mantidas em nitrogênio líquido (criopreservação) em solução de congelamento composta por 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO) e 90% de soro fetal bovino (SFB).

As células foram descongeladas à temperatura ambiente e expandidas em frascos de cultura de 750 cm² (Cellstar – Greiner Bio-one) em meio DMEM completo e mantidas em estufa de CO₂ a 37 °C. Para o repique, o meio DMEM foi descartado e os frascos lavados com 1X PBS. Em seguida, foi adicionado 5 mL de meio DMEM completo e as células foram destacadas por meio de raspagem com suporte plástico (Cell Scraper- Corning Quality, New York, USA). Realizou-se uma diluição de 1:12 das células em suspensão e essas foram então novamente recolocadas em frascos de cultura. Sendo esse procedimento realizado duas vezes por semana.

Para o experimento de poliubiquitinação, dois frascos de 750 cm² com as células a 70-80% de confluência foram lavados com 1 X PBS e em seguida as células foram incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente com 2 mL de tampão de lise NP-40 (150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 10% Glicerol, 1mM MgCl₂, 0,5% PolyDet P-40, 50 mM Tris-HCl pH 7,4). O conteúdo no frasco foi então centrifugado a 500 x g por cinco minutos a 4° C em falcon de 15 mL. O sobrenadante foi coletado e a concentração de proteínas citoplasmática foi estimada por reação de Bradford, segundo instruções do fabricante (Bradford Reagent – Sigma).

4.17 Ensaios de imunização profilática

➤ Ensaio de imunização com animais C57BL/6

Os antígenos proteicos E6E7, E6E7Ub, UbE6E7 e Ubiquitina, após serem caracterizados, foram avaliados quanto ao seu potencial em induzir uma resposta imunoprotetora contra células tumorais TC-1. Para tanto, foram realizados três ensaios de imunização profilática com camundongos C57BL/6 de 8 a 12 semanas, divididos em grupos de cinco animais.

No primeiro ensaio foram empregados três grupos, um grupo foi vacinado com 15 µg de E6E7, outro com 15 µg de E6E7Ub e o último grupo vacinado com 100 µl de solução 1 X PBS pH 7,5, 2 M uréia. No segundo ensaio foi acrescentado um quarto grupo composto por cinco animais vacinados com a proteína Ubiquitina.

No terceiro ensaio foi adicionado um quinto grupo cujos animais foram vacinados com 1 nmol do antígeno proteico UbE6E7 (25 ug). Os demais grupos foram vacinados com PBS, 2 M uréia ou com 1 nmol de E6E7 (18 ug), E6E7Ub (25 ug) ou Ubiquitina (12 ug).

A via de administração das vacinas foi subcutânea, sendo administradas três doses dos antígenos proteicos ou PBS em intervalos de 14 dias. Após duas semanas do término das imunizações, os animais foram desafiados através da inoculação pela via subcutânea de $7,5 \times 10^4$ células TC-1 na região dorsolateral direita. No terceiro ensaio foi realizado um segundo desafio com $7,5 \times 10^4$ células TC-1, aplicadas na região dorsolateral esquerda, após setenta dias do primeiro desafio.

O crescimento do tumor foi avaliado por no mínimo um mês e, ao fim do experimento ou quando o tumor atingiu 1,5 cm de diâmetro, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂.

➤ Ensaio de imunização com animais C57BL10/ScCr (TLR4-Deficiente)

Um grupo de seis animais deficientes para receptor tipo toll 4 (TLR4) foi imunizado com o 1 nmol do antígeno E6E7 (18 ug) e um grupo controle, contendo cinco animais TLR4-deficiente, imunizado com 100 µl de 1X PBS, 2 M uréia.

Os animais foram vacinados pela via subcutânea com três doses de E6E7 ou PBS em intervalos de 14 dias. Após duas semanas do término das imunizações os animais foram desafiados através da inoculação de $7,5 \times 10^4$ células TC-1 na região dorsolateral direita.

O crescimento do tumor foi avaliado por vinte dias e, ao fim do experimento ou quando o tumor atingiu 1,5 cm de diâmetro, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂.

➤ Ensaio de imunização com animais CD4 ou CD8 nocautes

Animais C57BL/6 nocautes para CD4 foram divididos em três grupos. Um grupo contendo nove animais foi vacinado com PBS, 2 M uréia, outro grupo de oito animais foi vacinado com 1 nmol de E6E7 (18 ug) e o último grupo de oito animais foi vacinado com 1 nmol de E6E7Ub (25 ug).

Grupos de cinco animais C57BL/6 nocautes para CD8 foram vacinados com PBS, 2 M uréia, 1 nmol de E6E7 ou E6E7Ub.

Como controle positivo do crescimento tumoral, nos dois ensaios de imunização foi adicionado um grupo de cinco animais selvagens C57BL/6 imunizado com PBS, 2 M uréia.

Nos dois ensaios, a via de administração do PBS ou dos antígenos foi subcutânea, sendo administradas três doses em intervalos de 14 dias. Após duas semanas do término das imunizações os animais foram desafiados através da inoculação pela via subcutânea de $7,5 \times 10^4$ células TC-1 na região dorsolateral direita. Após 70 dias do primeiro desafio, animais nocautes para CD4, aparentemente sem tumor, foram novamente desafiados com $7,5 \times 10^4$ células TC-1, aplicadas na região dorsolateral esquerda.

O crescimento do tumor dos animais CD4 nocautes foi avaliado por 110 dias e, ao fim do experimento ou quando o tumor atingiu 1,5 cm de diâmetro, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂.

4.18 Ensaios de imunização terapêutica

Foram realizados três ensaios de imunização terapêutica. Dois ensaios com animais C56BL/6 e um ensaio com animais C57BL10-ScCr (TLR-4-deficiente). Nestes ensaios, os animais foram primeiro desafiados com células TC-1, três ou sete dias após a inoculação das células os animais receberam a primeira dose da vacina.

4.18.1 Vacinação após 3 dias do desafio

➤ Animais selvagens

Grupos de cinco animais C57BL/6 foram desafiados com $7,5 \times 10^4$ células TC-1 e após três dias os animais receberam a primeira dose da vacina pela via subcutânea e, em intervalos de sete dias foram imunizados com mais duas doses. Em cada dose foi aplicado PBS, 2 M uréia ou 1 nmol do antígeno - 12ug de Ubiquitina, 18ug de E6E7, 25ug de E6E7Ub ou 25 ug de UbE6E7. Os animais aparentemente livres de tumor foram novamente desafiados com $7,5 \times 10^4$ células TC-1, 85 dias após o primeiro desafio como descrito acima.

O crescimento do tumor foi avaliado por 120 dias e, ao fim do experimento ou quando o tumor atingiu 1,5 cm de diâmetro, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂.

➤ Animais TLR-4 deficiente

Em um segundo ensaio, realizado com camundongos C57BL10-ScCr (TLR-4 deficiente), os animais foram desafiados com $7,5 \times 10^4$ células TC-1 e após três dias receberam a primeira dose da vacina e, em intervalos de sete dias foram imunizados com mais duas doses. Este ensaio foi realizado com um grupo de quatro animais imunizado com 18ug de E6E67, outro com cinco animais imunizado com 25ug de UbE6E7 e um grupo de quatro animais que foi vacinado com PBS, 2 M uréia. Um grupo controle de cinco animais selvagens foi imunizado com PBS, 2 M uréia e desafiado juntamente com os grupos deficientes para TLR4.

O crescimento do tumor foi avaliado por 60 dias e, ao fim do experimento ou quando o tumor atingiu 1,5 cm de diâmetro, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂.

4.18.2 Vacinação após 7 dias do desafio

Grupos de cinco animais C57BL/6 foram desafiados com $7,5 \times 10^4$ células TC-1 e após sete dias, foi administrada, pela via subcutânea, a primeira dose da vacina e as duas

subsequentes foram injetadas após 14 e 31 dias. Em cada dose foi aplicado PBS, 2 M uréia ou 1 nmol do antígeno - 18ug de E6E7, 25ug de E6E7Ub ou 25 ug de UbE6E7.

O crescimento do tumor foi avaliado por 60 dias e, ao fim do experimento ou quando o tumor atingiu 1,5 cm de diâmetro, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂.

4.19 Ensaio de marcação intracelular de IFN- γ

➤ Cultura de PBMC

A marcação de IFN- γ foi realizada com células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de camundongos C57BL/6 imunizados seis dias após a administração da terceira dose vacinal. O sangue de cada animal foi coletado pela via retro-orbital em tubo estéril contendo heparina. As células foram tratadas por 5 minutos no gelo com tampão de lise ACK (150 mM NH₄Cl, 10 mM K₂CO₃, 0,01 mM EDTA, pH 7.4) até a ruptura das hemácias e então centrifugadas a 250 x g por 10 minutos. Após lavagem com meio RPMI a 2% de soro fetal bovino (SFB) e centrifugação a 250 x g por 10 minutos, as células (10⁵ células/poço) foram incubadas em cultura de placa de 96 poços (Culture Cluster – Corning) em meio RPMI completo por 24 horas a 37 °C e 5% CO₂ na ausência ou presença de peptídeos (2ug/ml) de E6 (VYDFAFRDL⁴⁹⁻⁵⁷; DKKQRFHNI¹²⁷⁻¹³⁵) e de E7 (RAHYNIVTF⁴⁹⁻⁵⁷; LCVQSTHVD⁶⁷⁻⁷⁵).

Após este período as células foram incubadas a 37 °C e 5% CO₂ por mais 12 horas na presença de Brefeldin A (GolgiPlug, BD Bioscience), um inibidor do transporte de proteínas do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi, promovendo o acúmulo de citocinas e de outras proteínas na célula.

Os peptídeos utilizados para estímulo correspondem a epítomos MHC I- restritos, específicos para os haplótipos H2-D^b e H2-K^b, e foram determinados para as proteínas recombinantes E6E7 e E7E7Ub através da análise de sequência no programa SYFPEITHI (Rammensee et al., 1999). Tais peptídeos foram sintetizados pelo Dr. Robson Lopes de Melo do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada – CAT, Instituto Butantan.

➤ Marcação extracelular e intracelular

As marcações foram realizadas segundo o manual do Kit Fixation/Permeabilization (Cytotfix/Cytoperm™ Plus, BD).

Após o período de incubação as células foram mantidas por 30 minutos a 4 °C com anticorpo CD8 conjugado a Percp (BD Bioscience). As células foram então fixadas e

permeabilizadas com solução Fixation/Permeabilization e tampão BD Perm/Wash™, em seguida tratadas com anticorpo anti-IFN- γ conjugado a ficoeritrina (PE) (BD Bioscience) por 30 minutos a 4 °C. As células foram ressuspensas em tampão (PBS pH 7,5, SFB 2% (v/v)) e examinadas por citometria de fluxo utilizando o aparelho FACS Canto (BD Bioscience). Os dados foram analisados com o auxílio do programa FlowJo. O teste estatístico T-Student foi aplicado para comparação de dados por dupla com $p < 0,05$.

4.20 Elispot

Camundongos C57BL/6 selvagens, C57BL/6 Nocautes para CD4 e C57BL10/ScCr (TLR4-deficiente) foram imunizados com três doses vacinais e após duas semanas da última dose foram desafiados com $7,5 \times 10^4$ células TC-1. O ensaio de ELISPOT foi realizado segundo manual do ELISPOT Set (BD Bioscience) com células mononucleares do sangue periférico (PBMC) destes camundongos vinte dias após o desafio.

O sangue de cada animal foi coletado pela via retro-orbital em tubo estéril contendo heparina. As células foram tratadas por 5 minutos no gelo com tampão de lise ACK (150 mM NH_4Cl , 10 mM K_2CO_3 , 0,01 mM EDTA, pH 7.4) até ruptura das hemácias e então centrifugadas a $250 \times g$ por 10 minutos. Após lavagem com meio RPMI a 2% de SFB e centrifugação a $250 \times g$ por 10 minutos, as células foram incubadas (10^5 células/poço) em placa de 96 poços (Cluster – Corning), previamente sensibilizadas com anticorpo monoclonal de captura anti-mouse IFN- γ (BD Bioscience).

As células foram incubadas em meio RPMI completo por 48 horas a 37 °C e 5% CO_2 na ausência ou presença de peptídeos (2 ug/ml) específicos de E6 (VYDFAFRDL⁴⁹⁻⁵⁷; DKKQRFHNI¹²⁷⁻¹³⁵) e/ou de E7 (RAHYNIVTF⁴⁹⁻⁵⁷; LCVQSTHVD⁶⁷⁻⁷⁵)

Após esse período, as células foram desprezadas, a placa lavada três vezes com tampão de lavagem PBS/Tween 0,05% (v/v) e incubada por 2 horas à temperatura ambiente com anticorpo monoclonal anti-mouse IFN- γ biotilado (BD Bioscience). A placa foi então lavada e submetida à revelação e os spots foram contados com auxílio de uma lupa.

O teste estatístico T-Student foi aplicado no ensaio realizado com animais TLR-4 deficientes para comparação de dados por dupla com $p < 0,05$.

4.21 Ensaios de degradação pelo PT20S e de poliubiquitinação dos antígenos

Os ensaios de degradação pelo proteassomo 20S (PT20S) e poliubiquitinação foram realizados em colaboração com a Dra. Marilene Demasi, do laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan, que nos forneceu o PT20S purificado de células de cavalo, ubiquitina, Bortezomibe e alguns dos reagentes.

4.21.1 Degradação pelo PT20S

Cada um dos antígenos, E6E7, E6E7Ub e UbE6E7 (5ug) foram incubados à 37 °C em tampão 20 mM Tris-HCl pH7,5 na presença ou ausência do PT20S (5ug). Após uma ou duas horas de incubação foi adicionado às amostras tampão SDS-PAGE (250 mM Tris-HCl pH 6,8, SDS 10% (v/v), azul de bromofenol 0,5% (m/v), glicerol 50% (v/v), 50 mM DTT). Após aquecimento por 5 minutos a 100 °C as amostras foram aplicadas no gel de poliacrilamida 15% e foi realizada a eletroforese (SDS-PAGE) conforme descrito na seção 4.14.

Após as amostras percorrerem o gel de poliacrilamida, as proteínas foram transferidas do gel para membrana de nitrocelulose, durante 1 hora e 30 minutos, em uma voltagem de 0,8 V por cm² de membrana.

Após a transferência, a membrana foi bloqueada por 12 horas a 4 °C em PBS/Tween 0,1% (v/v) com Leite 5% (m/v). Ao término desse período, a membrana foi lavada em PBS/Tween 0,1% (v/v) por quatro vezes e incubada por 2 horas com anticorpo policlonal anti-E6E7 produzido em camundongo. Após lavagens com PBS/Tween 0,1% (v/v) a membrana foi incubada com anticorpo anti-IgG (1:10000) de camundongo conjugado a peroxidase (Sigma-Aldrich)

A membrana foi novamente lavada e a reatividade específica do anticorpo à proteína foi analisada por quimioluminescência utilizando o kit ECL Prime (Amersham Biosciences), de acordo com as instruções do fabricante.

Foi realizada a análise de degradação por meio da medida da densidade de cada banda dos antígenos pelo programa ImageJ® 1.46r (National Institutes of Health, USA). Após a obtenção dos valores de densidade para cada amostra, foi feita uma razão do valor da densidade da banda da proteína incubada com o PT20S pelo valor da densidade da banda da proteína incubada, durante o mesmo tempo, sem PT20S. Os valores da razão com/sem PT20S foram plotados no gráfico de densidade relativa das bandas.

4.21.2 Ensaio de poliubiquitinação

O ensaio de poliubiquitinação foi realizado com extrato citoplasmático de células RAW 264.7 preparadas conforme descrito na seção 4.16. O extrato contém todas as enzimas e proteínas necessárias para promover a poliubiquitinação do antígeno e sua degradação pelo proteassomo 26S.

➤ *Incubação dos antígenos com extrato celular*

Os antígenos E6E7, E6E7Ub e UbE6E7 (5ug) foram incubados na ausência ou presença de 1 mM Bortezomibe (inibidor do proteassomo 26S) (LC Laboratories®, Woburn, MA, USA) por duas horas à 37 °C em 400ul de solução contendo 90ug de extrato de células RAW, 5ug Ubiquitina (Biomol), 5 mM ATP, 1 mM DTT e 20 mM Tris-HCl pH 7,4 e o volume completado com tampão 20 mM Tris-HCl pH7,5, 5 mM MgCl₂ e 20 mM KCl.

➤ *Imunoprecipitação*

Após duas horas de incubação com o extrato celular, as amostras foram incubadas com anticorpo policlonal anti-E6E7 produzido em Hamster por duas horas a temperatura ambiente, sob constante e leve agitação. Em seguida, cada amostra foi incubada com 100 ul de resina ligadora de IgG, Proteína A-Sepharose (GE healthcare), previamente lavada com tampão 20 mM Tris-HCl pH7,5, por 14 horas à 4 °C sob constante e leve agitação.

Após incubação com a resina, as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 30 segundos e o sobrenadante foi descartado. As proteínas ligadas ao anticorpo anti-E6E7 ficaram então no precipitado imobilizados pela resina Proteína A-Sepharose.

O precipitado foi lavado e centrifugado quatro vezes com tampão 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl. Foi então adicionado em cada amostra 50 ul de tampão SDS-PAGE. Após aquecimento por 5 minutos a 100 °C as amostras foram aplicadas no gel de poliacrilamida 12% e foi realizado a eletroforese (SDS-PAGE) conforme descrito na seção 4.14.

As proteínas foram transferidas do gel para membrana de nitrocelulose, durante 1 hora e 30 minutos, em uma voltagem de 0,8 V por cm² de membrana. Após a transferência, a membrana foi bloqueada por 12 horas a 4 °C em PBS/Tween 0,1% (v/v) com Leite 5% (m/v). Ao término desse período, a membrana foi lavada em PBS/Tween 0,1% (v/v) por quatro vezes e incubada por 2 horas com anticorpo anti-ubiquitina (1:200) (Sta. Cruz Biotech) produzido em camundongo. Após lavagens com PBS/Tween 0,1% (v/v) a membrana foi incubada com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (Sigma-Aldrich)

A membrana foi novamente lavada e a reatividade específica do anticorpo à proteína foi analisada por quimioluminescência utilizando o kit ECL Prime (Amersham Biosciences), de acordo com as instruções do fabricante.

5 RESULTADOS

5.1 Clonagem, expressão, purificação e caracterização de E6E7, E6E7Ub, UbE6E7 e Ubiquitina

5.1.1 Construção dos vetores pAE-E6E7Ub, pAE-E6E7, pAE-Ub e pAE-UbE6E7

A sequência sintética E6E7Ub recebida no vetor pUC57 foi subclonada por Morale, 2009 em vetor pAE através da digestão dos vetores com as enzimas BamHI e PvuII e posterior reação de ligação (resultados não mostrados). O vetor pAE-E6E7Ub foi submetido à reação de sequenciamento, que confirmou a correta clonagem.

O vetor pAE-E6E7Ub foi digerido com a enzima EcoRI e submetido à eletroforese em gel de agarose, no qual pôde ser observada a banda correspondente ao fragmento de Ubiquitina removido do vetor (Figura 10 A). O vetor foi purificado do gel e religado para a formação do pAE-E6E7 (Figura 10 B).

Figura 10 - Gel de agarose da digestão do vetor pAE-E6E7Ub com EcoRI para formação do vetor pAE E6E7

(A) 1: Marcador 1 kb plus (Invitrogen); 2: vetor pAE-E6E7Ub antes da digestão; 3: pAE E6E7Ub digerido com EcoRI. A seta mostra a banda correspondente ao fragmento de Ubiquitina (Ub). (B) 1: Marcador 1 kb plus (Invitrogen); 2: vetor pAE-E6E7Ub; 3: vetor pAE-E6E7.

Para construção do vetor pAE-Ub foi realizada primeiramente a reação de PCR para a amplificação da sequência de Ubiquitina a partir do pAE-E6E7Ub, conforme descrito na seção 4.7. O produto sequenciado foi subclonado em vetor pGEM-T easy e foi realizada a digestão do vetor pGEM-T-Ub com as enzimas EcoRI e HindIII (Figura 11). O fragmento de Ubiquitina foi removida do gel, purificado, e inserido no vetor pAE, previamente digerido com EcoRI e HindIII, através de reação de ligação. Após transformação em bactéria

competente DH5- α , o vetor pAE-Ub foi extraído por *mini-prep* e sua sequência confirmada em sequenciador Genetic Analyser 3100.

Figura 11 - Gel de agarose da digestão do vetor pGEM-T- Ub com EcoRI e HindIII

1: Marcador 1 kb plus (Invitrogen); 2: vetor pGEM-T- Ub digerido com as enzimas EcoRI e HindIII. A seta mostra a banda correspondente ao fragmento de Ubiquitina (Ub).

Para construção do vetor pAE-UbE6E7 foi realizada primeiramente a reação de PCR para a amplificação da sequência da Ubiquitina a partir do pAE-E6E7Ub, conforme descrito na seção 4.8. O fragmento de Ubiquitina e o vetor pAE-E6E7 foram digeridos com as enzimas NdeI e BamHI e purificados do gel para posterior ligação e formação do vetor de expressão pAE-UbE6E7. Após clonagem em DH5- α , o vetor pAE-UbE6E7 foi extraído por *mini-prep*. O vetor foi digerido com as enzimas NdeI e BamHI para verificar a correta ligação do fragmento (Figura 12) e a sequência foi confirmada por sequenciamento.

Figura 12 - Gel de agarose da digestão do vetor pAE-UbE6E7 com NdeI e BamHI

1: Marcador 1 kb plus (Invitrogen); 2: vetor pAE-UbE6E7 não digerido; 3: vetor pAE-UbE6E7 digerido. A seta mostra a banda correspondente ao fragmento de Ubiquitina (Ub).

5.1.2 Expressão e purificação dos antígenos E6E7, E6E7Ub, UbE6E7 e Ubiquitina

Células competentes BL21 Star (DE3)pLysS foram transformadas por choque térmico com pAE-E6E7, pAE-E6E7Ub, pAE-Ub e pAE-UbE6E7 e cultivadas em 0,5 L de meio LB suplementado com ampicilina a 37 °C. Após atingir a densidade ótica de 0,6 no comprimento de onda de 600 nm, bactérias foram induzidas com 1 mM de IPTG e a expressão das proteínas recombinantes foi verificada por SDS-PAGE (Figura 13).

A massa molecular de cada antígeno foi estimada pelo ProtParam (<http://ca.expasy.org>). Estima-se que as proteínas E6E7, E6E7Ub, UbE6E7 e Ubiquitina possuam massa molecular de 17,4 kDa, 25,8 kDa, 25,8 kDa e 11,4, respectivamente.

Figura 13 - SDS-PAGE da expressão dos antígenos proteicos recombinantes E6E7, E6E7Ub, Ub e UbE6E7

1: Marcador de massa molecular (Amersham - GE); 2: alíquota antes da indução; 3: alíquota após indução com 1 mM de IPTG. As setas mostram as bandas correspondentes aos antígenos recombinantes.

Os antígenos apresentaram-se na forma insolúvel e, para solubilizá-las, as células lisadas foram lavadas com solução 2 M uréia, centrifugadas e posteriormente ressuspensas em solução 8 M uréia (Figura 14).

Os antígenos foram purificados sob condição desnaturante através de cromatografia de afinidade com a resina Chelating-Sepharose®. Para tanto, as proteínas foram aplicadas na resina pré-equilibrada, conforme descrito em Material e Métodos e posteriormente lavadas com diferentes concentrações de Imidazol (60 mM, 80 mM e 100 mM de Imidazol). As proteínas foram eluídas com 250 mM de Imidazol e analisadas quanto ao grau de pureza em SDS-PAGE (Figura 15).

Figura 14 - SDS-PAGE da solubilização dos antígenos

(A) E6E7; (B) E6E7Ub; (C) Ub; (D) UbE6E7. 1: Marcador molecular (Amersham - GE); 2: antes da indução; 3: após indução; 4: precipitado após a sonicação; 5: sobrenadante após sonicação; 6: precipitado após lavagem com 2M uréia; 7: sobrenadante após lavagem com 2M uréia; 8: proteínas solúveis com 8M uréia.

Figura 15 - SDS-PAGE dos antígenos recombinantes purificados

Antígenos proteicos recombinantes, Ubiquitina (Ub), E6E7, E6E7Ub e UbE6E7 purificados. PM: Marcador de massa molecular (Amersham - GE).

5.1.3 Caracterização das proteínas

Após a purificação e diálise em tampão PBS com 2M uréia, as proteínas recombinantes foram caracterizadas por espectrometria de massas, por meio do qual foi possível identificar nas construções E6E7 e E6E7Ub peptídeos correspondentes às oncoproteínas E6 e E7. Os peptídeos correspondentes à oncoproteína E7 foram identificados na construção UbE6E7 e correspondentes à proteína Ubiquitina nas construções E6E7Ub, UbE6E7 e Ubiquitina (Figura 16). Esses dados confirmam a sequência dos antígenos proteicos que foram utilizados nos ensaios de imunização.

Figura 16 - Identificação de peptídeos dos antígenos por espectrometria de massa

E6E7

MHHHHHLEGSMTHDIILECVAAYVYDFAFRDLCIVYRDGNPYAAYDKKQRFHNIRGRWTGAA
YKLASLEAAYTLHEYMLDLQPETTAAYGQAEPDRAHYNIVTFCKCDSTLRLCVQSTHVDIRAAY
LEDLLMGTLGIVCPIAAYASE

E6E7Ub

MHHHHHLEGSMTHDIILECVAAYVYDFAFRDLCIVYRDGNPYAAYDKKQRFHNIRGRWTGAA
YKLASLEAAYTLHEYMLDLQPETTAAYGQAEPDRAHYNIVTFCKCDSTLRLCVQSTHVDIRAAY
LEDLLMGTLGIVCPIAAYASEFMQIFVKLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQRLLFA
GKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRRLGA

UbE6E7

MHHHHHMQIFVKLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQRLLFAGKQLEDGRTLSDY
NIQKESTLHLVLRRLRGAGSMTHDIILECVAAYVYDFAFRDLCIVYRDGNPYAAYDKKQRFHNIRG
RWTGAAYKLASLEAAYTLHEYMLDLQPETTAAYGQAEPDRAHYNIVTFCKCDSTLRLCVQSTH
VDIRAAYLEDLLMGTLGIVCPIAAYASEFEA

Ubiquitina

MHHHHHLEGSDLEICSWYHGIHMQIFVKLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQRLLI
FAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRRLGA

Em azul os aminoácidos de E6, em verde os aminoácidos de E7, em rosa os aminoácidos da Ubiquitina. Os peptídeos identificados estão destacados em amarelo.

As proteínas E6E7Ub, UbE6E7 e Ubiquitina foram caracterizadas por *Western Blot* com anticorpo anti-ubiquitina. Como observado na figura 17, o anticorpo reconheceu as bandas de aproximadamente 27,5 kDa, correspondentes à E6E7Ub e UbE6E7, e a banda de aproximadamente 11 kDa correspondente à Ubiquitina, e não reconheceu o antígeno E6E7.

Figura 17 - Imunomarcação com anticorpo anti-ubiquitina

Os antígenos proteicos E6E7, E6E7Ub, UbE6E7 e Ubiquitina, após SDS-PAGE, foram transferidos para a membrana de nitrocelulose e realizou-se *Western blot* com anticorpo anti-ubiquitina. PM: Marcador de massa molecular (Amersham - GE).

5.2 Imunização com antígenos E6E7, E6E7Ub, UbE6E7 e Ubiquitina

5.2.1 Ensaios de imunização profilática

Para o estudo do potencial profilático dos antígenos proteicos, foram realizados três ensaios de imunização com camundongos C57BL/6 selvagens. No primeiro foram utilizados três grupos de animais discriminados pelo imunógeno aplicado em solução PBS com 2M uréia (E6E7, E6E7Ub ou PBS), sendo cada grupo composto por cinco animais. Foram administradas três doses do antígeno proteico em intervalos de 14 dias. Após duas semanas do término das imunizações os animais foram desafiados com $7,5 \times 10^4$ células TC-1.

O segundo e o terceiro ensaios foram realizados seguindo o mesmo protocolo de imunização do primeiro, porém foi acrescentado, em ambos, um grupo controle imunizado com a proteína recombinante Ubiquitina. No terceiro ensaio foi adicionado um grupo imunizado com UbE6E7 e foi realizado um segundo desafio após 70 dias do primeiro desafio.

Todos os animais que receberam as três doses de PBS ou Ubiquitina desenvolveram tumor nos quinze primeiros dias após o desafio. A vacinação com o antígeno E6E7 foi capaz de manter livres de tumor 100% dos animais, mesmo após um segundo desafio com células TC-1. Resultado este superior ao encontrado nos animais imunizados com o antígeno E6E7Ub, que foi de 60% de proteção (Figura 18 A e B). Em contrapartida, a fusão da

Ubiquitina no N terminal do antígeno (UbE6E7) promoveu uma melhor resposta protetora contra o tumor comparada à fusão no C terminal, com eficácia de 80 a 100% de proteção (Figura 18 C).

Figura 18 – Ensaio de imunização profilática em animais C57BL/6

Grupos de cinco animais C57BL/6 foram vacinados pela via subcutânea com três doses do antígeno proteico E6E7 (15 ou 18ug), E6E7Ub (15 ou 25 ug) ou UbE6E7 (15 ou 25ug) em intervalos de quatorze dias e, após duas semanas da última dose, foram desafiados com $7,5 \times 10^4$ células tumorais TC-1. (A) Primeiro ensaio de imunização no qual os animais foram vacinados com PBS 2M uréia, E6E7 ou E6E7Ub. (B) Segundo ensaio de imunização no qual os animais foram vacinados com PBS, Ubiquitina (Ub), E6E7 ou E6E7Ub. (C) Terceiro ensaio de imunização profilática no qual os animais foram vacinados com PBS 2M uréia, Ubiquitina (Ub), E6E7, E6E7Ub ou UbE6E7. Após 70 dias do desafio, os animais sem tumor detectável foram novamente desafiados com $7,5 \times 10^4$ células tumorais TC-1. Em (C) A seta indica o momento em que foi realizado o 2º desafio.

Visto que as proteínas foram produzidas em *E.coli*, é possível que o lipopolissacarídeo (LPS), componente da parede de bactérias gram-negativas, esteja presente nas preparações vacinais. O LPS, ao ser reconhecido pelo Receptor do tipo Toll 4 (TLR4) das células mielóides, induz a ativação de diversas vias de sinalização que culminam na acentuada produção de citocinas pró e anti-inflamatórias. Por ser um potente ativador de macrófagos e

de células dendríticas, o LPS pode então ter desencadeado uma resposta imune mais eficaz contra as células TC-1.

Para avaliarmos se o LPS teria um papel importante como adjuvante na resposta imune anti-tumoral, realizamos um ensaio de imunização profilática com animais deficientes para TLR4 (C57BL10/ScCr). Um grupo de seis animais foi imunizado com três doses da vacina E6E7 e um grupo controle, contendo cinco animais, imunizado com PBS com 2M uréia. Todos os animais do grupo controle apresentaram tumor nos primeiros dez dias e 100% dos animais imunizados com E6E7 não desenvolveram tumor (Figura 19).

Estes resultados de imunização profilática indicam que o candidato vacinal contendo epítomos imunogênicos de E6 e E7 é capaz de promover uma eficaz resposta imunológica contra o tumor, independente da estimulação das células por LPS.

Figura 19 – Ensaio de imunização profilática em animais TLR4-Deficiente

Animais C57BL10/ScCr (TLR4-Deficiente) foram vacinados pela via subcutânea com PBS 2M uréia (5 animais) ou 18 ug de E6E7 (6 animais) em intervalos de quatorze dias e, após duas semanas da última dose, foram desafiados com $7,5 \times 10^4$ células tumorais TC-1.

Para avaliar a participação de linfócitos T CD4 e T CD8 na resposta imune contra o tumor, foram realizados ensaios de imunização com animais C57BL/6 nocautes para CD4 ou para CD8.

Os animais nocautes foram imunizados com PBS 2M uréia, E6E7 ou E6E7Ub por via subcutânea. Foram administradas três doses das vacinas em intervalos de duas semanas entre as doses e, após duas semanas, os animais foram desafiados com $7,5 \times 10^4$ células TC-1. Como controle, um grupo de animais C57BL/6 selvagens não imunizados foi desafiado com as células TC-1, concomitantemente ao desafio dos nocautes.

No ensaio com animais nocautes para CD4, todos aqueles imunizados com PBS 2M uréia apresentaram tumor. Semelhante aos ensaios realizados com animais selvagens, 100% dos animais nocautes para CD4 imunizados com E6E7 não desenvolveram tumor. A imunização com a proteína E6E7Ub protegeu 50% dos animais (Figura 20 A). Por outro lado, todos os animais nocautes para CD8 desenvolveram tumor nos primeiros 15 dias do desafio, independentemente do antígeno administrado (Figura 20 B).

Para avaliar a longevidade da proteção conferida pelo antígeno E6E7, após 70 dias do primeiro desafio, os animais nocautes para CD4 sem tumor aparente foram novamente desafiados com $7,5 \times 10^4$ células TC-1. Após 30 dias do segundo desafio, um animal imunizado com E6E7 desenvolveu tumor, apresentando ao final do experimento 87,5% de eficácia no combate às células tumorais. Todos os animais do grupo controle, C57BL/6 selvagem, apresentaram tumor conforme mostrado nos resultados anteriores (dados não mostrados).

Figura 20 – Ensaio de imunização profilática em animais nocautes para CD4 ou para CD8

Animais nocautes CD4 ou CD8 foram vacinados pela via subcutânea com três doses de PBS 2M uréia, E6E7 (15 ug) ou E6E7Ub (25ug) em intervalos de quatorze dias. Após duas semanas da última dose, animais selvagens (5 animais) e os nocautes foram desafiados com $7,5 \times 10^4$ células tumorais TC-1. (A) Ensaio de Imunização com animais nocautes para CD4 vacinados com PBS 2M uréia (9 animais), E6E7 (8 animais) ou E6E7Ub (8 animais). Após 70 dias do desafio, os animais sem tumor foram novamente desafiados com $7,5 \times 10^4$ células tumorais TC-1. A seta indica o momento em que foi realizado o 2º desafio. (B) Ensaio de imunização com grupos de cinco animais nocautes para CD8 vacinados com PBS 2M uréia, E6E7 ou E6E7Ub.

Os resultados destes ensaios evidenciam a importância da participação de linfócitos T CD8⁺, mas não de linfócitos T CD4⁺, na resposta imune contra as células tumorais expressando E6 e E7. Além disso, esses experimentos com nocautes mostram que a indução

de uma resposta protetora contra as células TC-1, através da vacinação com E6E7 e E6E7Ub, não requer a participação de células T auxiliares.

5.2.2 Ensaio de imunização terapêutica

Para avaliar o potencial dos candidatos vacinais em desencadear uma resposta imune eficaz no tratamento de tumor, foram realizados dois ensaios de imunização terapêutica com cinco camundongos C57Bl/6 por grupo. No primeiro ensaio os animais receberam inicialmente $7,5 \times 10^4$ células TC-1 e, somente após 3 dias, foram imunizados com duas doses do antígeno, em intervalos de sete dias. Após 85 dias do primeiro desafio foi realizado um segundo desafio com as células TC-1.

Todos os animais vacinados com PBS 2M uréia e Ubiquitina desenvolveram tumor após 15 dias do desafio. O tratamento com a vacina UbE6E7 foi eficaz no combate ao tumor em 100% dos animais, enquanto 80% dos animais tratados com E6E7 e E6E7Ub ficaram livres de tumor ao final do experimento (Figura 21 A). Mesmo o animal que apresentou tumor dos grupos E6E7 e E6E7Ub, houve um atraso no aparecimento do tumor (Figura 21 B), principalmente do grupo imunizado com o antígeno E6E7, mostrando que foi eficaz na indução de uma resposta protetora, ainda que parcial.

Figura 21 – Ensaio de imunização terapêutica em animais C57BL/6. Vacinação iniciada após três dias do desafio

A

B

Grupos de cinco animais C57BL/6 foram vacinados pela via subcutânea com três doses de PBS 2M ureia ou Ubiquitina (12ug), E6E7 (18ug), E6E7Ub (25ug) ou UbE6E7 (25ug), em intervalos de sete dias, sendo a primeira dose administrada após três dias do desafio com $7,5 \times 10^4$ células tumorais TC-1. Após 85 dias do desafio, os animais sem tumor foram novamente desafiados com $7,5 \times 10^4$ células TC-1. (A) Gráfico da porcentagem de animais livres de tumor. A seta indica o momento em que foi realizado o 2º desafio. (B) Gráficos do crescimento tumoral dos grupos vacinados com PBS 2M uréia, Ubiquitina (Ub), E6E7 ou E6E7Ub. O tamanho do tumor de cada animal é dado em cm^2 (comprimento x largura).

Foi realizado um ensaio de imunização terapêutica com camundongos deficientes para TLR4. Os animais foram desafiados com $7,5 \times 10^4$ células TC-1 e 3 dias após o desafio os animais receberam a 1ª dose da vacina.

Como controle positivo do crescimento tumoral, um grupo de animais C57BL/6 selvagem foi vacinado com PBS 2M uréia. Todos os animais imunizados com PBS 2M uréia

adquiriram tumor e o tratamento com E6E7 ou UbE6E7 foi eficaz para inibir o crescimento do tumor em 100-80% dos animais (Figura 22 A), ou no caso do animal que apresentou o tumor (grupo UbE6E7), o crescimento tumoral foi tardio (Figura 22 B)

Figura 22 – Ensaio de imunização terapêutica em animais TLR4-Deficiente

Animais C57BL10/ScCr (TLR4-Deficiente) foram vacinados pela via subcutânea com três doses de PBS 2M uréia (4 animais), 18ug de E6E7 (4 animais) ou 25 ug de UbE6E7 (5 animais) em intervalos de sete dias, sendo a primeira dose administrada após três dias do desafio com $7,5 \times 10^4$ células tumorais TC-1. Neste ensaio foi incluído um grupo de 5 animais C57BL/6 (Selvagem) como controle positivo do crescimento do tumor, vacinado com PBS 2M uréia. A) Gráfico da porcentagem de animais livres de tumor. (B) Gráficos do crescimento tumoral dos grupos de animais TLR4-Deficiente vacinados com PBS 2M uréia ou E6E7Ub e do grupo selvagem vacinado com PBS 2M uréia. O tamanho do tumor de cada animal é dado em cm^2 (comprimento x largura).

Em um terceiro ensaio de imunização terapêutica, a primeira dose da vacina foi aplicada somente após sete dias do desafio com $7,5 \times 10^4$ células TC-1, ao contrário dos ensaios anteriores em que a primeira dose foi aplicada após 3 dias do desafio com o mesmo número de células. Foram administradas três doses das vacinas e em intervalos de dias mais espaçados entre as doses. A primeira dose foi aplicada após 7 dias do desafio e as duas subseqüentes foram administradas após 14 dias e 31 dias. Todos os animais vacinados com PBS 2M uréia e Ubiquitina desenvolveram tumor até os primeiros 15 dias. Neste ensaio a fusão da Ubiquitina ao antígeno promoveu uma melhor resposta terapêutica contra o tumor, em comparação ao grupo E6E7. Dos animais tratados com E6E7Ub e UbE6E7, 40 e 60%, respectivamente, ficaram livres de tumor, enquanto todos os animais que foram imunizados com E6E7 desenvolveram tumor ao longo dos 60 dias após o desafio (Figura 23 A). É evidente também que os animais que desenvolveram tumor do grupo com UbE6E7 adquiriram o tumor tardiamente. O mesmo parece ter ocorrido com os animais do grupo E6E7 (com uma maior heterogeneidade), mas não no grupo E6E7Ub (Figura 23 B)

Figura 23 – Ensaio de imunização terapêutica em animais C57BL/6. Vacinação iniciada após sete dias do desafio

Grupos de cinco animais C57BL/6 foram vacinados pela via subcutânea com três doses de PBS 2M uréia, 15ug de E6E7, 25ug de E6E7Ub ou 25ug de UbE6E7, sendo a primeira dose administrada após sete dias do desafio com $7,5 \times 10^4$ células tumorais TC-1, a segunda dose após 14 dias e a terceira dose após 31 dias do desafio. (A) Gráfico da porcentagem de animais livres de tumor. As setas indicam o momento em que foi administrada a primeira, a segunda ou a terceira dose. (B) Gráficos do crescimento tumoral dos grupos vacinados com PBS 2M uréia, E6E7 ou E6E7Ub. O tamanho do tumor de cada animal é dado em cm^2 (comprimento x largura).

5.3 Avaliação da resposta imune celular induzida por E6E7 e E6E7Ub

5.3.1 Análise da indução de células T CD8⁺ específicas para E6 e/ou para E7

Para analisar a capacidade das proteínas E6E7 e E6E7Ub, administradas em regime vacinal de três doses, de ativar células T CD8⁺ específicas para E6 e/ou E7, foi realizado o ensaio de marcação de IFN- γ .

A marcação de IFN- γ foi realizada, com células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de camundongos C57BL/6, no sexto dia após a administração da terceira dose de E6E7, E6E7Ub ou PBS. As células foram estimuladas com peptídeos específicos de E6 (VYDFAFRDL⁴⁹⁻⁵⁷; DKKQRFHNI¹²⁷⁻¹³⁵) e de E7 (RAHYNIVTF⁴⁹⁻⁵⁷; LCVQSTHVD⁶⁷⁻⁷⁵).

Quando comparado ao grupo imunizado com PBS, os camundongos imunizados com E6E7Ub desenvolveram significativo número de linfócitos T CD8⁺ (Figura 24), específicos para E6 e/ou E7, produtores de IFN- γ . Embora não significativo em relação as células não estimuladas, a fusão da Ubiquitina na região C terminal de E6E7 promoveu um enriquecimento da resposta de linfócitos CD8⁺.

Figura 24 - Análise por citometria de fluxo de células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ mediante estímulo *in vitro* de PBMC com peptídeos específicos de E6 e E7

A análise de produção de IFN- γ foi realizada seis dias pós a terceira dose de E6E7, E6E7Ub ou PBS. (A) Gráfico da porcentagem de células T positiva para CD8 e INF- γ . Células sem estímulo representadas por $\emptyset$ e células com estímulo por E6/E7. (B) Marcação da população de células T CD8 positivas para IFN- γ . Populações positivas para CD8 e IFN- γ estão realçadas por um retângulo com a respectiva porcentagem em relação ao número de linfócitos T CD8 totais. * Diferença estatística (p<0,05) significativa.

5.3.2 Detecção de células produtoras de IFN- γ

Para a detecção de células produtoras de IFN- γ mediante estímulo com os peptídeos de E6 e E7 foram realizados ensaios de Elispot (*Enzyme-Linked Immunosorbent Spot*). Este ensaio detecta citocinas secretadas individualmente por cada célula em resposta ao estímulo *in vitro*.

Os experimentos de Elispot foram realizados com células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de camundongos selvagens, nocautes para CD4 ou TLR4 deficientes, utilizados nos ensaios de imunização profilática. Os animais foram imunizados com três doses da vacina e vinte dias após o desafio foi coletado sangue para o experimento. As células

foram estimuladas com peptídeos específicos de E6 (VYDFAFRDL⁴⁹⁻⁵⁷; DKKQRFHNI¹²⁷⁻¹³⁵) e/ou de E7 (RAHYNIVTF⁴⁹⁻⁵⁷; LCVQSTHVD⁶⁷⁻⁷⁵).

Foi realizado um experimento de Elispot para verificar qual peptídeo, de E6 ou de E7, é capaz de estimular acentuadamente as células a produzirem IFN- γ . Neste ensaio células PBMC de animais imunizados com PBS ou E6E7 e desafiados com células TC-1 foram estimuladas com peptídeo de E6 (VYDFAFRDL⁴⁹⁻⁵⁷) ou de E7 (RAHYNIVTF⁴⁹⁻⁵⁷) ou ambos. Foi possível verificar no grupo de E6E7 uma significativa produção de IFN- γ pelas células quando estas são estimuladas com peptídeo de E7 (Figura 25).

Figura 25 - Análise por Elispot de células produtoras de IFN- γ mediante estímulo *in vitro* de PBMC com peptídeos específicos de E6 e de E7

Gráfico da produção de IFN- γ por PBMC de C57BL/6 selvagem, previamente imunizados com PBS ou E6E7, após vinte dias do desafio com $7,5 \times 10^4$ células TC-1 e seu respectivo spot à direita. As células PBMC foram estimuladas com peptídeo de E6 (VYDFAFRDL⁴⁹⁻⁵⁷) ou de E7 (RAHYNIVTF⁴⁹⁻⁵⁷) ou ambos (E6/E7). Células não estimuladas são representadas por ∅ e células com estímulo por E6/E7. O gráfico mostra a média e o desvio padrão da triplicata experimental de cada grupo.

Para verificar se a produção de IFN- γ pelas células é dependente do estímulo por LPS foi realizado o ensaio de Elispot com Animais C57BL10/ScCr (TLR4-Deficientes) imunizados com três doses da vacina E6E7 ou PBS e desafiados com células TC-1. Foi observada uma acentuada produção de IFN- γ nas células provenientes de animais imunizados com E6E7, demonstrando que mesmo na ausência da ativação celular por LPS, a vacina E6E7 é capaz de gerar acentuada produção de IFN- γ (Figura 26).

Figura 26 - Análise por Elispot de células produtoras de IFN- γ de animais TLR4-Deficiente

Gráfico da produção de IFN- γ por PBMC de animais TLR4 deficiente (C57BL10/ScCr) previamente imunizados com PBS ou E6E7, após vinte dias do desafio com $7,5 \times 10^4$ células TC-1 e seu respectivo spot à direita. As células PBMC foram estimuladas com peptídeo de E6 (VYDFAFRDL⁴⁹⁻⁵⁷) e de E7 (RAHYNIVTF⁴⁹⁻⁵⁷). Células não estimuladas são representadas por Ø e células com estímulo por E6/E7. * Diferença estatística ($p < 0,05$) significativa.

Foi realizado um ensaio de Elispot com células (PBMC) de animais imunizados com E6E7 ou E6E7Ub, para verificar se a fusão da Ubiquitina poderia promover uma melhor resposta imune específica de E6 e/ou E7 e estimular a maior produção de IFN- γ . Nos ensaios de Elispot realizados com animais selvagens vacinados com E6E7 ou E6E7Ub e desafiados com células TC-1 (Figura 27) foi observada acentuada produção de IFN- γ , após estimulação das células com peptídeos de E6 e E7. Entretanto, por uma análise qualitativa, foi verificada uma maior produção desta citocina pelas células estimuladas provenientes de animais imunizados com E6E7UB.

Figura 27 - Análise por Elispot de células produtoras de IFN- γ de animais C57BL/6 selvagens

Gráfico da produção de IFN- γ por PBMC de C57BL/6 selvagem, previamente imunizados com PBS, E6E7 ou E6E7Ub, após vinte dias do desafio com $7,5 \times 10^4$ células TC-1 e seu respectivo spot à direita. As células PBMC foram estimuladas com peptídeos específicos de E6 (VYDFAFRDL⁴⁹⁻⁵⁷; DKKQRFHNI¹²⁷⁻¹³⁵) e de E7 (RAHYNIVTF⁴⁹⁻⁵⁷; LCVQSTHVD⁶⁷⁻⁷⁵). Células não estimuladas são representadas por Ø e células com estímulo por E6/E7. O gráfico mostra a média e o desvio padrão da triplicata experimental de cada grupo.

Foi analisada por Elispot a capacidade das vacinas E6E7 e E6E7Ub em estimular a produção de IFN- γ mesmo na ausência de linfócitos TCD4. Células (PBMC) de animais CD4 nocautes imunizados com PBS, E6E7 ou E6E7Ub e desafiados com células TC-1 foram estimuladas com peptídeos de E6 e de E7. Foi possível verificar tanto no grupo de E6E7 quanto no grupo de E6E7Ub uma significativa produção de IFN- γ , mesmo na ausência de linfócitos TCD4. A fusão da Ubiquitina no domínio C-terminal da proteína E6E7 parece estimular uma maior produção de IFN- γ (Figura 28). Estes resultados demonstram que a vacinação com E6E7 ou E6E7Ub é capaz de gerar produção acentuada de IFN- γ independentemente da participação de linfócitos T CD4⁺.

Figura 28 - Análise por Elispot de células produtoras de IFN- γ de animais C57BL/6 nocautes para CD4

A) Gráfico da produção de IFN- γ por PBMC de C57BL/6 selvagem, previamente imunizados com PBS, E6E7 ou E6E7Ub, após vinte dias do desafio com $7,5 \times 10^4$ células TC-1 e seu respectivo spot à direita (B) Gráfico da produção de IFN- γ por PBMC de C57BL/6 nocaute para CD4, previamente imunizados, após vinte dias do desafio com $7,5 \times 10^4$ células TC-1 e seu respectivo spot à direita. As células PBMC foram estimuladas com peptídeos específicos de E6 (VYDFAFRDL⁴⁹⁻⁵⁷; DKKQRFHNI¹²⁷⁻¹³⁵) e de E7 (RAHYNIVTF⁴⁹⁻⁵⁷; LCVQSTHVD⁶⁷⁻⁷⁵). Células não estimuladas são representadas por Ø e células com estímulo por E6/E7.

5.4 Caracterização preliminar da degradação e poliubiquitinação dos antígenos

O proteassomo 26S, formado pela unidade catalítica 20S e por unidades regulatórias (19S ou 11S), é o componente do sistema Ubiquitina-Proteassomo (UPS) responsável pela degradação de proteínas modificadas por cadeias de poliubiquitina (Deveraux et al., 1994; Driscoll, Goldberg, 1990). *In vivo*, o proteassomo 20S existe não só como parte do complexo 26S, mas também como partícula livre capaz de degradar proteínas independentemente de poliubiquitinação e de gerar peptídeos a serem apresentados no contexto MHC classe I (Kisselev et al., 1999; Yang et al., 1995).

Considerando que cada vez mais são encontrados na literatura exemplos de proteínas que são degradadas pelo proteassomo 26S e 20S independente da poliubiquitinação (Asher et al., 2002; Asher et al., 2005; Benaroudj et al., 2001; Emmerich et al., 2000; Kisselev et al., 1999; Takeuchi et al., 2008; Tarcsa et al., 2000; Tofaris et al., 2001) e que mais de 20% das proteínas celulares são degradadas pelo proteassomo 20S (PT20S) (Baugh et al., 2009), torna-se necessário, além de verificar se a fusão da ubiquitina ao antígeno E6E7 favorece a poliubiquitinação, investigar se os antígenos objetos deste estudo são degradados pelo PT20S.

Dessa forma, foi realizado um estudo inicial de poliubiquitinação e de degradação dos antígenos E6E7, E6E7Ub e UbE6E7 pelo proteassomo 20S. Os resultados destes ensaios são preliminares e deverão ser novamente realizados para verificar a reprodutibilidade.

O experimento de degradação pelo PT20S foi realizado incubando-se os antígenos por 1 e 2 horas com PT20S. Através da análise da densitometria das bandas foi possível observar pouca degradação, cerca de 10%, da proteína E6E7. Entretanto, quando em fusão com a Ubiquitina, seja na região C ou no N terminal, o antígeno é acentuadamente degradado, cerca de 50%, na primeira hora de reação e com 2 horas de incubação E6E7Ub é degradada em mais de 70% (Figura 29).

Estes resultados demonstraram que a fusão da Ubiquitina favorece *in vitro* a degradação do antígeno pelo PT20S e pode-se supor que *in vivo* esse tipo de degradação também ocorra. Entretanto outros estudos complementares devem ser realizados para verificar se a rápida degradação destes antígenos pelo PT20S é capaz de gerar epítomos mais imunogênicos e se, dessa forma, desencadeia uma resposta imune efetiva contra o tumor.

Figura 29- Degradação *in vitro* dos antígenos pelo proteassomo 20S

Os antígenos proteicos E6E7, E6E7Ub e UbE6E7 foram incubados com ou sem o proteassomo 20S (PT20S) por 1, 2 e 3 horas. Após incubação foi realizado o Western Blot com anticorpo anti- E6E7 (resultado da revelação à direita) e foi feita a leitura da densidade de cada banda. Após a obtenção dos valores de densidade para cada amostra, foi feita uma razão do valor da densidade da banda da proteína incubada com o PT20S pelo valor da densidade da banda da proteína incubada, durante o mesmo tempo, sem PT 20S. Os valores da razão com/sem PT20S foram plotados no gráfico de densidade relativa das bandas.

Para verificarmos se a ubiquitina fusionada favorece a poliubiquitinação e consequentemente a degradação pelo 26S, foi realizado um experimento no qual os antígenos

foram incubados *in vitro* com extrato de células RAW, Ubiquitina, ATP e na presença ou ausência do inibidor do proteassomo, Bortezomibe. Após imunoprecipitação com anticorpo anti-E6E7 foi realizado a imunomarcação com anticorpo anti-ubiquitina. Foi possível observar que o antígeno UbE6E7 foi nitidamente mais poliubiquitinado que E6E7 e E6E7Ub (Figura 30).

Na presença do inibidor do proteassomo, foi possível visualizar discretas bandas de alto peso molecular, correspondente à poliubiquitinação de E6E7, entretanto no caso de E6E7Ub e UbE6E7 a diferença entre presença e ausência do inibidor não ficou evidente, provavelmente devido ao fato de que a poliubiquitinação desses antígenos gera aumento da relação ubiquitina/proteína intensificando a marcação com o anticorpo anti-ubiquitina (Figura 30).

Apesar de preliminar, esse resultado mostra claramente que *in vitro* e presumivelmente *in vivo*, a Ubiquitina fusionada no N terminal do antígeno promove acentuada poliubiquitinação.

Figura 30 - Ensaio de poliubiquitinação dos antígenos E6E7, E6E7Ub e UbE6E7

Os antígenos proteicos E6E7, E6E7Ub e UbE6E7 foram incubados com extrato citoplasmático de células RAW, na presença ou ausência de Bortezomibe (BTZ), um inibidor do proteassomo. As amostras foram posteriormente imunoprecipitadas com anticorpo anti-E6E7 e imunomarcadas, em membrana de .nitrocelulose, com anticorpo anti-Ubiquitina.

6 DISCUSSÃO

Diversos esforços têm sido realizados para desenvolver vacinas que sejam capazes de induzir uma imunidade celular específica e que confira total proteção profilática e algum grau de proteção terapêutica contra tumores causados pelo HPV.

A estratégia vacinal desenvolvida em nosso laboratório para o combate de tumores causados por HPV16 baseia-se em um antígeno proteico constituído de epítomos das oncoproteínas E6 e E7 do HPV16 capaz de estimular a proliferação de linfócitos T citotóxicos e linfócitos T auxiliares. Entre os epítomos foram inseridos espaçadores, para evitar a formação de epítomos entre as fusões, uma vez que em estudos com vacina de DNA contendo epítomos da proteína E7 do HPV16 a adição de separadores, foi crucial para a indução de proteção (Velders et al., 2001).

Associada a esta estratégia, para potencializar uma resposta citotóxica da vacina, foi feita a fusão do antígeno E6E7 à proteína Ubiquitina. A fusão à Ubiquitina poderia direcionar o antígeno para a degradação via proteassomo 26S, e assim aumentar a apresentação dos epítomos a linfócitos T citotóxicos por moléculas MHC classe I.

Inicialmente a Ubiquitina foi fusionada na extremidade C terminal do antígeno E6E7 (E6E7Ub), conforme a construção da vacina de DNA descrita por Velders et al., 2001. Os estudos iniciais de imunização profilática foram realizados com os antígenos E6E7 e E6E7Ub. Posteriormente, os ensaios foram realizados com uma nova construção vacinal, na qual a Ubiquitina foi fusionada na extremidade N terminal do antígeno E6E7 (UbE6E7).

Em estudos com vacinas de DNA, a Ubiquitina fusionada à região N terminal do antígeno promoveu uma resposta altamente citotóxica e do tipo Th1 (Delogu et al., 2000; Rodriguez et al., 1998). Já foi demonstrado que a Ubiquitina, quando fusionada linearmente ao NH₂ terminal da proteína, fornece tanto o reconhecimento e o local de ligação para a poliubiquitinação quanto medeia a subsequente degradação da proteína de fusão pelo proteassomo (Varshavsky, 2000). Assim, espera-se que fusionando a Ubiquitina no N-terminal do antígeno E6E7, promova uma resposta imune mais efetiva contra células do tumor. Após construção do pAE-E6E7, pAE-E6E7Ub, pAE-UbE6E7 e pAE-Ub e a confirmação da sequência nucleotídica desses vetores, seguiu-se a produção destes antígenos em *E.coli*. Como os quatro antígenos foram expressas em corpúsculo de inclusão, foi necessário solubilizá-los com uréia e purificá-los sob condição desnaturante. Para que não precipitassem, as proteínas foram mantidas em baixa concentração de uréia, 2M. Antígenos proteicos tem sido mantidos em até 4M uréia para uso como imunógeno em vacina de câncer

(Lowe et al., 2011). Por espectrometria de massa, foi confirmada a integridade das construções E6E6, E6E7Ub e UbE6E7. Pela reatividade observada, no *Western Blot*, com o anticorpo anti-ubiquitina, foi possível certificar-se da fusão da Ubiquitina nos antígenos E6E7Ub e UbE6E7, e da integridade da proteína recombinante Ubiquitina.

A imunização profilática em camundongos selvagens e nocautes para CD4 com a proteína E6E7 foi capaz de gerar 100% de proteção antitumoral. A combinação de epítomos imunogênicos das proteínas E6 e E7 e a separação destes por espaçadores na proteína recombinante podem ter direcionado a uma resposta adaptativa específica contra as células tumorais pela apresentação dos epítomos a linfócitos T citotóxicos por moléculas MHC I.

Em geral, as proteínas exógenas são endocitadas pelas células apresentadoras de antígenos, processadas via MHC classe II e apresentadas a linfócitos T auxiliares. Entretanto, a apresentação de peptídeos exógenos, como o antígeno E6E7, no contexto de MHC classe I pode ocorrer por apresentação cruzada por duas vias distintas (Watts, 1997). O antígeno E6E7 pode ser internalizado, sair do compartimento endocítico e, uma vez no citosol, processado pelo proteassomo em peptídeos e estes apresentados a linfócitos T CD8⁺ por MHC I. Alternativamente, o antígeno pode ter sido internalizado e processado no compartimento endocítico, gerando peptídeos que se associam a moléculas MHC I pré-existentes.

A apresentação por via MHC I dos epítomos de E6 e E7 a linfócitos T citotóxicos foi deduzida não só pela capacidade do antígeno E6E7 de induzir uma resposta protetora, mas também de induzir a produção de IFN- γ principalmente por linfócitos T CD8⁺ específicos a E6 e/ou a E7, como evidenciado nos experimento de Elispot com camundongos nocautes para CD4. Além disso, no experimento de Elispot, foi observada uma acentuada produção de IFN- γ nas células estimuladas apenas com peptídeo MHC I restrito de E7, demonstrando a imunodominância do epítopo de E7 sobre o de E6, na imunização dos animais com o antígeno E6E7.

Células T CD4⁺ são essenciais na manutenção das funções efetoras pela secreção de citocinas, como IL-2 e IFN- γ e foi demonstrado em estudos clínicos desempenhar um importante papel no efeito antitumoral contra verrugas genitais e câncer cervical (Heard et al., 1998; Hohn et al., 1999). No entanto, outros trabalhos demonstraram que a proteção contra células imortalizadas expressando E6 e E7 é mais dependente de uma resposta efetora de células T CD8⁺ que de células T CD4⁺ (Feltkamp et al., 1993). Chen et al. (2000) observaram que a administração de uma vacina de DNA que codifica E7 fusionada à proteína de choque térmico (HSP), mesmo na ausência de células T CD4⁺, resulta em uma resposta efetora de células T CD8⁺ específica para E7. De forma similar, neste estudo, a resposta imune

observada independente de células T CD4⁺, e foi capaz de proteger contra as células TC-1. Portanto, a proteção antitumoral de 100%, conferida pela vacinação com E6E7, na ausência de uma resposta de linfócitos T CD4⁺ corrobora os trabalhos anteriores. Além disso, no mesmo protocolo de imunização em animais nocautes para CD8⁺ não foram capazes de induzir uma resposta protetora, reforçando a necessidade de linfócitos T CD8⁺ nesta resposta.

A fusão da Ubiquitina no C terminal do antígeno E6E7 (E6E7UB), como observado nos experimentos de FACS e Elispot, promoveu a ativação de linfócitos T CD8⁺ específicos de E6 e/ou E7. Entretanto essa resposta não foi suficiente para conferir total proteção contra células do tumor, apresentando uma resposta profilática 40% menor que sem a fusão.

Uma questão a ser levantada neste trabalho é se a Ubiquitina, uma proteína endógena produzida constitutivamente pela célula eucarióticas, é capaz de induzir a tolerância aos antígenos a ela fusionados ou mesmo de desencadear uma doença auto-imune. Pelos resultados apresentados de proteção com E6E7Ub é possível que a Ubiquitina fusionada ao antígeno realmente tenha promovido a tolerância de células T, reduzindo a eficácia da vacina contra o tumor. Entretanto, essa redução na proteção foi revertida fusionando-se a Ubiquitina na extremidade N terminal de E6E7. Essa nova construção, UbE6E7, no ensaio de proteção profilática, foi capaz de proteger 80% dos animais.

Realmente, em vacina de DNA, a fusão da Ubiquitina na extremidade N-terminal de antígeno autólogo foi capaz de quebrar a tolerância de células T a este antígeno e proporcionou imunidade protetora contra melanoma (Xiang et al., 2000; Zhang et al., 2004; Zhang et al., 2005). Estudos de vacinas de DNA expressando antígenos fusionados à Ubiquitina evidenciaram a maior eficácia terapêutica de vacina de DNA de antígenos de HPV e de antígenos de outros modelos de doenças quando ligados a Ubiquitina (Delogu et al., 2000; Papagatsias et al., 2009; Rodriguez et al., 1998; Velders et al., 2001). De fato, o potencial adjuvante da Ubiquitina em fusão (na extremidade N terminal de E6E7) ficou evidente nos ensaios de imunização terapêutica.

Entretanto, havia a possibilidade destes resultados de imunização terem sofrido influência da presença de LPS na suspensão proteica. Há relatos na literatura que sugerem que os receptores do tipo Toll (TLR), quando ativados pelo seu respectivo ligante, além de aumentar a apresentação cruzada, induzem a maturação de células dendríticas, promovem a expressão de moléculas coestimuladoras e aumentam a captação e apresentação de antígenos (Burgdorf et al., 2008; Chen et al., 2005; Datta et al., 2003; Maurer et al., 2002; Schulz et al., 2005).

Dessa forma, foi realizado um ensaio de imunização profilática e terapêutica com animais TLR4 deficientes para verificar se o LPS, um ligante do TLR4 (Medzhitov, 2001), estava potencializando a apresentação cruzada de E6E7 ou de UbE6E7 e favorecendo a resposta citotóxica contra o tumor. Os resultados apresentados nestes ensaios não diferiram daqueles apresentados com animais selvagens. A imunização profilática e terapêutica com E6E7 foi capaz de proteger do crescimento tumoral 100% dos animais não responsivos a LPS e o tratamento com UbE6E7 após 3 dias do desafio foi eficaz contra o tumor em 80% dos animais. Sendo assim, os candidatos vacinais deste trabalho apresentam alta eficácia em estudos pré-clínicos sem a necessidade adicional de um adjuvante que ativasse a via de TLR4.

No experimento com animais selvagens, em que a imunização foi iniciada após três dias do desafio, não foi observada diferença significativa de proteção contra o tumor entre E6E7, E6E7Ub e UbE6E7, apresentando estes imunógenos 80 a 100% de eficácia terapêutica. Porém, quando realizada a imunização após sete dias do desafio, a fusão da Ubiquitina na extremidade N-terminal promoveu proteção terapêutica de 60%, enquanto E6E7Ub a proteção foi de 40% e a imunização com o antígeno sem a fusão com Ubiquitina a proteção foi nula. Estes dados mostram que no caso de um modelo terapêutico, muito mais drástico que o modelo profilático e mais próximo de uma condição clínica real, a fusão de E6E7 com Ubiquitina, principalmente na porção N-terminal, parece ser mais efetiva. Neste experimento uma terceira dose foi aplicada mais tardiamente, sem resultar numa melhora na resposta protetora. É provável que o tratamento com essas vacinas seja mais eficaz usando outros protocolos, como uma imunização com três a quatro doses em intervalos de sete dias. Uma melhor caracterização dos protocolos deverá ser necessária para que se possa analisar a eficácia desses candidatos nos tratamentos iniciados mais tardiamente, as doses necessárias para obter a melhor resposta terapêutica e a eficácia em combinação com adjuvantes.

Uma vez que E6E7 não apresentou eficácia no tratamento de tumores mais desenvolvidos, e a fusão da Ubiquitina a este antígeno foi capaz de reverter essa resposta ao tratamento, é possível que a estratégia de fusão à Ubiquitina, de fato, aumente a cinética de degradação do antígeno pelo proteassomo e assim favoreça a apresentação dos epítomos aos linfócitos T citotóxicos. Essa rápida degradação pode então não ser necessária na vacinação preventiva, já que há tempo suficiente para o organismo desenvolver uma memória imunológica capaz de proteger o organismo contra posterior desafio. Em compensação, a rápida degradação do antígeno pelo proteassomo pode ser crucial no tratamento contra o tumor em estágio mais avançado.

Considerando que, neste modelo de estudo, as células do tumor (TC-1) crescem rapidamente, é de se supor que a velocidade em que se gera uma resposta mais acentuada de linfócitos TCD8+, como, por exemplo, através da rápida degradação do antígeno pela fusão à Ubiquitina, seja relevante tanto para aumentar a subpopulação de células Th1 quanto para inibir a proliferação de células T regulatórias, o que culminaria na eliminação das células transformadas.

Para verificar se a Ubiquitina em fusão, é capaz de promover a poliubiquitinação e, conseqüentemente, a degradação do antígeno pelo proteassomo 26S, foi realizado um ensaio de poliubiquitinação, que apesar de preliminar, pode ser indicativo, pelo menos nos ensaios *in vitro*, da funcionalidade da Ubiquitina fusionada a E6E7. Neste ensaio foi possível verificar que a fusão da Ubiquitina no N terminal do antígeno, de fato promove uma acentuada poliubiquitinação, o que reforça a hipótese deste trabalho de que a construção UbE6E7 é capaz de direcionar o antígeno para a degradação via proteassomo 26S, e assim promover a apresentação dos epítomos a linfócitos T citotóxicos via moléculas MHC classe I.

Vários estudos demonstraram que o proteassomo, principalmente o 20S, degrada proteínas oxidadas e desnoveladas de modo independente da Ubiquitina e que uma proporção elevada (acima de 20%) de proteínas celulares são especificamente degradadas pelo PT20S (Baugh et al., 2009). O proteassomo 20S livre é capaz de gerar peptídeos curtos que se ligam a molécula MHC classe I e em alguns casos, são liberados produtos com tamanho e sequência ideal para a ligação da β 2-microglobulina (Dick et al., 1998; Emmerich et al., 2000). Dessa forma é possível que os antígenos E6E7, E6E7Ub e UbE6E7 sejam degradados pelo PT20S e os peptídeos gerados apresentados no contexto MHC I a CTL.

Partindo do pressuposto acima, foi realizado um experimento para analisar, *in vitro*, se os antígenos objetos deste estudo são degradados pelo PT20S. Foi observada a degradação de todos os antígenos. Entretanto foi observada uma degradação em maior nível de E6E7Ub e, em seguida, do UbE6E7. Pode-se deduzir a partir desses resultados, que *in vivo*, baseado no experimento *in vitro*, esses antígenos sofram degradação também pelo 20S, que não requer poliubiquitinação e ATP. Entretanto, esses resultados não são indicativos de que a degradação pelo PT20S favoreça a apresentação de epítomos mais imunogênicos a CLT e promova uma resposta imune mais efetora.

Considerando os resultados de imunização profilática com E6E7Ub, a maior degradação deste antígeno pelo proteassomo 20S não está relacionada com uma resposta imune mais efetiva contra o tumor. Em compensação, a vacinação com o antígeno UbE6E7, que *in vitro* foi acentuadamente poliubiquitinado, promoveu a melhor resposta terapêutica

antitumoral. Provavelmente, a degradação pelo proteassomo 26S do antígeno seja essencial para a geração de epítomos imunogênicos capazes de montar um repertório imune de células T adequado para proteger do tumor.

Outro fator que deve ter proporcionado à construção UbE6E7 essa capacidade de desencadear uma resposta efetiva contra o tumor foi a substituição na Ubiquitina do resíduo 76 Glicina para Alanina. Vários estudos mostraram que proteínas ligadas na Ubiquitina cujo resíduo C terminal Glicina é substituído por Alanina (G76A) são degradadas de forma mais rápida que as proteínas sem essa fusão, aumentando assim a apresentação dos epítomos gerados via MHC classe I (Andersson, Barry, 2004; Rodriguez et al., 1998; Tellam et al., 2001; Velders et al., 2001; Zhang et al., 2005). Como neste trabalho não foi construído um antígeno controle sem essa mutação na Ubiquitina, não foi possível comprovar de fato se a substituição de Glicina por Alanina foi preponderante para imunogenicidade da vacina UbE6E7.

A apresentação dos epítomos por moléculas MHC classe I na superfície da célula depende em grande parte, tanto da taxa de degradação da proteína, quanto da frequência com que esses epítomos são gerados pelo proteassomo (Berko et al., 2012; Rock et al., 2004). Em um estudo do efeito do aumento da taxa de degradação do antígeno proteico pela via ubiquitina-proteassomo, a conjugação da Ubiquitina na extremidade N-terminal da beta-galactosidase resultou no processamento mais rápido deste antígeno para apresentação por moléculas MHC I e ficou evidente que a conjugação da Ubiquitina ao antígeno é um fator limitante na velocidade da apresentação dos epítomos (Grant et al., 1995).

Entretanto, em um estudo de Goth et al. (1996), em modelo semelhante de vacina de DNA, a rápida degradação da ovoalbumina (OVA) por meio da sua fusão a Ubiquitina não resultou no melhor reconhecimento das células que expressam esta construção por linfócitos T. Isto sugere que a rápida degradação do antígeno, não necessariamente resulta na melhor apresentação de todos os epítomos a linfócitos T citotóxicos.

Devido a esta variação no reconhecimento que ocorre em nível clonal, é importante avaliar os efeitos da rápida degradação do antígeno sobre a indução de respostas de CTL. Além disso, do ponto de vista do desenvolvimento de vacinas, a questão crítica é se a construção que favorece a degradação é capaz de aumentar a imunogenicidade *in vivo* (Tobery, Siliciano, 1997).

Os resultados dos ensaios de imunização terapêutica evidenciam que essa nova construção proteica de E6E7 com a Ubiquitina em fusão no N terminal (UbE6E7), promove uma melhor imunogenicidade *in vivo*, capaz de inibir o crescimento do tumor em 60-100% dos animais, quando iniciado o tratamento após três a sete dias do desafio com células TC-1.

Várias estratégias de vacinas terapêuticas baseadas nas oncoproteínas E6 e E7 já foram desenvolvidas e testadas em modelo animal, entretanto poucas chegaram à fase de teste clínico. Algumas dessas estratégias consistem de vacina de DNA expressando os antígenos E6 e E7 fusionados a uma proteína capaz de aumentar a resposta citotóxica contra o tumor, os exemplos incluem proteína do choque térmico (HSPs) (Chen et al., 2000; Huang et al., 2007), calreticulina (Kim et al., 2008), fragmento C da toxina tetânica (Oosterhuis et al., 2012), glicoproteína gD do vírus da herpes (Diniz, Ferreira, 2011) e a proteína Ubiquitina.

No trabalho de Velders et al. (2001), o tratamento com três doses da vacina de DNA contendo epítomos de E6 e E7 em fusão com Ubiquitina promoveu a regressão do tumor em 100% dos animais, mesmo quando a primeira dose da vacina foi aplicada após sete dias do desafio (células C3 como modelo de tumor). Em 2002, Leachman et al., usou essa mesma estratégia de fusão de antígeno à Ubiquitina na vacina de DNA, entretanto para o tratamento de Papilomavírus de coelho (CRPV) e utilizando antígenos E1, E2, E6 e E7 de CRPV, demonstrando a eficácia desta vacina de DNA de múltiplos epítomos em fusão com Ubiquitina para a proteção e tratamento de CRPV.

No presente trabalho, a estratégia de fusão da Ubiquitina na extremidade N terminal do antígeno E6E7 se mostrou altamente eficaz no tratamento de tumor induzido em animais. Essa estratégia, porém, foi aplicada no desenvolvimento de vacina proteica, e não de DNA como nos estudos citados, o que traz a vantagem, não apenas de segurança para aplicação clínica, mas também do baixo custo de produção, já que a expressão de proteínas em *E. coli* já é bem caracterizada, podendo a vacina ser escalonada facilmente para produção industrial.

Além disso, a estratégia de vacina proteica com Ubiquitina fusionada ao antígeno é promissora não só no sentido de poder ser aplicada no desenvolvimento de vacinas terapêuticas de outros tipos de câncer, mas também de doenças parasitárias, virais e bacterianas que necessitem de uma resposta imune dependente de células CD8+.

Espera-se que este trabalho contribua no desenvolvimento de uma nova estratégia capaz de aumentar a imunogenicidade de vacinas proteicas, e que futuramente possa ter importante aplicabilidade na imunoterapia de tumores.

7 CONCLUSÕES

Neste trabalho nós avaliamos a imunogenicidade de três candidatos vacinais proteicos, E6E7, E6E7Ub e UbE6E7. Os resultados obtidos nos permite fazer as seguintes conclusões:

- três doses da vacina E6E7, constituída de epítomos imunogênicos de E6 e E7 do HPV16, conferiram total proteção contra a formação de tumores detectáveis de células TC-1 em modelo de desafio profilático;
- a resposta protetora gerada pelas vacinas E6E7 e E6E7Ub mostrou-se dependente de linfócitos T CD8 e independente de linfócitos T CD4 ou da via de TLR4, provavelmente pela ativação de células T CD8+ específicas para E6 e principalmente para E7;
- entretanto, em uma condição mais próxima de uma situação clínica, a fusão da Ubiquitina na extremidade N-terminal de E6E7 (UbE6E7) promoveu a melhor resposta protetora contra os tumores de células TC-1 em animais vacinados após 7 dias do desafio. UbE6E7 foi capaz de impedir o crescimento do tumor em 60% dos animais, enquanto a eficácia de proteção de E6E7Ub foi de 40% e de E6E7 foi nula. Esta melhor resposta parece estar associada com um maior grau de poliubiquitinação de UbE6E7;
- esta estratégia de fusão da Ubiquitina na extremidade N-terminal do antígeno em vacinas de proteínas se mostrou promissora no sentido de poder ser aplicada no desenvolvimento de vacinas terapêuticas contra câncer cervical e outros tipos de tumores ou doenças que dependam de uma resposta de linfócitos T CD8⁺.

REFERÊNCIAS*

- Abbas A, Lichtman AH. *Imunologia celular e molecular*. 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2006. 577 p.
- Andersson HA, Barry MA. Maximizing antigen targeting to the proteasome for gene-based vaccines. *Mol Ther*. 2004 Sep;10(3):432-46.
- Arendt CS, Hochstrasser M. Identification of the yeast 20S proteasome catalytic centers and subunit interactions required for active-site formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Jul 8;94(14):7156-61.
- Asher G, Lotem J, Sachs L, et al. Mdm-2 and ubiquitin-independent p53 proteasomal degradation regulated by NQO1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Oct 1;99(20):13125-30.
- Asher G, Tsvetkov P, Kahana C, et al. A mechanism of ubiquitin-independent proteasomal degradation of the tumor suppressors p53 and p73. *Genes Dev*. 2005 Feb 1;19(3):316-21.
- Ault KA. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections in the female genital tract. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2006;2006 Suppl:40470.
- Azar KK, Tani M, Yasuda H, et al. Increased secretion patterns of interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha in cervical squamous intraepithelial lesions. *Hum Pathol*. 2004 Nov;35(11):1376-84.
- Baldwin PJ, van der Burg SH, Boswell CM, et al. Vaccinia-expressed human papillomavirus 16 and 18 E6 and E7 as a therapeutic vaccination for vulval and vaginal Intraepithelial neoplasia. *Clin Cancer Res*. 2003 Nov 1;9(14):5205-13.
- Barnard P, McMillan NA. The human papillomavirus E7 oncoprotein abrogates signaling mediated by interferon-alpha. *Virology*. 1999 Jul 5;259(2):305-13.
- Baugh JM, Viktorova EG, Pilipenko EV. Proteasomes can degrade a significant proportion of cellular proteins independent of ubiquitination. *J Mol Biol*. 2009 Feb 27;386(3):814-27.
- Benaroudj N, Tarcsa E, Cascio P, et al. The unfolding of substrates and ubiquitin-independent protein degradation by proteasomes. *Biochimie*. 2001 Mar-Apr;83(3-4):311-8.
- Berko D, Tabachnick-Cherny S, Shental-Bechor D, et al. The Direction of Protein Entry into the Proteasome Determines the Variety of Products and Depends on the Force Needed to Unfold Its Two Termini. *Mol Cell*. 2012 Oct 3.
- Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*. 2002 Apr;55(4):244-65.
- Breitschopf K, Bengal E, Ziv T, et al. A novel site for ubiquitination: the N-terminal residue, and not internal lysines of MyoD, is essential for conjugation and degradation of the protein. *EMBO J*. 1998 Oct 15;17(20):5964-73.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

- Buck CB, Cheng N, Thompson CD, et al. Arrangement of L2 within the papillomavirus capsid. *J Virol*. 2008 Jun;82(11):5190-7.
- Burgdorf S, Scholz C, Kautz A, et al. Spatial and mechanistic separation of cross-presentation and endogenous antigen presentation. *Nat Immunol*. 2008 May;9(5):558-66.
- Burger MP, Hollema H, Gouw AS, et al. Cigarette smoking and human papillomavirus in patients with reported cervical cytological abnormality. *BMJ*. 1993 Mar 20;306(6880):749-52.
- Carter JJ, Koutsky LA, Hughes JP, et al. Comparison of human papillomavirus types 16, 18, and 6 capsid antibody responses following incident infection. *J Infect Dis*. 2000 Jun;181(6):1911-9.
- Castellsague X, Munoz N, Pitisuttithum P, et al. End-of-study safety, immunogenicity, and efficacy of quadrivalent HPV (types 6, 11, 16, 18) recombinant vaccine in adult women 24-45 years of age. *Br J Cancer*. 2011 Jun 28;105(1):28-37.
- Chen CH, Wang TL, Hung CF, et al. Enhancement of DNA vaccine potency by linkage of antigen gene to an HSP70 gene. *Cancer Res*. 2000 Feb 15;60(4):1035-42.
- Chen M, Barnfield C, Naslund TI, et al. MyD88 expression is required for efficient cross-presentation of viral antigens from infected cells. *J Virol*. 2005 Mar;79(5):2964-72.
- Chen P, Hochstrasser M. Autocatalytic subunit processing couples active site formation in the 20S proteasome to completion of assembly. *Cell*. 1996 Sep 20;86(6):961-72.
- Christensen ND, Hopfl R, DiAngelo SL, et al. Assembled baculovirus-expressed human papillomavirus type 11 L1 capsid protein virus-like particles are recognized by neutralizing monoclonal antibodies and induce high titres of neutralizing antibodies. *J Gen Virol*. 1994 Sep;75 (Pt 9):2271-6.
- Chu-Ping M, Vu JH, Proske RJ, et al. Identification, purification, and characterization of a high molecular weight, ATP-dependent activator (PA700) of the 20 S proteasome. *J Biol Chem*. 1994 Feb 4;269(5):3539-47.
- Ciechanover A, Ben-Saadon R. N-terminal ubiquitination: more protein substrates join in. *Trends Cell Biol*. 2004 Mar;14(3):103-6.
- Coux O, Tanaka K, Goldberg AL. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem*. 1996;65:801-47.
- Cox JT. The development of cervical cancer and its precursors: what is the role of human papillomavirus infection? *Curr Opin Obstet Gyn*. 2006 Feb;18:S5-S13.
- Craiu A, Akopian T, Goldberg A, et al. Two distinct proteolytic processes in the generation of a major histocompatibility complex class I-presented peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Sep 30;94(20):10850-5.
- Cromme FV, Snijders PJF, Vandenbrule AJC, et al. Mhc Class-I Expression in Hpv-16 Positive Cervical Carcinomas Is Posttranscriptionally Controlled and Independent from C-Myc Overexpression. *Oncogene*. 1993 Nov;8(11):2969-75.

- D'Souza G, Dempsey A. The role of HPV in head and neck cancer and review of the HPV vaccine. *Prev Med*. 2011 Oct 1;53:S5-S11.
- da Silva CEXDR, da Silva IDC, Cerri A, et al. Prevalence of human papillomavirus in squamous cell carcinoma of the tongue. *Oral Surg Oral Med O*. 2007 Oct;104(4):497-500.
- Dannull J, Su Z, Rizzieri D, et al. Enhancement of vaccine-mediated antitumor immunity in cancer patients after depletion of regulatory T cells. *J Clin Invest*. 2005 Dec;115(12):3623-33.
- Datta SK, Redecke V, Prilliman KR, et al. A subset of Toll-like receptor ligands induces cross-presentation by bone marrow-derived dendritic cells. *J Immunol*. 2003 Apr 15;170(8):4102-10.
- Duggan-keen M, Brown MD, Stacey SN, et al. Papillomavirus vaccines. *Frontiers in Bioscience*. 1998;3:1192-208. Disponível em: <<http://www.bioscience.org/1998/v3/d/duggan/d1208.htm>>. [2012 Jul 12].
- de Jong A, van Poelgeest MIE, van der Hulst JM, et al. Human papillomavirus type 16-positive cervical cancer is associated with impaired CD4+T-cell immunity against early antigens E2 and E6. *Cancer Res*. 2004 Aug 1;64(15):5449-55.
- de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, et al. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004 Jun 20;324(1):17-27.
- Delogu G, Howard A, Collins FM, et al. DNA vaccination against tuberculosis: expression of a ubiquitin-conjugated tuberculosis protein enhances antimycobacterial immunity. *Infect Immun*. 2000 Jun;68(6):3097-102.
- Demasi M, Laurindo FR. Physiological and pathological role of the ubiquitin-proteasome system in the vascular smooth muscle cell. *Cardiovasc Res*. 2012 Jul 15;95(2):183-93.
- Deveraux Q, Ustrell V, Pickart C, et al. A 26 S protease subunit that binds ubiquitin conjugates. *J Biol Chem*. 1994 Mar 11;269(10):7059-61.
- Dick TP, Stevanovic S, Keilholz W, et al. The making of the dominant MHC class I ligand SYFPEITHI. *Eur J Immunol*. 1998 Aug;28(8):2478-86.
- Diederichsen ACP, Hjelmberg JV, Christensen PB, et al. Prognostic value of the CD4(+)/CD8(+) ratio of tumour infiltrating lymphocytes in colorectal cancer and HLA-DR expression on tumour cells. *Cancer Immunol Immun*. 2003 Jul;52(7):423-8.
- Diniz MO, Ferreira LC. Enhanced anti-tumor effect of a gene gun-delivered DNA vaccine encoding the human papillomavirus type 16 oncoproteins genetically fused to the herpes simplex virus glycoprotein D. *Braz J Med Biol Res*. 2011 May;44(5):421-7.
- Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol*. 2005 Mar;32 Suppl 1:S7-15.
- Driscoll J, Goldberg AL. The proteasome (multicatalytic protease) is a component of the 1500-kDa proteolytic complex which degrades ubiquitin-conjugated proteins. *J Biol Chem*. 1990 Mar 25;265(9):4789-92.

Duensing S, Munger K. Mechanisms of genomic instability in human cancer: Insights from studies with human papillomavirus oncoproteins. *International Journal of Cancer*. 2004 Mar 20;109(2):157-62.

Einstein MH, Leanza S, Chiu LG, et al. Genetic Variants in TAP Are Associated with High-Grade Cervical Neoplasia. *Clinical Cancer Research*. 2009 Feb 1;15(3):1019-23.

Einstein MH, Schiller JT, Viscidi RP, et al. Clinician's guide to human papillomavirus immunology: knowns and unknowns. *Lancet Infect Dis*. 2009 Jun;9(6):347-56.

Emmerich NP, Nussbaum AK, Stevanovic S, et al. The human 26 S and 20 S proteasomes generate overlapping but different sets of peptide fragments from a model protein substrate. *J Biol Chem*. 2000 Jul 14;275(28):21140-8.

Evans EML, Man S, Evans AS, et al. Infiltration of cervical cancer tissue with human papillomavirus-specific cytotoxic T-lymphocytes. *Cancer Res*. 1997 Jul 15;57(14):2943-50.

Feltkamp MC, Smits HL, Vierboom MP, et al. Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope-containing peptide protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16-transformed cells. *Eur J Immunol*. 1993 Sep;23(9):2242-9.

Fernandes APM, Golçalves MAG, Simões RT, et al. Influência da infecção pelo HIV-1 sobre a presença do hpv em lesões do colo uterino. *DST – J bras Doenças Sex Transm*. 2004;16(1):21-25.

Fox PA. Human papillomavirus and anal intraepithelial neoplasia. *Curr Opin Infect Dis*. 2006 Feb;19(1):62-6.

Frazer IH. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nat Rev Immunol*. 2004 Jan;4(1):46-54.

Garland SM. Human papillomavirus update with a particular focus on cervical disease. *Pathology*. 2002 May;34(3):213-24.

Giarre M, Caldeira S, Malanchi I, et al. Induction of pRb degradation by the human papillomavirus type 16 E7 protein is essential to efficiently overcome p16(INK4a)-imposed G(1) cell cycle arrest. *Journal of Virology*. 2001 May;75(10):4705-12.

Gillison ML, Shah KV. Human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma: mounting evidence for an etiologic role for human papillomavirus in a subset of head and neck cancers. *Curr Opin Oncol*. 2001 May;13(3):183-8.

Glickman MH, Rubin DM, Fried VA, et al. The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome. *Mol Cell Biol*. 1998 Jun;18(6):3149-62.

Goth S, Nguyen V, Shastri N. Generation of naturally processed peptide/MHC class I complexes is independent of the stability of endogenously synthesized precursors. *J Immunol*. 1996 Sep 1;157(5):1894-904.

Govan VA. Strategies for human papillomavirus therapeutic vaccines and other therapies based on the E6 and E7 oncogenes. *Ann Ny Acad Sci*. 2005;1056:328-43.

Grant EP, Michalek MT, Goldberg AL, et al. Rate of antigen degradation by the ubiquitin-proteasome pathway influences MHC class I presentation. *J Immunol.* 1995 Oct 15;155(8):3750-8.

Grassegger A, Rollinger-Holzinger I, Zelger BW, et al. Spontaneous or interferon-gamma-induced T-cell infiltration, HLA-DR and ICAM-1 expression in genitoanal warts are associated with TH1 or mixed TH1/TH2 cytokine mRNA expression profiles. *Arch Dermatol Res.* 1997 Apr;289(5):243-50.

Hagensee ME, Cameron JE, Leigh JE, et al. Human papillomavirus infection and disease in HIV-infected individuals. *Am J Med Sci.* 2004 Jul;328(1):57-63.

Hagensee ME, Yaegashi N, Galloway DA. Self-assembly of human papillomavirus type 1 capsids by expression of the L1 protein alone or by coexpression of the L1 and L2 capsid proteins. *J Virol.* 1993 Jan;67(1):315-22.

Harari A, Dutoit V, Cellerai C, et al. Functional signatures of protective antiviral T-cell immunity in human virus infections. *Immunol Rev.* 2006 Jun;211:236-54.

Hausen HZ. Viruses in Human Cancers. *Science.* 1991 Nov 22;254(5035):1167-73.

Heard I, Schmitz V, Costagliola D, et al. Early regression of cervical lesions in HIV-seropositive women receiving highly active antiretroviral therapy. *AIDS.* 1998 Aug 20;12(12):1459-64.

Heinemeyer W, Fischer M, Krimmer T, et al. The active sites of the eukaryotic 20 S proteasome and their involvement in subunit precursor processing. *J Biol Chem.* 1997 Oct 3;272(40):25200-9.

Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:425-79.

Hildesheim A, Hadjimichael O, Schwartz PE, et al. Risk factors for rapid-onset cervical cancer. *Am J Obstet Gynecol.* 1999 Mar;180(3):571-7.

Ho ASY, Liu Y, Khan TA, et al. A Receptor for Interleukin-10 Is Related to Interferon Receptors. *P Natl Acad Sci USA.* 1993 Dec 1;90(23):11267-71.

Hochstrasser M. Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu Rev Genet.* 1996;30:405-39.

Hochstrasser M. Ubiquitin, Proteasomes, and the Regulation of Intracellular Protein-Degradation. *Curr Opin Cell Biol.* 1995 Apr;7(2):215-23.

Hohn H, Pilch H, Gunzel S, et al. CD4+ tumor-infiltrating lymphocytes in cervical cancer recognize HLA-DR-restricted peptides provided by human papillomavirus-E7. *J Immunol.* 1999 Nov 15;163(10):5715-22.

Huang CY, Chen CA, Lee CN, et al. DNA vaccine encoding heat shock protein 60 co-linked to HPV 16 E6 and E7 tumor antigens generates more potent immunotherapeutic effects than respective E6 or E7 tumor antigens. *Gynecol Oncol.* 2007 Dec;107(3):404-12.

Instituto Nacional do Câncer (INCA). Ministério da Saúde. Coordenação de prevenção e Vigilância. Estimativa 2012. Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2011. 118 p. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/>>. [2012 Ago 3].

Instituto Nacional do Câncer (INCA). Ministério da Saúde. Coordenação. Coordenação de prevenção e Vigilância. Estimativa 2010. Incidência de câncer no Brasil. 2010. Rio de Janeiro: INCA; 2009. 98 p. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/>>. [2012 Sep 15].

Instituto Nacional do Câncer (INCA). Neoplasia Intra-Epitelial Cervical – NIC. Revista Brasileira de Cancerologia, São Paulo, 2000; 46(4):355-357. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/rbc/n_46/v04/pdf/normas_2.pdf>. [2012 Sep 18].

Jochmus I, Schafer K, Faath S, et al. Chimeric virus-like particles of the human papillomavirus type 16 (HPV 16) as a prophylactic and therapeutic vaccine. Arch Med Res. 1999 Jul-Aug;30(4):269-74.

Jordanova ES, Gorter A, Ayachi O, et al. Human leukocyte antigen class I, MHC class I chain-related molecule A, and CD8+/regulatory T-cell ratio: which variable determines survival of cervical cancer patients? Clin Cancer Res. 2008 Apr 1;14(7):2028-35.

Kenter GG, Welters MJ, Valentijn AR, et al. Phase I immunotherapeutic trial with long peptides spanning the E6 and E7 sequences of high-risk human papillomavirus 16 in end-stage cervical cancer patients shows low toxicity and robust immunogenicity. Clin Cancer Res. 2008 Jan 1;14(1):169-77.

Kim D, Gambhira R, Karanam B, et al. Generation and characterization of a preventive and therapeutic HPV DNA vaccine. Vaccine. 2008 Jan 17;26(3):351-60.

Kisselev AF, Akopian TN, Woo KM, et al. The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation. J Biol Chem. 1999 Feb 5;274(6):3363-71.

Klingelhutz AJ, Foster SA, McDougall JK. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. Nature. 1996 Mar 7;380(6569):79-82.

Kloetzel PM. Antigen processing by the proteasome. Nat Rev Mol Cell Biol. 2001 Mar;2(3):179-87.

Kobayashi N, Hiraoka N, Yamagami W, et al. FOXP3+ regulatory T cells affect the development and progression of hepatocarcinogenesis. Clin Cancer Res. 2007 Feb 1;13(3):902-11.

Kondratiev S, Sabo E, Yakirevich E, et al. Intratumoral CD8+ T lymphocytes as a prognostic factor of survival in endometrial carcinoma. Clin Cancer Res. 2004 Jul 1;10(13):4450-6.

Kwak K, Yemelyanova A, Roden RB. Prevention of cancer by prophylactic human papillomavirus vaccines. Curr Opin Immunol. 2011 Apr;23(2):244-51.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970 Aug 15;227(5259):680-5.

- Lamikanra A, Pan ZK, Isaacs SN, et al. Regression of established human papillomavirus type 16 (HPV-16) immortalized tumors in vivo by vaccinia viruses expressing different forms of HPV-16 E7 correlates with enhanced CD8(+) T-cell responses that home to the tumor site. *J Virol*. 2001 Oct;75(20):9654-64.
- Larsen CN, Finley D. Protein translocation channels in the proteasome and other proteases. *Cell*. 1997 Nov 14;91(4):431-4.
- Lasaro MO, Diniz MO, Reyes-Sandoval A, et al. Anti-tumor DNA vaccines based on the expression of human papillomavirus-16 E6/E7 oncoproteins genetically fused with the glycoprotein D from herpes simplex virus-1. *Microbes Infect*. 2005 Dec;7(15):1541-50.
- Leachman SA, Shylankevich M, Slade MD, et al. Ubiquitin-fused and/or multiple early genes from cottontail rabbit papillomavirus as DNA vaccines. *J Virol*. 2002 Aug;76(15):7616-24.
- Leto MDP, dos Santos GF, Porro AM, et al. Human papillomavirus infection: etiopathogenesis, molecular biology and clinical manifestations. *An Bras Dermatol*. 2011 Mar-Apr;86(2):306-17.
- Lin KY, Guarnieri FG, Staveley-O'Carroll KF, et al. Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. *Cancer Res*. 1996 Jan 1;56(1):21-6.
- Linhares AC, Villa LL. Vacinas contra rotavírus e papilomavírus humano (HPV). *J Pediatr*. 2006;82(3).
- Lowe AJ, Bardliving CL, Huang CJ, et al. Expression and purification of cGMP grade NY-ESO-1 for clinical trials. *Biotechnol Prog*. 2011 Mar-Apr;27(2):435-41.
- Lowy DR, Kirnbauer R, Schiller JT. Genital human papillomavirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Mar 29;91(7):2436-40.
- Mahdavi A, Monk BJ. Vaccines against human papillomavirus and cervical cancer: Promises and challenges. *Oncologist*. 2005 Aug;10(7):528-38.
- Maurer T, Heit A, Hochrein H, et al. CpG-DNA aided cross-presentation of soluble antigens by dendritic cells. *Eur J Immunol*. 2002 Aug;32(8):2356-64.
- Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2001 Nov;1(2):135-45.
- Middleton K, Peh W, Southern S, et al. Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. *J Virol*. 2003 Oct;77(19):10186-201.
- Monie A, Hung CF, Roden R, et al. Cervarix: a vaccine for the prevention of HPV 16, 18-associated cervical cancer. *Biologics*. 2008 Mar;2(1):97-105.
- Morale MG. Desenvolvimento de vacina terapêutica contra HPV16 [dissertação (Mestrado em Bioquímica)]. São Paulo: Instituto de Química, Universidade de São Paulo; 2009.

- Mota F, Rayment N, Chong S, et al. The antigen-presenting environment in normal and human papillomavirus (HPV)-related premalignant cervical epithelium. *Clin Exp Immunol*. 1999 Apr;116(1):33-40.
- Munger K, Baldwin A, Edwards KM, et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol*. 2004 Nov;78(21):11451-60.
- Munger K, Howley PM. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res*. 2002 Nov;89(2):213-28.
- Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 2003 Feb 6;348(6):518-27.
- Oosterhuis K, Aleyd E, Vrijland K, et al. Rational design of DNA vaccines for the induction of HPV16 E6 and E7 specific cytotoxic T cell responses. *Hum Gene Ther*. 2012 Sep 12.
- Orlowski M. The multicatalytic proteinase complex, a major extralysosomal proteolytic system. *Biochemistry*. 1990 Nov 13;29(45):10289-97.
- Padilla-Paz LA. Human papillomavirus vaccine: history, immunology, current status, and future prospects. *Clin Obstet Gynecol*. 2005 Mar;48(1):226-40.
- Papagatsias T, Athanasopoulos T, Meiser A, et al. Using ubiquitin fusion to augment CD8+T cell immune responses against HIV-1 antigens. *Retrovirology*. 2009;6.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002. *Ca-Cancer J Clin*. 2005 Mar-Apr;55(2):74-108.
- Peres J. For Cancers Caused by HPV, Two Vaccines Were Just the Beginning. *J Natl Cancer I*. 2011 Mar;103(5):360-U1400.
- Perrett CA, Lin DY, Zhou D. Interactions of bacterial proteins with host eukaryotic ubiquitin pathways. *Front Microbiol*. 2011;2:143.
- Petersen RP, Campa MJ, Sperlazza J, et al. Tumor infiltrating Foxp3+ regulatory T-cells are associated with recurrence in pathologic stage I NSCLC patients. *Cancer*. 2006 Dec 15;107(12):2866-72.
- Peto J, Gilham C, Fletcher O, et al. The cervical cancer epidemic that screening has prevented in the UK. *Lancet*. 2004 Jul 17-23;364(9430):249-56.
- Piersma SJ, Jordanova ES, van Poelgeest MIE, et al. High number of intraepithelial CD8(+) tumor-infiltrating lymphocytes is associated with the absence of lymph node metastases in patients with large early-stage cervical cancer. *Cancer Res*. 2007 Jan 1;67(1):354-61.
- Pinto AP, Tulio S, Cruz OR. [Hpv cofactors in cervical carcinogenesis]. *Rev Assoc Med Bras*. 2002 Jan-Mar;48(1):73-8.
- Prevost-Blondel A, Roth E, Rosenthal FM, et al. Crucial role of TNF-alpha in CD8 T cell-mediated elimination of 3LL-A9 Lewis lung carcinoma cells in vivo. *J Immunol*. 2000 Apr 1;164(7):3645-51.

Rama CH, Roteli-Martins CM, Derchain SFM, et al. Prevalência do HPV em mulheres rastreadas para o câncer cervical. *Rev. Saúde Pública* [online]. 2008;42(1):123-30. Disponível em < <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89102008000100016>>. [2012 Oct 10].

Rammensee H, Bachmann J, Emmerich NP, et al. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics*. 1999 Nov;50(3-4):213-9.

Rammensee HG, Friede T, Stevanović S. MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics*. 1995;41(4):178-228.

Ramos CR, Abreu PA, Nascimento AL, et al. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. *Braz J Med Biol Res*. 2004 Aug;37(8):1103-9.

Rock KL, York IA, Goldberg AL. Post-proteasomal antigen processing for major histocompatibility complex class I presentation. *Nat Immunol*. 2004 Jul;5(7):670-7.

Rodríguez F, An LL, Harkins S, et al. DNA immunization with minigenes: low frequency of memory cytotoxic T lymphocytes and inefficient antiviral protection are rectified by ubiquitination. *J Virol*. 1998 Jun;72(6):5174-81.

Ronco LV, Karpova AY, Vidal M, et al. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Gene Dev*. 1998 Jul 1;12(13):2061-72.

Rosenberg SA, Sherry RM, Morton KE, et al. Tumor progression can occur despite the induction of very high levels of self/tumor antigen-specific CD8(+) T cells in patients with melanoma. *Journal of Immunology*. 2005 Nov 1;175(9):6169-76.

Roteli-Martins C, Naud P, De Borja P, et al. Sustained immunogenicity and efficacy of the HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine: up to 8.4 years of follow-up. *Hum Vaccin Immunother*. 2012 Mar 1;8(3).

Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, et al. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*. 1990 Dec 21;63(6):1129-36.

Schulz O, Diebold SS, Chen M, et al. Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. *Nature*. 2005 Feb 24;433(7028):887-92.

Schwartz SM, Daling JR, Shera KA, et al. Human papillomavirus and prognosis of invasive cervical cancer: a population-based study. *J Clin Oncol*. 2001 Apr 1;19(7):1906-15.

Schwartz SM, Daling JR, Shera KA, et al. Human papillomavirus and prognosis of invasive cervical cancer: A population-based study. *J Clin Oncol*. 2001 Apr 1;19(7):1906-15.

Southern SA, Herrington CS. Molecular events in uterine cervical cancer. *Sex Transm Infect*. 1998 Apr;74(2):101-9.

Stanley M. Immunobiology of HPV and HPV vaccines. *Gynecol Oncol*. 2008 May;109(2):S15-S21.

Stanley MA. Immune responses to human papilloma viruses. *Indian J Med Res.* 2009 Sep;130(3):266-76.

Stewart TJ, Drane D, Malliaros J, et al. ISCOMATRIX (TM) adjuvant: an adjuvant suitable for use in anticancer vaccines. *Vaccine.* 2004 Sep 9;22(27-28):3738-43.

Tabet SR, Krone MR, Hooton TM, et al. Bacterial infections in adult patients hospitalized with AIDS: case-control study of prophylactic efficacy of trimethoprim-sulfamethoxazole versus aerosolized pentamidine. *Int J Std Aids.* 1997 Sep;8(9):563-9.

Takeuchi J, Chen H, Hoyt MA, et al. Structural elements of the ubiquitin-independent proteasome degron of ornithine decarboxylase. *Biochem J.* 2008 Mar 1;410(2):401-7.

Tarcsa E, Szymanska G, Lecker S, et al. Ca²⁺-free calmodulin and calmodulin damaged by in vitro aging are selectively degraded by 26 S proteasomes without ubiquitination. *J Biol Chem.* 2000 Jul 7;275(27):20295-301.

Tellam J, Sherritt M, Thomson S, et al. Targeting of EBNA1 for rapid intracellular degradation overrides the inhibitory effects of the Gly-Ala repeat domain and restores CD8+ T cell recognition. *J Biol Chem.* 2001 Sep 7;276(36):33353-60.

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

Tobery TW, Siliciano RF. Targeting of HIV-1 antigens for rapid intracellular degradation enhances cytotoxic T lymphocyte (CTL) recognition and the induction of de novo CTL responses in vivo after immunization. *J Exp Med.* 1997 Mar 3;185(5):909-20.

Tofaris GK, Layfield R, Spillantini MG. alpha-synuclein metabolism and aggregation is linked to ubiquitin-independent degradation by the proteasome. *FEBS Lett.* 2001 Nov 30;509(1):22-6.

Tommasino M, Crawford L. Human Papillomavirus E6 and E7 - Proteins Which Deregulate the Cell-Cycle. *Bioessays.* 1995 Jun;17(6):509-18.

Vambutas A, Bonagura VR, Steinberg BM. Altered expression of TAP-1 and major histocompatibility complex class I in laryngeal papillomatosis: Correlation of TAP-1 with disease. *Clin Diagn Lab Immun.* 2000 Jan;7(1):79-85.

Vambutas A, DeVoti J, Nouri M, et al. Therapeutic vaccination with papillomavirus E6 and E7 long peptides results in the control of both established virus-induced lesions and latently infected sites in a pre-clinical cottontail rabbit papillomavirus model. *Vaccine.* 2005 Nov 1;23(45):5271-80.

Vambutas A, DeVoti J, Pinn W, et al. Interaction of human papillomavirus type 11 E7 protein with TAP-1 results in the reduction of ATP-dependent peptide transport. *Clinical Immunology.* 2001 Oct;101(1):94-9.

van der Burg SH. Therapeutic vaccines in cancer: moving from immunomonitoring to immunoguiding. *Expert Rev Vaccines.* 2008 Feb;7(1):1-5.

van der Burg SH, Piersma SJ, de Jong A, et al. Association of cervical cancer with the presence of CD4+ regulatory T cells specific for human papillomavirus antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jul 17;104(29):12087-92.

Varshavsky A. Ubiquitin fusion technique and its descendants. *Methods Enzymol*. 2000;327:578-93.

Velders MP, Weijzen S, Eiben GL, et al. Defined flanking spacers and enhanced proteolysis is essential for eradication of established tumors by an epitope string DNA vaccine. *Journal of Immunology*. 2001 May 1;166(9):5366-73.

Villa LL, Costa RLR, Petta CA, et al. High sustained efficacy of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus types 6/11/16/18 L1 virus-like particle vaccine through 5 years of follow-up. *Brit J Cancer*. 2006 Dec 4;95(11):1459-66.

Watts C. Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annu Rev Immunol*. 1997;15:821-50.

Weaver BA. Epidemiology and natural history of genital human papillomavirus infection. *J Am Osteopath Assoc*. 2006 Mar;106(3 Suppl 1):S2-8.

Weissman AM. Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001 Mar;2(3):169-78.

Welters MJ, Kenter GG, de Vos van Steenwijk PJ, et al. Success or failure of vaccination for HPV16-positive vulvar lesions correlates with kinetics and phenotype of induced T-cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jun 29;107(26):11895-9.

Wheeler CM, Castellsague X, Garland SM, et al. 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 Oncol*. 2012 Jan;13(1):100-10.

Woo YL, Sterling J, Damay I, et al. Characterising the local immune responses in cervical intraepithelial neoplasia: a cross-sectional and longitudinal analysis. *BJOG*. 2008 Dec;115(13):1616-21; discussion 21-2.

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

Xiang R, Lode HN, Chao TH, et al. An autologous oral DNA vaccine protects against murine melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 May 9;97(10):5492-7.

Yang Y, Fruh K, Ahn K, et al. In vivo assembly of the proteasomal complexes, implications for antigen processing. *J Biol Chem*. 1995 Nov 17;270(46):27687-94.

Zajac AJ, Murali-Krishna K, Blattman JN, et al. Therapeutic vaccination against chronic viral infection: the importance of cooperation between CD4(+) and CD8(+) T cells. *Curr Opin Immunol*. 1998 Aug;10(4):444-9.

Zhang M, Ishii K, Hisaeda H, et al. Ubiquitin-fusion degradation pathway plays an indispensable role in naked DNA vaccination with a chimeric gene encoding a syngeneic

cytotoxic T lymphocyte epitope of melanocyte and green fluorescent protein. *Immunology*. 2004 Aug;112(4):567-74.

Zhang M, Obata C, Hisaeda H, et al. A novel DNA vaccine based on ubiquitin-proteasome pathway targeting 'self'-antigens expressed in melanoma/melanocyte. *Gene Ther*. 2005 Jul;12(13):1049-57.

Zhou J, Sun XY, Stenzel DJ, et al. Expression of Vaccinia Recombinant Hpv 16 L1 and L2 Orf Proteins in Epithelial-Cells Is Sufficient for Assembly of Hpv Virion-Like Particles. *Virology*. 1991 Nov;185(1):251-7.

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