

HPV-16

BRUNA FELÍCIO MILAZZOTTO MALDONADO PORCHIA

**Construção e análise das propriedades profiláticas e
terapêuticas de uma vacina contra tumores associados ao
HPV-16**

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

SÃO PAULO

2009

BRUNA FELÍCIO MILAZZOTTO MALDONADO PORCHIA

**Construção e análise das propriedades profiláticas e terapêuticas
de uma vacina contra tumores associados ao
HPV-16**

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

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira

SÃO PAULO
2009



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

reprodução não autorizada pelo autor

T-ICB
BIOT
QH323.6
P833ca
2010

Porchia, Bruna Felício Milazzotto Maldonado.

Construção e análise das propriedades profiláticas e terapêuticas de uma vacina contra tumores associados ao HPV-16 / Bruna Felício Milazzotto Maldonado Porchia. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Luis Carlos de Souza Ferreira.

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 vacinas.

Versão do título para o inglês: Construction and analysis of the prophylactic and therapeutic proprieties of a vaccine against HPV-16 associated tumors .

Descritores: 1. Vacinas 2. Neoplasias 3. HPV-16 4. Glicoproteína D 5. Purificação de proteínas I. Ferreira, Luis Carlos de Souza II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia III. Título.

ICB/SBIB0229/2009

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

Candidato(a): Bruna Felício Milazzotto Maldonado Porchia.

Título da Dissertação: Construção e análise das propriedades profiláticas e terapêuticas de uma vacina contra tumores associados ao HPV-16.

Orientador(a): Luis Carlos de Souza Ferreira.

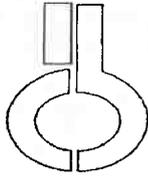
A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a 04 / 02 / 2010

Aprovado(a) **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: 
Nome: MAURICIO MARTINS RODRIGUES
Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

Examinador(a): Assinatura: 
Nome: CARLOS A. PENHÃ
Instituição: INSTITUTO BUTANTAN

Presidente: Assinatura: 
Nome: LUIS CARLOS DE SOUZA FERREIRA
Instituição: USP



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail:

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **061** nas fls. **46** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de **Luis Carlos de Souza Ferreira** Coordenador(a) da Linha de pesquisa "**Construção e análise das propriedades profiláticas e terapêuticas de uma nova vacina contra tumores associados ao HPV-16**" do qual participou(aram) o(s) alunos **Bruna Felicio Milazzotto Maldonado Porchia, Mariana Oliveira Diniz, Otto Luiz Dutra, Juliane Afonso**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **31.08.2007**.

São Paulo, 03 de setembro de 2007.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária
CEEA - ICB/USP

Dedico este trabalho

*Aos meus pais, Juçara e Luiz,
Pelo apoio e amor incondicional.
E à minha irmã, Sarah,
Pelos vinte e seis anos de grande amizade
e companheirismo.*

AGRADECIMENTOS

Os resultados apresentados nesta Dissertação não são fruto exclusivamente do meu esforço, mas também de diversas colaborações e parcerias. Esta é uma tentativa de agradecer aqueles que de alguma forma colaboraram para a realização deste projeto. Meus sinceros agradecimentos:

Ao Prof. Dr. Luís Carlos, pela orientação exigente, estímulo e apoio nos momentos mais difíceis na execução deste trabalho. Pela amizade e pelo exemplo de pesquisador que é. Muito obrigada pelo espaço concedido.

À Profa. Dra. Rita de Cássia, pelos conselhos profissionais e até pessoais, pela alegria e amizade.

À Dra. Maria Elisabete Sbrogio, pelo aprendizado de como manusear animais de laboratório e pelas orientações sobre vacinas e imunologia, pelo carinho e dedicação por este grupo de pesquisa. Isso sem contar os bolos, os doces e as bolachinhas para a hora do café.

Ao Prof. Dr. Armando Moraes Ventura e sua equipe, pelo espaço cedido em seu laboratório para a realização dos trabalhos com baculovírus e células de inseto.

Ao Luís Farinha, pela amizade e companheirismo durante todo este tempo, pelos ensinamentos sobre cultura de células e o mundo dos baculovírus. Espero ter retribuído à altura toda a força que você me deu.

Ao Prof. Dr. Carlos Augusto do Instituto Butantã e toda sua equipe, pela colaboração e o espaço cedido para a produção das proteínas em biorreatores.

À querida Daniela Ventini, sempre muito disposta a ajudar com as culturas de células em biorreatores.

Ao Otto Cerqueira, pelos ensinamentos em imunofluorescência e cultura celular, mas principalmente pela amizade fraternal e apoio nas horas difíceis.

À Priscila Gomes, amiga da graduação, que me apresentou ao professor Luís Carlos.

À Mariana Diniz por me receber no laboratório, pela amizade e por estar sempre disposta a ajudar.

Aos amigos do laboratório CEVAT-GENE 3 e 4: Juliano, Wilson, Jaime, Liliana, Robert, Milene, Roberto, Cristiane, Catarina, Juliana, Fabiana, Camila, Breno, Rafael, Renata, Elisa, Aline, Sabrina, Natalie, Daniela, Carolina, Carol Santa Cruz, Eduardo, Fabiano, Domingos, Hugo, Camila Lauand pelos momentos de descontração e dicas para a realização deste trabalho.

Aos companheiros do grupo HPV/HSV/HIV, Mariana, Cariri e Vinícius, pela imensa ajuda em todos os aspectos deste trabalho e pelas discussões, mas principalmente pelo apoio nos dias intermináveis de ensaios celulares.

Aos colegas do laboratório do Prof. Dr. Carlos Menck, pelo espaço utilizado.

À Camila Calderon e Loren Cristina pelo excelente apoio técnico.

Ao Luís e Juliane pela dedicação ao biotério e aos animais de experimentação.

Às funcionárias da biblioteca Maria José e Eva pela atenção nos processos finais da redação desta dissertação.

À Eliane, Fábila e Marcos, funcionários da secretaria da Biotecnologia, pela disposição em ajudar com os processos burocráticos da Universidade.

Às atuais companheiras de apartamento Adélia e Fabíola, pelas conversas, jantares e companhia de todos os dias.

Às queridas Milene, Nádia, Liliane, Mariella, Patrícia e Renata, minhas amigas de ontem, hoje e sempre.

Ao meu amor, Juliano, pela preciosa companhia, carinho e dedicação em todos os momentos, até mesmo nas horas de estresse profissional. Seu apoio foi fundamental para a realização deste trabalho, agradeço por você fazer parte da minha vida.

À Dilcéia, Neif, Anna Christina e Flávio, por ser minha família em São Paulo.

À minha família, pelo imenso apoio emocional, financeiro e pela confiança em mim depositada. Vocês são a minha Fortaleza!

À pequena Laila, que do mundo ainda sabe tão pouco, mas já é a luz das nossas vidas!

E principalmente a Deus, pelo cuidado e atenção nestes vinte e sete anos e por permitir a realização de um sonho.

**“Eu quero saber como Deus criou este mundo.
Não estou interessado neste ou naquele fenômeno...
Eu quero saber os pensamentos Dele, o resto são detalhes.”**

Albert Einstein

Este trabalho foi realizado sob orientação do Professor Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira, no Centro de Vacinas e Terapia Gênica (CEVAT – GENE 4), no Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

RESUMO

PORCHIA, B.F.M.M. **Construção e análise das propriedades profiláticas e terapêuticas de uma vacina contra tumores associados ao HPV-16.** 114 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Cerca de 500.000 novos casos de câncer cervical são detectados a cada ano, causando a morte de aproximadamente 270.000 mulheres em todo mundo. O desenvolvimento de vacinas contra o vírus do papiloma humano (HPV) representa uma importante alternativa para o controle da infecção sexualmente transmissível e do câncer cervical. O HPV-16 é o tipo mais prevalente e expressa as oncoproteínas (E6, e E7) responsáveis pelo processo de malignização de queratinócitos. Neste trabalho exploramos uma estratégia vacinal inédita contra tumores induzidos pelo HPV-16 empregando uma forma recombinante da proteína E7 obtida após fusão genética com a glicoproteína D (gD) do vírus herpes tipo 1 (HSV-1), uma proteína de membrana com propriedades adjuvantes endógenas particularmente para linfócitos T. A proteína híbrida recombinante foi obtida em sistema de expressão bacteriano (*E. coli* com vetor da série pET) bem como em sistema de expressão baculovírus/células de inseto e purificada por cromatografia de afinidade. A proteína expressa em sistema pET concentrou-se totalmente no extrato insolúvel bacteriano mas a solubilidade foi obtida após desnaturação e *refolding*. A proteína gDE7 gerada em sistema bacteriano foi testada nas formas insolúvel e solúvel como vacina de subunidades de administração parenteral em camundongos machos C57BL/6. A proteína gDE7 insolúvel, administrada em quatro doses com uma semana de intervalo entre as doses, conferiu 80% de proteção profilática para o crescimento tumoral em camundongos desafiados com células TC-1. Já a proteína gDE7 que passou pelo processo de *refolding*, e permaneceu na forma solúvel, foi capaz de proteger 100% dos animais quando administrada de modo profilático para o crescimento tumoral. A gDE7 solúvel foi capaz de proteger 30% dos animais desafiados quando testada de forma terapêutica. A eficácia da formulação vacinal observada nos ensaios de proteção foi confirmada na avaliação de respostas imunológicas específicas mediadas por linfócitos T CD8+ através de ensaios de ELISPOT, citotoxicidade *in vivo*, ICS (*Intracellular Cytokine Staining*) e Elisa de

citocinas. Adicionalmente, realizamos ensaios para dosagem de anticorpos anti-gD específicos e anti-E7 específicos. Além disso, testamos também o potencial neutralizante dos soros gerados frente ao HSV-1. As condições de expressão das proteínas expressas em células de inseto infectadas com baculovírus foram estabelecidas. Os resultados obtidos durante a execução deste projeto de mestrado podem contribuir para o desenvolvimento de uma nova estratégia vacinal para o controle de tumores induzidos pelo HPV-16.

Palavras-chave: Vacinas. Neoplasias. HPV-16. Glicoproteína D. E7. Purificação de proteínas. HSV-1.

ABSTRACT

PORCHIA, B.F.M.M. **Construction and analysis of the prophylactic and therapeutic proprieties of a vaccine against HPV-16 associated tumors.** 114 p. Dissertation (Master in Biotechnology) - Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2009.

About 500,000 new cases of cervical cancer are detected each year, killing approximately 270,000 women around the world. The development of vaccines against human papillomavirus (HPV) represents an important alternative to control this sexually transmitted infection and cervical cancer. HPV-16 is the most prevalent virus type associated with cervical cancer and infected cells expresses oncoproteins (E6 and E7) responsible for the malignization process. In this paper we explored a new vaccine strategy against HPV-16 induced tumors using a recombinant form of E7 protein obtained after genetic fusion with glycoprotein D (gD) of type 1 human herpes virus (HSV-1), a membrane protein with endogenous adjuvant properties particularly for T lymphocytes. The recombinant hybrid protein was obtained in bacterial expression system (*E. coli* vector pET series) as well as in baculovirus-infected insect cells and subsequently purified by affinity chromatography. The proteins expressed in pET vectors accumulated in the insoluble bacterial extract but soluble protein was obtained after denaturation and refolding. The gDE7 protein generated in bacterial cells was tested in the insoluble and soluble forms as a subunit vaccine administered subcutaneously in C57BL/6 mice. The gDE7 insoluble protein, administered in four doses at weekly intervals, resulted in 80% prophylactic protection to tumor growth in mice challenged with TC-1 cells. The gDE7 protein, submitted to the refolding process, conferred 100% of prophylactic protection in vaccinated mice. The soluble gDE7 conferred 30% protection to mice when tested therapeutically in mice challenged with TC-1 cells. The protection conferred by the vaccine was supported by results regarding evaluation of E7-specific CD8 + T cell response through ELISPOT, *in vivo* cytotoxicity, ICS (Intracellular Cytokine Staining) and cytokine ELISA. Additionally, gD-specific and E7-specific antibody responses were measured in vaccinated mice but the anti-HSV-1 sera did not inactivate HSV-1 virus particules. The conditions allowing expression of the recombinant proteins in baculovirus-infected cells were established. The results obtained during the present

study contribute to the development of a new vaccine strategy for the control of HPV-16-induced tumors.

Keywords: Vaccines. Neoplasia. HPV-16. Glycoprotein D. E7. Protein purification. HSV-1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Modelo estrutural do HVEM humano ligado ao BTLA e à gD do HSV-1.....	29
Figura 2 - Representação esquemática dos vetores de expressão pETgD e pETgDE7	35
Figura 3 – Esquema de imunização profilática (A) e terapêutica (B) e análise de proteção para crescimento de tumores.....	42
Figura 4 – Fragmentos de DNA que codificam para as proteínas gD e gDE7 amplificados por PCR.....	57
Figura 5 – Confirmação da clonagem dos fragmentos gD e gDE7 nos vetores pGEM T- Easy e pET28a por análise de restrição.....	58
Figura 6 – Análise da composição protéica dos extratos totais de quatro linhagens bacterianas que albergam os plasmídeos pETgD e pETgDE7.....	59
Figura 7 - Determinação da solubilidade das proteínas gD e gDE7 expressas em sistema bacteriano.	61
Figura 8 - Purificação das proteínas gD e gDE7 presente no extrato insolúvel de <i>E. coli</i>	63
Figura 9 – Efeito profilático antitumoral da formulação vacinal insolúvel composta pela fusão genética da proteína gD do HSV-1 e da oncoproteína E7 do HPV-16 em camundongos desafiados com a linhagem tumoral TC-1.....	65
Figura 10 – Determinação do número de células do baço secretoras de IFN- γ por 5×10^5 células através de ELISPOT.....	67

Figura 11 – Citotoxicidade <i>in vivo</i> e a determinação da porcentagem de lise específica mediado por células T CD8+ citotóxicas específicas para o peptídeo E7 em animais imunizados.....	67
Figura 12 – Efeito profilático antitumoral da formulação vacinal solúvel composta pela fusão genética da proteína gD do HSV-1 e da oncoproteína E7 do HPV-16 em camundongos desafiados com a linhagem tumoral TC-1.....	69
Figura 13 – Ensaio de cinética de doses da formulação vacinal gDE7 e análise do nível de proteção profilática antitumoral.....	69
Figura 14 – Análise <i>in vitro</i> da resposta imunológica E7-específica gerada pela imunização subcutânea de camundongos machos C57BL/6 com as proteínas recombinantes solúveis.....	73
Figura 15 – Dosagem de citocinas através de ensaio de ELISA e análise do padrão Th1/Th2 <i>in vivo</i>	74
Figura 16 – Efeito terapêutico antitumoral da formulação composta pela fusão genética da proteína gD do HSV-1 e da oncoproteína E7 do HPV-16 em camundongos desafiados com a linhagem tumoral TC-1.....	76
Figura 17 – Avaliação da imunogenicidade da proteína gD nas formulações vacinais solúveis empregadas após imunização subcutânea.....	79
Figura 18 – Resposta das subclasses de IgG sérico contra a proteína gD.....	79
Figura 19 – Ensaio de redução de placas virais (neutralização) do HSV-1.....	80
Figura 20 – Avaliação da adjuvantividade da proteína gD nas formulações vacinais solúveis através dos níveis de anticorpos gerados	

contra o antígeno E7 por ensaio de ELISA.....	82
Figura 21 – Resposta de subclasses de IgG sérico contra a proteína E7.....	82
Figura 22 – Ensaio de reconhecimento do HVEM na superfície de monócitos U937 e ligação das proteínas gD e gDE7 solúveis e insolúveis geradas em sistema bacteriano em monócitos.	85
Figura 23 – Confirmação da clonagem dos fragmentos gD e gDE7 no vetor TOPO® por análise de restrição.....	89
Figura 24 – Representação esquemática da recombinação dos vetores TOPOgD e TOPOgDE7 com o DNA baculoviral em SF-9.....	90
Figura 25 – Detecção de vetores baculovirais gD e gDE7 recombinantes.....	91
Figura 26 – Titulação da terceira passagem viral por ensaio de placa dos vetores baculovirais gD e gDE7.....	92
Figura 27 - Análise por densitometria da cinética de expressão e transporte para o sobrenadante da cultura da proteína gDE7 expressa em Sf-9.....	93
Figura 28 - Purificação da proteína gD presente no sobrenadante de cultura de Sf-9.....	94
Figura 29 - Purificação da proteína gDE7 presente no sobrenadante de cultura de Sf-9.....	95
Figura 30 – Ensaio de ligação das proteínas gD e gDE7 produzidas em sistema eucarioto em monócitos, possivelmente através do receptor celular HVEM.....	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Seqüências dos iniciadores utilizados para a clonagem dos genes da gD e gDE7 em sistema bacteriano de expressão	33
Tabela 2 - Características das linhagens bacterianas utilizadas em ensaios de expressão das proteínas gD e gDE7.....	38
Tabela 3 - Seqüências dos iniciadores utilizados para a clonagem dos genes da gD e gDE7 em sistema baculovírus/células de inseto.....	49
Tabela 4 - Seqüências dos iniciadores utilizados para a triagem dos genes da gD e gDE7 na construção dos baculovírus recombinantes.....	52
Tabela 5 – Propriedade neutralizante dos soros gerados com as formulações vacinais testadas contra o HSV-1.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS

APC's – Antigens presenting cells
BTLA – B and T lymphocyte attenuator
E. coli – *Escherichia coli*
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGFR - receptor do fator de crescimento epidermal
ELISA – Enzime-linked immunosorbent assay
g – Gramas
g – aceleração da gravidade
gD – Glicoproteína D
gDE7 – Glicoproteína D fusionada geneticamente a proteína E7
HCl – Ácido clorídrico
HPV-16 – Human Papillomavirus 16
HSV-1 – Herpes Simplex Vírus 1
HVEM – Herpesvirus entry mediator
IgG – Imunoglobulina de classe G
IgG1 – Imunoglobulina de classe G e subclasse 1
IgG2c – Imunoglobulina de classe G e subclasse 2c
IPTG – Isopropil-tio- β -galactosídeo
kD – Kilodaltons
LB – Luria Bertani
mg - miligramas
mL – Mililitros
m/v – massa sobre volume
NaOH – Hidróxido de sódio
OPD – Ortho-Phenylenediamine
pb – Pares de bases
PBS – Tampão salina fosfato
PBST – Tampão salina fosfato acrescido de 0,05% de tween 20
PCR – Reação em cadeia da polimerase
PEG – Polietilenoglicol
PFU – Plaque forming units
PMSF – Phenylmethylsulfonyl fluoride
RPM – Rotações por minuto
SDS – Duodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE - sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
V – volume
v/v – volume sobre volume
 μ g – Microgramas
 μ L – Microlitros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
2 OBJETIVOS.....	31
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1 Expressão das proteínas recombinantes gD e gDE7 em sistema bacteriano.....	32
3.1.1 Linhagens bacterianas e condições de cultivo.....	32
3.1.2 Amplificação dos genes das proteínas gD e gDE7.....	32
3.1.3 Clonagem dos genes gD e gDE7 no vetor pGEM-T Easy.....	33
3.1.4 Extração de DNA plasmideal por lise alcalina.....	33
3.1.5 Transformação bacteriana por choque térmico.....	34
3.1.6 Subclonagem dos genes gD e gDE7 em vetor de expressão pET28a.....	35
3.1.7 Seqüenciamento dos genes gD e gDE7 clonados no plasmídeo pET28a.....	36
3.1.8 Análise da expressão <i>in vitro</i> das proteínas recombinantes gD e gDE7.....	37
3.1.9 Determinação da solubilidade e purificação das proteínas gD e gDE7 expressas em sistema bacteriano.....	38
3.1.10 <i>Refolding</i> das proteínas expressas no extrato insolúvel de <i>E. coli</i>.....	39
3.1.11 Imunodeteção das proteínas recombinantes gD e gDE7.....	40

3.1.12 Diálise das proteínas insolúveis.....	41
3.1.13 Animais utilizados.....	41
3.1.14 Protocolo de imunização.....	41
3.1.15 Ensaio de desafio com células TC-1.....	43
3.1.16 Coleta e processamento das amostras.....	43
3.1.17 <i>Intracellular Cytokine Staining</i> (ICS)	43
3.1.18 ELISPOT.....	44
3.1.19 ELISA.....	45
3.1.20 Citotoxicidade <i>in vivo</i> por linfócitos T CD8+.....	45
3.1.21 ELISA de citocinas.....	46
3.1.22 Ensaio de neutralização viral (HSV-1)	46
3.1.23 Análises estatísticas.....	47
3.2 Construção dos vetores baculovirais e expressão das proteínas gD e gDE7 em células de inseto.....	48
3.2.1 Linhagens bacterianas e condições de cultivo.....	48
3.2.2 Vetores de transferência.....	48
3.2.3 Cultivo e manutenção da linhagem celular Sf-9.....	49
3.2.4 Transfecção dos vetores de transferência em células Sf-9.....	49
3.2.5 Isolamento de baculovírus recombinantes mediante ensaio de placa.....	50
3.2.6 Obtenção da primeira passagem viral.....	50

3.2.7 Extração de DNA baculoviral.....	51
3.2.8 Análise por PCR de DNA baculoviral.....	51
3.2.9 Amplificação de estoques virais.....	52
3.2.10 Titulação dos vetores baculovirais por ensaio de placa.....	52
3.2.11 Análise de expressão dos vetores baculovirais: Detecção por <i>Western Blot</i>	53
3.2.12 Purificação das proteínas gD e gDE7 produzidas em sistema baculovírus/células de inseto.....	53
4 RESULTADOS.....	55
ETAPA 4.1 Produção das proteínas recombinantes em sistema bacteriano e análise da proteção antitumoral <i>in vivo</i>.....	56
4.1.1 Clonagem e subclonagem dos genes que codificam as proteínas gD e gDE7 nos vetores bacterianos pGEM-T Easy e pET28a.....	57
4.1.2 Análise da expressão <i>in vitro</i> das proteínas gD e gDE7.....	59
4.1.3 Determinação da solubilidade das proteínas expressas pela linhagem BL21(DE3).....	60
4.1.4 Purificação das proteínas gD e gDE7 por cromatografia de afinidade ao níquel.....	62
4.1.5 Efeito profilático antitumoral da proteína gDE7 insolúvel em camundongos C57Bl/6 perante desafio com TC-1.....	65
4.1.6 Efeito profilático antitumoral da proteína gDE7 solúvel em camundongos C57Bl/6 perante desafio com TC-1.....	68
4.1.7 Efeito terapêutico antitumoral da proteína gDE7 solúvel em	

camundongos C57BL/6 perante desafio com TC-1.....	75
4.1.8 Determinação da resposta humoral induzida pelas formulações vacinais solúveis.....	77
4.1.9 Avaliação da atividade biológica das proteínas gD e gDE7 <i>in vitro</i>	83
ETAPA 4.2 Produção das proteínas recombinantes em sistema baculovírus/células de inseto.....	87
4.2.1 Clonagem dos genes da gD e gDE7 no vetor de transferência TOPO.....	88
4.2.2 Obtenção e análise dos vetores baculovirais.....	89
4.2.3 Análise por PCR do DNA baculoviral de primeira passagem.....	90
4.2.4 Titulação dos vetores baculovirais por ensaio de placa.....	91
4.2.5 Teste de expressão dos vetores baculovirais e purificação das proteínas recombinantes.....	92
5 DISCUSSÃO.....	97
6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	105
REFERÊNCIAS.....	108

1 INTRODUÇÃO

Aproximadamente 500.000 novos casos de câncer de colo de útero são detectados todos os anos, sendo este o segundo tipo de câncer mais comum (depois do câncer de mama) entre as mulheres em todo o mundo (RODEN, LING e WU, 2004), causando em torno de 270.000 mortes por ano (PISANI et al., 1999; ZUR HAUSEN, 2006; WU, 2007). Em certos países, a prevalência da infecção alcança 80% das mulheres sexualmente ativas. Dados comprovam que o vírus do papiloma humano (HPV) é o agente presente em mais de 99% dos casos de câncer cervical (WALBOOMERS et al., 1999), sendo que dos mais de 200 tipos, o HPV do tipo 16 é o mais freqüentemente associado com o desenvolvimento de neoplasia intraepitelial cervical (CIN) e de tumor cervical (CHU et al., 2000). Alguns autores acreditam que o HPV é responsável por um terço dos casos de câncer em humanos (ZHENG et al., 2004). De acordo com zur Hausen (1996), alguns tipos de HPV também podem ser encontrados na cavidade bucal, laringe, pulmões, cavidade respiratória, esôfago e na pele, e alguns autores acreditam que este vírus é responsável por dois terços dos cânceres que acometem os humanos.

O aumento do uso do exame papanicolau nos Estados Unidos durante as últimas cinco décadas gerou um declínio de 70% no número de óbitos por câncer cervical, demonstrando a importância da prevenção no controle da doença. Porém, tal exame não é aplicado de forma ampla nos países em desenvolvimento devido ao seu alto custo, e tal fato contribui para que a doença alcance um número mais elevado de vítimas. Estima-se que os Estados Unidos gastam anualmente seis bilhões de dólares com essa prática. Conforme dados estimados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), o número de novos casos ultrapassou 18.680 em 2008 no Brasil, com um risco estimado de 19 casos a cada 100 mil mulheres. A Organização Mundial de Saúde prevê um aumento para aproximadamente 36.800 novos casos no ano de 2030 no país (GOLDIE et al., 2007).

O papilomavírus pertence à família *Papovaviridae*, é um vírus não envelopado, possui DNA de dupla fita circular de aproximadamente 8000 pares de bases e tem simetria icosaédrica. Além disso, o papilomavírus possui especificidade ao seu hospedeiro, assim, o CRPV (*Cottontail rabbit papillomavirus*) infecta apenas coelhos, o BPV (*Bovine Papillomavirus*) infecta bovinos, o COPV (*Canine Oral*

Papillomavirus) infecta os cães e o HPV (*Human Papillomavirus*) infecta os humanos (BREITBURD e COURSAGET, 1999). Atualmente mais de 200 tipos de HPV estão descritos (PAAVONEN, 2007; MATSUKURA e SUGASE, 2008), e podem ser definidos como de alto risco os tipos capazes de imortalizar os queratinócitos e levar ao quadro clínico de câncer (tipos 16, 18, 33, 45, entre outros), e de baixo risco os tipos que dificilmente causarão tumores (tipos 11, 29, 63, 65, entre outros) (ZUR HAUSEN, 1996).

A infecção e o crescimento vegetativo do vírus são absolutamente dependentes do processo de diferenciação dos queratinócitos. A infecção ocorre nas camadas basais do epitélio, mas a expressão das oncoproteínas ocorre nas camadas superiores onde os queratinócitos estão em um estágio mais avançado de diferenciação (STANLEY, 2006). O fato de o rearranjo viral e sua liberação ocorrer em queratinócitos maduros que logo entrarão em apoptose, e também a falta de processos inflamatórios na infecção, explicam o “escape” da vigilância do sistema imunológico à infecção.

O HPV possui dois genes de expressão tardia (*Late*) que codificam as proteínas do capsídeo. Essas proteínas, L1 e L2, são expressas nas camadas mais superficiais do epitélio e promovem o rearranjo viral e a liberação do vírus, que assim completa seu ciclo. A proteína L1 é o alvo das vacinas profiláticas contra o HPV, como a Gardasil (Merck Sharpe & Domme) e a Cervarix (Glaxo Smith Kline), licenciadas recentemente para uso em humanos. O objetivo das vacinas profiláticas é produzir anticorpos neutralizantes que previnam as infecções pelo vírus HPV. A produção desta vacina consiste em expressar os monômeros de L1 *in vitro* que se agregam em VLPs (*Virus Like Particles*), porém, não contêm a informação genética do vírus (OAKNIN e BARRETINA, 2008; SENGER et al., 2009). No entanto existem algumas dificuldades, como a ausência de proteção cruzada entre as diferentes L1 existentes nos mais de 200 tipos de HPV descritos.

Os genes de expressão imediata (*Early*) do HPV codificam seis proteínas com variadas funções: E1, E2, E4, E5, E6 e E7. A proteína E1 está relacionada à replicação do DNA viral e funciona como uma helicase (STANLEY et al., 2007). O gene E2 codifica uma proteína que é responsável pelo controle da transcrição dos genes virais. De acordo com sua concentração no interior da célula, a expressão dos demais genes virais é controlada, estimulando ou inibindo a transcrição destes (ZUR

HAUSEN, 1999; LASARO et al., 2004). A proteína E4 é expressa nos extratos superiores do epitélio infectado onde promove modificações no citoesqueleto que facilitam a montagem e liberação das partículas virais. A proteína E5 estimula a proliferação celular através da interação com várias proteínas celulares, entre elas, o receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) reduzindo sua degradação e estimulando a divisão celular. Possui importância crucial nos estágios precoces da transformação celular, mas não é mais expresso em estágios tardios no ciclo viral. (CRUSIUS et al., 1997; ZUR HAUSEN, 2002; STANLEY et al., 2007). A transformação e malignização das células infectadas pelo HPV ocorrem quando as proteínas de expressão imediata E6 e E7 inativam respectivamente os produtos dos genes supressores de tumores, p53 e pRB, levando ao descontrole do crescimento celular.

A proteína p53 é responsável por monitorar danos ocorridos na molécula de DNA a cada ciclo celular, e desta forma, a progressão do ciclo é impedida até que o dano seja reparado (LEWIN, 2000). A expressão da proteína E6 do HPV pelas células infectadas resulta na degradação da p53 e o ciclo celular passa a ocorrer sem reparos. Estudos recentes elucidaram novas funções da proteína E6, como por exemplo, a ativação da telomerase (YUGAWA e KIYONO, 2009). A subunidade catalítica da transcriptase reversa da telomerase (hTERT), expressa somente em um pequeno grupo de células como as células-tronco, é um componente limitante da atividade da telomerase. Descobriu-se que a proteína E6 do HPV-16 é capaz de promover a degradação do repressor de hTERT, o NFX1-91 promovendo assim a ativação da telomerase em queratinócitos infectados.

A proteína pRB promove a regulação negativa do ciclo celular na transição das fases G1 e S através da atividade de E2F, o fator responsável pela transcrição de genes que atuam na replicação dos cromossomos. Estudos recentes demonstraram o mecanismo pelo qual a proteína E7 perturba o ciclo celular (YUGAWA e KIYONO, 2009). Em um primeiro passo, a proteína E7 recruta uma protease dependente de cálcio, a calpaina, que promove a clivagem da porção C' terminal de pRB resultando na liberação de E2F. A clivagem parece ser pré-requisito para a degradação de pRB via proteossomo. A liberação de E2F e a degradação de pRB causa uma perturbação do ciclo celular através de um estímulo excessivo para a proliferação dos queratinócitos infectados.

As proteínas E6 e E7 são expressas continuamente em tumores e são essenciais para a manutenção do ciclo viral. Além de controlar o ciclo celular das células infectadas, as oncoproteínas E6 e E7 modulam o sistema imune de forma que as células tumorais tornam-se pouco imunogênicas. Tal processo pode acarretar até na tolerância imunológica ao tumor (TINDLE, 2002).

A maioria das infecções por HPV é transiente, sendo que o tempo necessário para a sua eliminação varia entre 8-14 meses para os HPVs de alto risco e 5-6 meses para os HPVs de baixo risco. Porém, se o sistema imune falhar na eliminação do vírus ou no controle da infecção, existe grandes chances de se desenvolver uma neoplasia intra-epitelial cervical ou até mesmo um carcinoma invasivo (STANLEY, 2005). A progressão de lesões benignas para carcinomas invasivos está relacionada com a persistência da infecção, a integração do genoma viral ao DNA do hospedeiro, ao aumento da expressão de E6 e E7 e a conseqüente tolerização dos antígenos tumorais.

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. A imunoterapia contra o câncer surge como uma estratégia promissora no controle de tumores, capaz de desenvolver imunidade específica contra células malignas sem atacar as células saudáveis, e para tal, é preciso que se estimulem adequadamente células apresentadoras de antígeno (APCs) e linfócitos T específicos contra antígenos tumorais (WANG et al., 1998). Existem muitas vantagens em utilizar imunoterapia no controle de tumores, e a mais importante delas é a baixa toxicidade quando comparada a terapias tradicionais como a quimioterapia e a radioterapia. Diversos grupos têm gerado resultados promissores nesta área de pesquisa (HALLIN et al., 1997; BARBUTO et al., 2004; AVIGAN et al., 2004; LU et al., 2004) e demonstram que os linfócitos T citotóxicos têm grande importância na eliminação de células neoplásicas e por isso despertam interesse para estratégias imunoterápicas para o controle de câncer em humanos. Ensaio com imunossuprimidos ilustram a importância da resposta imune mediada por células na resolução ou controle da infecção do HPV. Pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) apresentam ocorrências múltiplas de neoplasia intra-epitelial cervical e alta incidência de verrugas genitais (STANLEY, 2005). Além disso, alguns estudos

sugerem que o HIV pode aumentar a oncogenicidade dos tipos de alto risco assim como ativar os tipos de baixo risco (NICOL et al., 2005).

Diferentes estratégias vacinais com enfoque terapêutico vêm sendo testadas nos últimos anos com o objetivo de induzir resposta citotóxica contra as células neoplásicas que expressam as oncoproteínas do HPV16. São elas: vacinas de proteína purificada, fusionada ou não a adjuvantes, vacinas de DNA, vacinas virais ou de bactérias recombinantes, vacinas de células dendríticas e vacinas que utilizam peptídeos (RODEN; LING e WU, 2004). Testes com proteínas purificadas utilizadas como formulação vacinal contra o HPV vêm sendo realizados e revelam duas vantagens: não apresentam restrição de MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade) e são menos dependentes do HLA (Antígeno Leucocitário Humano) do paciente (RODEN; LING e WU, 2004).

Jong e colaboradores (2002) desenvolveram uma vacina que compreendia as oncoproteínas do HPV16 E6 e E7 fusionadas à L2, proteína do capsídeo viral, denominada TA-CIN. A vacina foi administrada sem adjuvantes pela via intramuscular e desencadeou resposta de células T citotóxicas contra as oncoproteínas E6 e E7 e de anticorpos neutralizantes (IgG) contra proteínas do capsídeo do HPV em modelo murino mas os resultados não foram tão animadores em humanos. Karanam et al. (2009) utilizaram a mesma formulação co-administrada ao adjuvante GPI-0100, um análogo semi-sintético da saponina quillaja, conhecida por promover respostas humoral e celular. Este grupo alcançou resultados muito promissores em modelo murino e em macacos. Outro estudo mostrou que a proteína E7 fusionada à proteína D de *Haemophilus influenzae* administrada com o adjuvante AS02B da Glaxo-SmithKline foi bem tolerada e melhorou a atividade das células T citotóxicas levando à regressão de lesões em alguns pacientes (HALLEZ et al., 2004). Chu et al. (2000) demonstrou uma imunoterapia eficiente baseada na administração de uma proteína de fusão compreendida pela HSP65 (*heat shock protein 65*) do *Mycobacterium bovis* e a E7 do HPV16. A vacina causou a regressão de tumores palpáveis por volta do 28º dia após a implantação do tumor, e protegeu frente a um segundo desafio com uma carga maior de células tumorais. A sobrevivência dos animais foi maior devido à ativação de linfócitos T CD8+ específicos contra a proteína E7 do HPV. Fernando e colaboradores (1999) testaram uma vacina baseada na fusão da E7 à glutatona-S-transferase (GST). Camundongos

imunizados com a E7GST e com o adjuvante Quil-A apresentaram ativação de resposta imune celular contra a proteína E7 do HPV16 e ficaram protegidos a desafios com células tumorais. Em outra abordagem, uma vacina baseada na fusão da E7 com as proteínas do capsídeo do HPV16 L1/L2 na forma de VLPs foi capaz de proteger camundongos C57BL/6 contra o desafio de células tumorais TC-1, através da ativação da resposta de linfócitos T CD8+. A vacina indica que VLPs quiméricas podem ser usadas como excelentes veículos na geração de resposta imune celular.

As vacinas de DNA compreendem vetores plasmidiais que codificam o antígeno sob o controle de um promotor eucarioto forte tornando as células capazes de expressar e apresentar o antígeno como durante a infecção viral, e assim, desencadear respostas imunológicas específicas (ALVES et al., 2001). Essa imunoterapia tem sido empregada devido à sua simplicidade de produção, administração e estabilidade. Para o HPV, a proteção induzida por vacinas de DNA requer a expressão conjunta da E7 fusionada a diferentes proteínas, o que pode resultar em proteção profilática e terapêutica a desafios com células tumorais (CHEN et al., 2000; CHENG et al., 2001; HUNG et al., 2001; TRIMBLE et al., 2003; HSIEH et al., 2004).

Em trabalho desenvolvido no Centro de Vacinas e Terapia Gênica (CEVAT – GENE) da Universidade de São Paulo produziu-se uma vacina de DNA baseada na expressão de uma proteína híbrida, resultado da fusão da oncoproteína E7 do HPV com a glicoproteína D do Herpes simplex vírus 1 (HSV-1) (LASARO et al., 2005). A estratégia empregada consistiu na clonagem do gene da E7 em sítio próximo à extremidade C-terminal da gD. Animais imunizados apresentaram proteção profilática de 100% quando desafiados com a linhagem tumoral TC-1, enquanto a abordagem terapêutica alcançou 40% de eficácia após quatro doses das vacinas. A proteção alcançada foi relacionada à capacidade da vacina desencadear respostas dependentes de linfócitos T CD8+ específicos contra a oncoproteína E7 (LASARO et al., 2005). Tais resultados foram atribuídos às propriedades adjuvantes da proteína gD codificada pelas vacinas de DNA. Embora o mecanismo preciso do efeito adjuvante associado à proteína gD ainda não seja conhecido, os resultados relativos à ativação de linfócitos T citotóxicos são muito promissores e mereciam ser explorados, particularmente na forma de proteína purificada.

Os adjuvantes são componentes importantes nas formulações vacinais. A palavra adjuvante tem origem no latim *adjuvare* e quer dizer ajudar. Os adjuvantes aumentam a imunogenicidade do antígeno, atuando como imunomoduladores ou como sistemas de entrega (O'HAGAN e VALIANTE, 2003). Três sinais são necessários para desencadear uma resposta imune adequada. O primeiro sinal ou sinal 0, refere-se à ativação do sistema imune através da transmissão de "sinais de perigo" desencadeados pelo reconhecimento de Padrões Moleculares Associados a Petógenos (PAMPs). O segundo sinal ou sinal 1, diz respeito ao antígeno propriamente dito, seu processamento e apresentação via molécula de MHC nos órgão linfóides. Já o terceiro sinal ou sinal 2, refere-se à interação de receptores e ligantes que disparam sinais co-estimulatórios para linfócitos, por exemplo (REED et al., 2008).

Os adjuvantes podem atuar sobre os três sinais. Ao interagir com Toll-like receptors (flagelinas de *Salmonella* e toxinas bacterianas) o adjuvante atua sobre o sinal 0 (REED et al., 2008). Ao facilitar a entrega dos antígenos aos órgãos linfóides (lipossomas e microesferas) o adjuvante atua sobre o sinal 1. E, por fim, ao interagir com receptores celulares responsáveis por enviar sinais co-estimulatórios ou co-inibitórios ao sistema imune (HVEM, herpes virus entry mediator), o adjuvante atua sobre o sinal 2. A formulação vacinal ideal deve atuar em um ou mais sinais para gerar uma resposta imune eficiente (PERRIE et al., 2008).

Existem alguns adjuvantes já aprovados para uso em vacinas para humanos: **1)** os sais de alumínio – Alum – utilizado em vacinas contra o vírus da pólio inativado e *Haemophilus influenzae B*, entre outras; **2)** Emulsões óleo em água – MF59TM – utilizado em formulações vacinais contra influenza; **3)** Derivados não tóxicos do lipopolissacarídeo de *Salmonella minnesota* (LPS) – MPL® - utilizado na vacina licenciada contra a hepatite B; **4)** as VLPs ou *virus like particles* – formulação da vacina profilática contra o HPV e **5)** subunidade B da toxina colérica – utilizada para melhorar a resposta imune da vacina contra o cólera que utiliza o próprio microorganismo inativado (REED et al., 2008; PERRIE et al., 2008). A pesquisa que envolve a descoberta de novos adjuvantes vacinais cresce a cada ano e alguns já estão em processo de desenvolvimento.

As glicoproteínas do HSV são componentes estruturais do envelope do vírion e são expressas na membrana plasmática de células infectadas, agindo como

principal estímulo antigênico para a resposta imune celular e humoral contra o vírus (NORRILD et al., 1980; AURELIAN, 2004). A gD do HSV-1 e do HSV-2 têm alto nível de similaridade e podem gerar proteção contra ambos tipos virais (LONG et al., 1984), além de ser o principal alvo para ativação de linfócitos TCD4+ em estratégias vacinais contra o HSV-1 (MIKLOSKA e CUNNINGHAM, 1998). A glicosilação da proteína gD é essencial para a ativação de linfócitos e de células dendríticas, com papel crucial na geração de uma imunidade protetora (AURELIAN et al., 1991). Pollara e colaboradores (2004) sugeriram que a gD do HSV causa ativação de células do sistema imune e induz produção de IFN- γ através da ativação de NF- κ B.

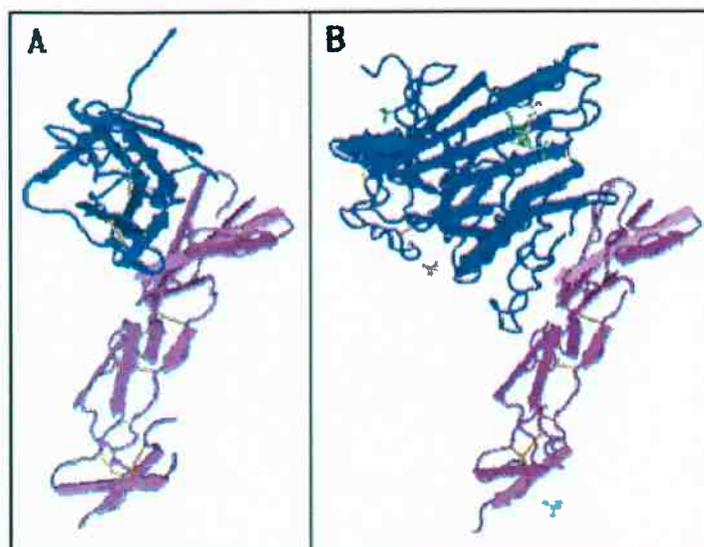
Além disso, a porção N-terminal da gD possui um domínio de ligação ao receptor HVEM compreendido pelos aminoácidos 7-15 e 24-32 desta proteína (CONNOLLY et al., 2002). O HVEM faz parte da família de receptores de fatores de necrose tumoral (TNFR) e está expresso em diversos tipos celulares (linfócitos T e B, monócitos e células dendríticas) e tecidos. A função desse receptor é transmitir sinais co-estimulatórios ou co-inibitórios ao sistema imune através da interação com moléculas como LIGHT, as linfotoxinas α , BTLA e CD160 (GONZALEZ et al., 2005; CAI e FREEMAN, 2009).

O papel da proteína LIGHT já foi bem descrito. Linfócitos T ativados e co-estimulados pela via HVEM-LIGHT produzem citocinas que direcionam a resposta para o tipo Th1 (T-helper 1) como, por exemplo, o IFN- γ e o GM-CSF. Quando o gene que codifica para a proteína LIGHT é deletado em modelo murino são observados níveis mais baixos de secreção de IFN- γ . Por outro lado, a expressão constitutiva de LIGHT em camundongos transgênicos resultou em profundas alterações inflamatórias e um aumento da atividade de citocinas do tipo Th-1 em linfócitos T (GRANGER e RICKERT, 2003). O papel dessa proteína na estimulação de processos inflamatórios e na estimulação de células T também foi recentemente elucidado através de um estudo com tumores transfectados com LIGHT. Os tumores estimularam a inflamação do tecido adjacente e a proliferação de células T via HVEM (MURPHY et al., 2006). Portanto, a expressão da proteína LIGHT e sua interação com receptores HVEM aumentam a ativação de linfócitos T citotóxicos resultando em um combate preciso a tumores.

Além de moléculas estimuladoras, moléculas inibidoras, como o BTLA (B and T lymphocyte attenuator) e o CD160 também interagem com o receptor HVEM e

suprimem a ativação de células T (CROFT, 2005). O papel inibitório de BTLA em células T é bem conhecido através de estudos de transplantes. Normalmente, camundongos C57BL/6 toleram aloenxertos cardíacos por mais de 100 dias. Entretanto, camundongos deficientes na expressão de BTLA rejeitam rapidamente o enxerto, o que indica que o BTLA é predominantemente um inibidor de respostas imunológicas (MURPHY et al., 2006).

O HVEM contém três domínios ricos em cisteína (CRD's) comuns aos membros da família TNFR. A estrutura cristalina do complexo gD e HVEM e experimentos de mutagênese mostram que o sítio de ligação da glicoproteína D está presente no CRD1, enquanto o CRD2 apresenta um domínio estrutural de suporte para que a ligação ocorra no CRD1 (CONNOLLY et al., 2002). Gonzalez e colaboradores (2005) demonstraram que os sítios de ligação da gD e das moléculas estimulatórias linfotoxinas α e LIGHT estão posicionados em lados opostos no receptor e não se sobrepõem. Porém, mostraram que BTLA parece competir pelo mesmo sítio de ligação da gD. A hipótese foi comprovada com a utilização de um peptídeo (BP-2) capaz de bloquear a ligação gD-HVEM. A mesma concentração de BP-2 que inibiu a ligação da gD ao HVEM também foi capaz de inibir a ligação de BTLA ao HVEM. E mais diretamente, utilizando uma forma recombinante da gD (Δ 290-299), os autores conseguiram demonstrar o bloqueio da ligação de BTLA ao receptor HVEM pela proteína.



LASARO (2008)

Figura 1 - Modelo estrutural do HVEM humano ligado ao BTLA (A) e à gD do HSV-1 (B). O HVEM está representado em vermelho e o BTLA e a gD estão representados em azul.

O uso da proteína quimérica gD/antígeno tem a vantagem de não interromper de modo sistêmico os sinais inibitórios mediados por BTLA ao sistema imune. Lasaro e colaboradores (2008) analisaram o efeito localizado de uma vacina de DNA que codifica para uma proteína híbrida (gD/antígeno) através da inoculação de dois vetores adenovirais que expressavam a gD e o antígeno, em sítios anatômicos distantes. Os autores não observaram um aumento de respostas de linfócitos T CD8+ antígeno-específico, sugerindo que a inibição é restrita ao local da apresentação do antígeno.

Esses dados são de extrema importância quando se tem uma estratégia vacinal que emprega a glicoproteína D de HSV como potencial adjuvante. Espera-se que a gD, inoculada na forma de proteína híbrida gDE7, compita com o BTLA pelo receptor HVEM e conseqüentemente, promova um aumento de respostas inflamatórias e ativação de células T CD8+ nas imediações do tumor, através da sinalização favorecida de LIGHT. Vale lembrar que a proteína E7 do HPV foi fusionada ao aminoácido 244 da gD, distante do sítio de ligação ao receptor HVEM.

Para se testar as propriedades profiláticas e terapêuticas de vacinas contra o câncer induzido pelo HPV, o modelo tumoral para experimentação animal desenvolvido pelo grupo do Professor T.C. Wu do Instituto Johns Hopkins (EUA) é amplamente utilizado. Esse modelo consiste de células primárias de pulmão de

camundongos C57BL/6 imortalizadas pela oncoproteínas E6 e E7 do HPV-16 e transformadas com uma cópia do oncogene *ras* mutado e ativado. Essa linhagem celular mimetiza a progressão natural de tumores cervicais nos quais as oncoproteínas E6 e E7 do HPV-16 imortalizam as células e mutações adicionais conferem a elas um potencial metastático. (LIN et al., 1996). Portanto, esta linhagem tumoral é concebida como um excelente modelo para análise das propriedades de vacinas contra tumores cervicais e é utilizado por grandes grupos de pesquisa da área.

Tendo em vista essas informações, investigamos o poder profilático e terapêutico da proteína E7 fusionada à gD em modelo murino de crescimento tumoral. Para isto, utilizamos a proteína recombinante purificada a partir de sistema procariótico. A proteína foi testada na forma de vacina de subunidade para avaliação dos efeitos profiláticos e terapêuticos contra tumores induzidos pelo HPV-16.

2 OBJETIVO

O trabalho teve como objetivo principal gerar uma formulação vacinal baseada em proteína purificada constituída pela oncoproteína E7 do HPV-16 fusionada à glicoproteína D do HSV-1. Pretendeu-se avaliar a formulação quanto à indução de respostas imunológicas específicas e à capacidade de proteção e regressão de tumores causados pela administração de células TC-1. Para que tal vacina fosse analisada tornou-se necessário obter tanto a proteína gD como a proteína híbrida gDE7 em sistema de expressão bacteriano e de baculovírus/células de inseto.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Expressão das proteínas recombinantes gD e gDE7 em sistema bacteriano

3.1.1 Linhagens bacterianas e condições de cultivo

As linhagens de *E.coli* utilizadas nos experimentos de clonagem e expressão das proteínas gD e gDE7 foram DH5 α e BL21(DE3), respectivamente. Para todos os ensaios realizados as linhagens bacterianas foram cultivadas em meio Luria Broth (LB) (1% triptona, 0.5% extrato de levedura, 171 mM NaCl, pH 7.0) por um período de aproximadamente 18h a 37 °C sob agitação intensa (200 rpm) em agitador orbital. As linhagens recombinantes foram rotineiramente cultivadas em meio LB suplementado com canamicina (50 μ g/mL) ou ampicilina (100 μ g/mL) dependendo do vetor albergado.

3.1.2 Amplificação dos genes das proteínas gD e gDE7

Os genes que codificam para as proteínas gD e gDE7 foram amplificados por PCR utilizando iniciadores específicos (**Tabela 1**) sintetizados a partir da seqüência do gene da proteína gD depositada no banco do NCBI ([L09242](#)). O iniciador FwBamHlgD alinha-se imediatamente após o término da seqüência sinal da gD/gDE7 presentes nos vetores pRE4/pRE4E7 respectivamente (LASARO et al., 2005), enquanto o iniciador RvXholgD alinha-se imediatamente antes da região de ancoramento à membrana da gD/gDE7 em sentido reverso, de forma a gerar os fragmentos sem seqüência sinal e sem a região transmembrana em relação à seqüência original da gD. As reações de amplificação foram preparadas para um volume final de 50 μ L e continham 1 μ L de DNA (aproximadamente 30ng), 10 pmoles de cada um dos respectivos iniciadores Fw e Rv, 2,5 mM de MgSO₄, 10 mM de deoxinucleotídeos trifosfatados, 2,5 U da enzima "Taq DNA Polymerase (recombinante)" e seu respectivo tampão na concentração final de 1x (Fermentas). O programa de PCR utilizado envolve um passo de desnaturação inicial a 94 °C por 1 minuto, seguido de 30 ciclos de 45 seg a 95 °C, 90 seg a 62 °C e 60 seg a 72 °C, com um passo final de extensão de 5 minutos a 72 °C. Os produtos da reação foram

analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/v) e corados com brometo de etídeo 0,1% (v/v).

Tabela 1 - Sequências dos iniciadores utilizados para a clonagem dos genes da gD e gDE7 em sistema bacteriano de expressão.

Iniciadores	Seqüência
Fw Bam HI gD	5' TCG TCA TAG TGG GAT CCC ATG GGG GT 3'
Rv Xho I gD	5' TCA GCT CGA GGT TGT TCG GGG TG 3'

3.1.3 Clonagem dos genes gD e gDE7 no vetor pGEM-T Easy (Promega)

Fragmentos de DNA de aproximadamente 1 kb (gD) e 1.2kb (gDE7) obtidos na reação de PCR foram purificados utilizando-se o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) conforme instruções do fabricante. Para a reação de ligação foram utilizados 3 µL do produto purificado da PCR e 1 µL do vetor pGEM-T Easy (razão molar inserto/vetor 3:1), conforme instruções do fabricante. A mistura de ligação foi utilizada na transformação de células DH5α quimiocompetentes (*E. coli* K12), pelo método de choque térmico. Os transformantes foram confirmados por análise de restrição do plasmídeo. Os plasmídeos foram extraídos pelo método de lise alcalina e submetido a tratamento com as endonucleases de restrição *Bam*HI e *Xho*I (Fermentas) de acordo com as orientações do fabricante. Os perfis de restrição foram visualizados em gel de agarose 0,8% (m/v). Os plasmídeos recombinantes contendo os genes das proteínas gD e gDE7 foram denominados pGEMgD e pGEMgDE7.

3.1.4 Extração de DNA plasmideal por lise alcalina

Este método baseia-se no protocolo descrito por Sambrook e Russell (2001). Uma colônia bacteriana foi inoculada em 5 mL de LB sob pressão seletiva por aproximadamente 18h a 37 °C em agitador orbital. Uma alíquota de 1 mL deste inóculo foi submetida à centrifugação por 5 minutos a 10000 x g e 4 °C. Após descarte do sobrenadante as células precipitadas foram ressuspensas em 150µL

de uma solução contendo 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA pH 8,0 e 10 µg/mL RNase. Acrescentou-se a essa mistura 150µL de solução de lise (200 mM NaOH e 1% SDS) e o microtubo foi invertido gentilmente (7x). A reação foi neutralizada com 150 µL de solução contendo 3M acetato de potássio pH 5,5. O material foi tratado com 450 µL de solução tampão de fenol/clorofórmio e centrifugado por 15 minutos a 4 °C e 10000 x g. A fase aquosa foi acondicionada em microtubo novo e o DNA precipitado com 1 volume de isopropanol, lavado com água pura e precipitado novamente com PEG-NaCl por uma hora a -20 °C. O material foi centrifugado a 4 °C e 10000 x g por 10 minutos, lavado com 2 volumes de etanol 70% gelado e seco a vácuo. O DNA foi ressuscitado em 30 µL de água milli-Q e submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/v) e corado com solução de brometo de etídeo 0,01% (v/v).

3.1.5 Transformação bacteriana por choque térmico

Alíquotas de 100 µL de células bacterianas quimiocompetentes (*E. coli* K12 DH5α) foram preparadas conforme protocolo descrito por Sambrook e Russel (2001) e então são acrescidas de 20 µL de reação de ligação e colocadas em banho de gelo por 30 minutos. Após esse período as alíquotas foram incubadas em banho-maria a 42 °C por dois minutos e novamente em banho de gelo por mais 10 minutos. Imediatamente após o choque térmico foram acrescentados 880 µL de meio LB à alíquota e as células transformadas foram recuperadas por 1h a 37 °C sob baixa agitação (80 rpm) em agitador orbital. Volumes de 100 µL e 900 µL da transformação foram semeados em placas de meio LB sólido (triptona 1%, NaCl 1%, extrato de levedura 0,5%, ágar 2%) contendo ampicilina (100 µg/mL). As placas foram incubadas em estufa a 37 °C durante aproximadamente 18 horas até o aparecimento de colônias.

3.1.6 Subclonagem dos genes gD e gDE7 em vetor de expressão pET28a (Novagen)

Os genes gD e gDE7 clonados no vetor pGEM - T Easy foram retirados deste plasmídeo com as endonucleases de restrição *Bam HI* e *Xho I* (Fermentas) de acordo com as orientações dos fabricantes. O vetor de expressão pET28a foi preparado para abrigar os fragmentos de DNA por meio de uma dupla digestão com as mesmas endonucleases *Bam HI* e *Xho I* (Fermentas), de modo a permitir uma clonagem forçada dos dois genes neste vetor. Os produtos das digestões foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v) e corados com brometo de etídio. As bandas contendo os fragmentos duplamente digeridos e com a massa molecular esperada foram eluídas do gel utilizando-se o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) conforme instruções do fabricante. Para a reação de ligação foi utilizada a razão molar inserto/vetor de 4:1 e as condições da reação seguiram as instruções do fabricante para o uso da T4 DNA ligase (Fermentas). Uma alíquota de 20 µL da reação de ligação foi utilizada na transformação de células de *E. coli* DH5α quimiocompetentes conforme descrito anteriormente. Os clones foram confirmados pela análise de restrição do plasmídeo extraído pelo método de lise alcalina com posterior visualização dos perfis de restrição em gel de agarose 0,8% (p/v), por seqüenciamento e pela análise da expressão das proteínas *in vitro*. Os plasmídeos contendo os genes clonados sob controle do promotor T7 do vetor foram denominados pETgD e pETgDE7 (Figura 2).

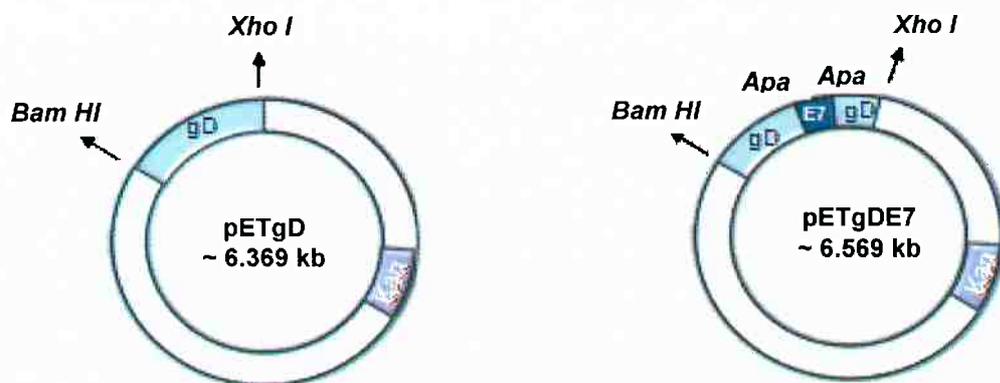


Figura 2 – Representação esquemática dos vetores de expressão pETgD e pETgDE7.

3.1.7 Seqüenciamento dos genes gD e gDE7 clonados no plasmídeo pET28a

As seqüências completas dos genes gD e gDE7 clonados nos plasmídeos pETgD e pETgDE7 foram confirmadas pela técnica de interrupção de síntese com dideoxynucleotídeos marcados com fluorocromos. Utilizou-se seqüenciador automático (“Automated capillary DNA sequencer” ABI 3100, Perkin-Elmer Applied Biosystems) disponível no Instituto de Química da USP e reagentes disponíveis comercialmente como o kit “BigDye™ terminator DNA sequencing – 2.0” (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Warrington, England). Os iniciadores utilizados para as reações de seqüenciamento foram Fw BamHI gD e Rv XhoI gD, empregados também na amplificação inicial dos genes, e de outros 3 oligonucleotídeos específicos denominados:

Fw pET T7: 5' TAA TAC GAC TCA CTA TA 3'

E7 Fw Apal : 5' CAG CTG **GGC CCA** TGC ATG GAG ATA CAG 3'

E7 Rv Apal: 5' **CCC GGG** CTG GTT TCT GAG AAC AGA TGG GGC 3'

Os vetores pETgD e pETgDE7 foram purificados por meio do kit Perfectprep® Plasmid Mini (Eppendorf) e utilizados como molde nas reações de seqüenciamento. As reações de seqüenciamento foram montadas para um volume final de 10 µL e continham 3 µL (aproximadamente 150 ng) dos vetores purificados, 3,2 pmoles de iniciador, 1 µL de tampão de reação “Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction” (Applied Biosystems), 2 µL de tampão de reação “Save Money” (1 mL de Tris 2 M; 30 µL de MgCl₂ 1 M, água milli-Q q.s.p. 10 mL) e 3 µL de água milli-Q esterilizada. O programa de PCR utilizado no seqüenciamento consistiu de 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por 10 seg, um passo de anelamento a 52 °C por 20 seg e um passo final de extensão de 4 minutos a 60 °C. Após o término das reações, o DNA obtido foi precipitado com Isopropanol/Etanol conforme instruções da Applied Biosystems. As seqüências de nucleotídeos obtidas foram editadas e montadas em uma seqüência contígua com o programa LASERGENE (DNASTAR, Inc., Madison, WI, USA).

3.1.8 Análise da expressão *in vitro* das proteínas recombinantes gD e gDE7

Para os ensaios de expressão *in vitro* da gD e gDE7 foram utilizadas quatro linhagens de *E. coli* capazes de expressar proteínas recombinantes sob controle do promotor derivado do fago T7, induzível por IPTG, presente no vetor de expressão pET28a. As linhagens utilizadas estão descritas na **tabela 2**. As linhagens recombinantes foram crescidas por aproximadamente 18h em meio LB suplementado com canamicina. Este pré-inóculo foi utilizado como inóculos com diluição inicial de 1:100, feitos em meio LB, e mantidos a 37 °C sob agitação (200 rpm) até a fase de crescimento exponencial (DO_{600nm} 0,5 – 0,8) quando se acrescentou às culturas o indutor IPTG na concentração final de 0,1 mM. Foram retiradas amostras para análise antes da adição de IPTG (cultura não induzida) e após o período de 3 horas de incubação (culturas induzidas). As amostras recolhidas foram centrifugadas a 8000 x g por 5 minutos, descartou-se o sobrenadante, o material foi dissolvido em tampão de amostra para eletroforese em gel de poliacrilamida e incubado a 100 °C por 5 minutos. Quantidades semelhantes de células foram aplicadas por poço e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (15%). Após o término da corrida o gel foi corado com Comassie Blue conforme descrito por Sambrook e Russell (2001).

Tabela 2 - Características das linhagens bacterianas utilizadas em ensaios de expressão das proteínas gD e gDE7.

Linhagem de <i>E. coli</i>	Características	Vantagens	Resistência
BL21 (DE3)	Deficiente nas proteases <i>lon</i> e <i>ompT</i>	Hospedeira comum para expressão	-
BL21(DE3) star	RnaseE mutante (<i>rne131</i>)	Hospedeira comum para expressão; redução de degradação de mRNA	-
BL21(DE3) pLysS	Deficiente nas proteases <i>lon</i> e <i>ompT</i>	Hospedeira comum para expressão; alta especificidade	Cam
BL21(DE3) codon plus RP	Deficiente nas proteases <i>lon</i> e <i>ompT</i> ; contém o plasmídeo que codifica <i>argU</i> e <i>proL</i>	Hospedeira comum para expressão; permite a expressão de genes que apresentam códons raros para arginina AGA e AGG e prolina CCC	Cam

3.1.9 Determinação da solubilidade e purificação das proteínas gD e gDE7 expressas em sistema bacteriano

Os procedimentos para purificação basearam-se em protocolos previamente padronizados no CEVAT-GENE para produção e purificação de proteínas recombinantes. As etapas necessárias à purificação das proteínas recombinantes incluem: preparação da cultura, extração das proteínas recombinantes e cromatografia de afinidade em coluna de níquel. Uma colônia da linhagem BL21(DE3) abrigando os vetores pETgD ou pETgDE7 foram inoculadas em 50 mL de meio LB suplementado com canamicina. A cultura foi incubada a 37 °C sob agitação (200 rpm) em agitador orbital por aproximadamente 18 horas. Esta cultura foi utilizada como inóculo com diluição inicial de 1:100 para 1 L de LB (acondicionado em erlenmeyer com capacidade de 3L) e incubado a 37 °C, 200 rpm em agitador orbital até a fase de crescimento exponencial ($DO_{600nm}=0,5 - 0,8$) quando adicionou-se à cultura o indutor IPTG na concentração final de 0,1 mM. A cultura induzida foi mantida por um período de 3 horas. Após o período de indução a cultura foi centrifugada a 10000xg por 15 minutos a 4 °C.

Para a extração das proteínas gD e gDE7, os sedimentos bacterianos foram ressuspensos em 10% do volume original de cultura em tampão A (Tris 100 mM; NaCl 500 mM; pH 7,5) acrescido de inibidor de proteases PMSF (phenylmethylsulphonyl fluoride) a uma concentração final de 1 mM e mantido em banho de gelo durante 30 minutos. Após esse período acrescentou-se 0,03% de SDS aos tampões e as células foram rompidas em homogeneizador (APLAB 10 – ARTEPEÇAS, Brasil) ou por sonicação por ultra-som a 40% de amplitude (dois ciclos de seis pulsos, com 15 segundos de duração e intervalos de 20 segundos entre os pulsos) em sonicador digital (Branson – VWR Scientific). A fração solúvel foi separada da fração insolúvel por centrifugação a 10000 x g por 30 min a 4 °C. As frações insolúveis das culturas foram submetidas à solubilização com tampão A acrescido de uréia a 8 M “overnight” (uréia 8 M, Tris 100 mM; NaCl 500 mM; pH 9,0 para solubilização da fração insolúvel contendo a proteína gD e uréia 8M, Tris 100 mM; NaCl 500 mM; pH 7,5 para a solubilização da fração insolúvel contendo a proteína gDE7). Os extratos obtidos foram submetidos à filtração em membrana filtrante (diâmetro dos poros: 0,22 µm) da marca Millipore e aplicados à coluna de cromatografia de afinidade ao níquel.

As proteínas gD e gDE7 recombinantes produzidas pela linhagem BL21(DE3) foram purificadas por cromatografia de afinidade em coluna niquelada (His Trap 1mL, GE) em função da ligação específica da cauda de histidina ao metal. O processo de purificação automatizado fez uso de aparelho AKTA – FPLC existente no laboratório. A eluição das proteínas foi realizada pelo aumento gradual da concentração de imidazol (uréia 8 M; Tris 100 mM; NaCl 500 mM; imidazol 1 M; pH 9,0 para a eluição da proteína gD e uréia 8 M; Tris 100 mM; NaCl 500 mM; 1 M imidazol; pH 7,5 para a eluição da proteína gDE7). As proteínas eluídas foram dialisadas contra água destilada ou PBS em membranas de diálise para a retirada da uréia dessas amostras. As amostras foram quantificadas em SDS-PAGE 15% e por espectrofotometria a 280 nm, segundo Edelhoch (1967).

3.1.10 Refolding das proteínas expressas no extrato insolúvel de *E. coli*

O processo de *refolding* das proteínas procedeu a purificação retirando gradualmente o agente desnaturante através de tampões com concentrações

decrecentes de uréia. Para a gD utilizamos os seguintes tampões: uréia 4 M Tris 100 mM NaCl 500 mM pH 9,0; uréia 2 M Tris 100 mM NaCl 500 mM pH 9,0; uréia 1 M Tris 100mM NaCl 500 mM pH 9,0 e Tris 100 mM NaCl 500 mM pH 9,0. Para o *refolding* da proteína gDE7 utilizamos os tampões: uréia 4 M Tris 100 mM NaCl 500 mM pH 7,5; uréia 2 M Tris 100 mM NaCl 500 mM pH 7,5; uréia 1 M Tris 100 mM NaCl 500 mM pH 7,5 e Tris 100 mM NaCl 500 mM pH 7,5. O processo de *refolding* de ambas proteínas ocorreu em aparelho de filtração tangencial (Millipore LabScale TFF System) com membranas Pellicon (Millipore) de corte de 30K.

3.1.11 Imunodeteção das proteínas recombinantes gD e gDE7

Extratos protéicos das culturas não induzida e induzida e as proteínas gD e gDE7 purificadas foram separadas por eletroforese (SDS-PAGE 15%) e transferidos para membrana de nitrocelulose (Hybond-C Extra Amershan) em solução de transferência (39 mM de glicina, 20% de metanol, 0,0375% de SDS, 48 mM de Tris-HCl) durante 1 hora com corrente aplicada de 30 milliamperes. Os sítios não específicos de ligação do anticorpo à nitrocelulose foram bloqueados com solução de PBS acrescido de 0,05% de Tween (PBST) e 5% de leite desnatado. Após 12 horas de incubação a 4 °C a membrana foi lavada 3 vezes com PBST durante 5 minutos para cada lavagem. A seguir, a membrana foi incubada por 90 minutos, em agitação, com o anticorpo α -gD (DL-6, 1D3) a uma diluição de 1:20.000 em solução bloqueadora. A membrana foi lavada conforme descrito anteriormente e incubada com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo (1:5.000) conjugado à peroxidase (Sigma) durante 90 minutos com agitação. Após esse período a membrana foi lavada em PBST 3 vezes (5 minutos cada lavagem), Para revelação por quimioluminescência, o reagente de revelação do kit ECL (Pierce) (luminol) foi colocado sobre a membrana, de acordo com as instruções do fabricante. A membrana foi depositada em cassete fotográfico e exposta a filme fotográfico (X-OMAT AR, Kodak) durante 1 minuto. A revelação foi feita em câmara escura e o filme revelado com revelador fotográfico (GBX, Kodak).

3.1.12 Diálise das proteínas insolúveis

Alíquotas de aproximadamente 20 mL das proteínas gD e gDE7 purificadas foram dialisadas contra 8 litros de água destilada ou PBS para a remoção da uréia em membranas de diálise com ponto de corte de MWCO 12 – 14,000 da SPECTRA/POR (Spectrum Laboratories, Inc.)

3.1.13 Animais utilizados

Camundongos machos da linhagem C57BL6 com idade entre 8 a 10 semanas foram fornecidos pelo biotério do Departamento de Parasitologia, do Instituto de Ciências Biomédicas II da Universidade de São Paulo (São Paulo – SP). Os animais foram mantidos em condições padronizadas, tiveram ração autoclavada e receberam suplementação nutricional com Vitagold®. Os protocolos de experimentação foram devidamente analisados e aprovados pela comissão de ética em experimentação animal (CEEA) de maneira prévia á condução dos experimentos e seguem os padrões propostos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

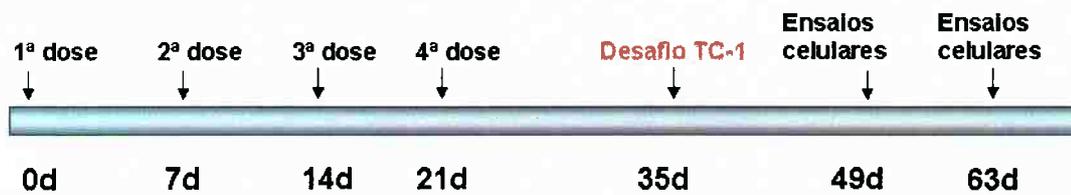
3.1.14 Protocolo de imunização

As proteínas recombinantes foram administradas em quatro doses com intervalos de sete dias pela via subcutânea (**Figura 3**). As doses foram preparadas com as proteínas gD e gDE7 purificadas e dialisadas contra PBS, ressuspensas em PBS estéril em um volume final de 100 µL e inoculados na região do flanco inferior. No caso das proteínas insolúveis, antes da administração nos animais, as formulações vacinais foram aquecidas a 100 °C para a completa desnaturação das proteínas recombinantes. Os grupos experimentais foram assim definidos: grupo PBS, grupo gD (10 µg), grupo gDE7 (30 µg), grupo gD+E7 (10 µg+10 µg) e grupo E7 (10 µg). A proteína de fusão foi administrada em doses de 30 µg já que seu peso molecular corresponde em três vezes mais ao peso molecular do antígeno E7. A proteína E7 utilizada como antígeno neste trabalho foi produzida em nosso

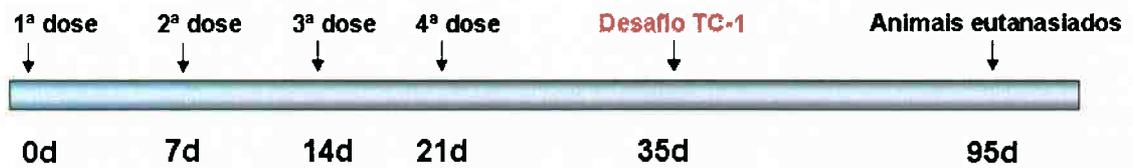
laboratório e corresponde aos 60 primeiros aminoácidos da proteína nativa onde o epítipo CD8 específico encontra-se preservado.

A

Análise da resposta



Análise da proteção



B

Análise da proteção

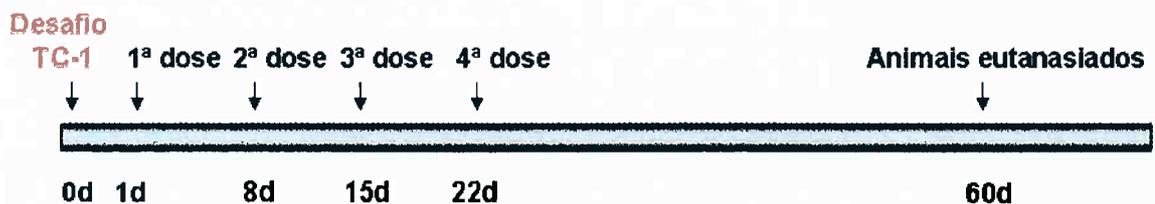


Figura 3 – Esquema de imunização profilática (A) e terapêutica (B) e análise de proteção para o crescimento de tumores.

3.1.15 Ensaios de desafio com células TC-1

Os camundongos submetidos ao protocolo vacinal profilático ou terapêutico foram desafiados com a linhagem tumoral TC-1. As células, cultivadas em garrafas de plástico (TTP), foram lavadas duas vezes com PBS pH 7.4 e em seguida tratadas com Tripsina EDTA (CultLab). A seguir, as células foram ressuspensas em meio DMEM contendo 10% de soro fetal bovino e coletadas em frascos de tipo Falcon de 15mL. Em seguida foram centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos, sendo o precipitado de células ressuspensas em meio DMEM sem soro fetal bovino. A concentração celular foi determinada em câmara de "Newbauer". Dessa suspensão de células, inoculou-se $7,5 \times 10^4$ células TC-1 em um volume final de 100 μ L por animal. O inóculo foi realizado no dorso de camundongos C57BL/6.

3.1.16 Coleta e processamento das amostras

A sangria dos camundongos foi realizada com punção na região lateral da boca. Para fins comparativos foram também coletados sangue de animais não imunizados (pré-imune). Nos esquemas de imunização profilática, dez animais de cada grupo foram destinados a ensaios de desafio com células TC-1 e análise de sobrevivência, e outros cinco foram destinados para análise de resposta. Os baços foram retirados em condições assépticas, macerados e lavados com solução de Ack Lising Buffer (BioSource International) para lise de hemácias. Ressuspensas em meio RPMI (Gibco-BRL) com 1% de soro fetal bovino, foram contadas em câmara de "NewBauer" em Azul de Tripán (1:10). No esquema terapêutico, utilizamos dez animais por grupo para análise de sobrevivência após desafio com TC-1.

3.1.17 Intracellular Cytokine Staining (ICS)

Placas de fundo côncavo (Nunc) receberam 10^6 células do baço ou do sangue por poço que foram incubadas por 6 horas a 37 °C 5% CO₂ na presença de Brefeldin A (GolgiPlug; BD Pharmingen) e do peptídeo E7 CD8 específico (aminoácidos 49-57; RAHYNIVTF) (CHEN et al., 2003; PENG et al., 2004; FELTKAMP et al., 1993). Como controle sem estímulo, as células receberam o mesmo volume de meio

DMEM sem o peptídeo. Após este período as células foram incubadas por 30 minutos a 4 °C com anticorpo anti-CD8 conjugado com FITC (BD PharMingen). Após a permeabilização com Saponina por 20 minutos a 4 °C, as células foram tratadas com anticorpo anti-IFN- γ conjugado à ficoeritrina (PE) (BD PharMingen) por 30 minutos a 4 °C. As células foram ressuspensas em PBS e examinadas por citometria de fluxo utilizando o aparelho FACScalibur (BD Bioscience). Os dados foram analisados pelo programa FlowJo para a determinação das porcentagens de células INF- γ +/CD8⁺ sobre o total de células CD8⁺.

3.1.18 ELISPOT

Células do baço de animais imunizados foram submetidas a ensaios de ELISPOT (Enzyme-Linked immunospot assay) para quantificação de células do baço secretoras de IFN- γ . Para isso, placas Maxisorp de 96 poços (Nunc) foram sensibilizadas com anticorpos anti- IFN- γ de camundongo na diluição de 1:100 em PBS e incubadas a 4 °C *overnight*. Após lavagens com PBS pH 7.2, as placas foram bloqueadas com BSA 10%. Foram plaqueadas 5×10^5 células por poço, com ou sem o estímulo (peptídeo E7), e incubadas a 37 °C numa atmosfera de 5% do CO₂ por no mínimo 24 e máximo 30 horas. Utilizou-se como controle positivo Concanavalina A (Merck inc.). As placas foram lavadas com PBS e anticorpos anti-IFN- γ de camundongos conjugados com biotina foram incubados numa concentração de 1:250 em PBS-Tween (PBS-T) a 4 °C durante 18 horas. Em seguida, as placas foram lavadas três vezes com PBS-Tween e incubadas com streptoavidina conjugada à fosfatase alcalina (Sigma) diluída em PBS-T a 1:800 por 3 horas a 37 °C. Em paralelo, preparou-se a solução reveladora (11 mg DAB, 11 mL Tris-HCl 50 mM pH 7,5). Após lavagens com PBS-Tween, foi adicionada às placas a solução reveladora, deixando-as em temperatura ambiente e sob abrigo da luz, durante 20 minutos. Após lavagens com água corrente as placas foram secas à temperatura ambiente e a contagem dos pontos (spots) foi feita com auxílio de uma lupa.

3.1.19 ELISA

Os ensaios de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) foram realizados com 250 ng da gD ou da E7 purificadas dispostas em placas MaxiSorp ou PolySorp (Nunc) respectivamente. Após incubação de 12 horas a 4 °C, as placas foram lavadas com PBS-Tween 0,05% (PBS-T) e bloqueadas com leite a 5% em PBS-T. Em seguida, incubou-se as placas com soros provenientes dos animais imunizados na diluição inicial de 1:500 para IgG anti-gD e 1:25 para IgG anti-E7, durante 1 hora a 37 °C. Anticorpos anti-IgG de camundongo conjugados à peroxidase foram diluídos em PBS-T leite na concentração de 1:3000 e incubados nas placas previamente lavadas com PBS-Tween 0,05%. A presença de anticorpos ligados aos antígenos foi visualizada com a solução de revelação (12,5 mL de tampão Citrato-Fosfato 33 mM, pH 5.0; 5 mg de O-Fenilenodiaminadihidroclorato [OPD], e 5 µL de H₂O₂) por 15 minutos no escuro a temperatura ambiente. A reação foi interrompida com 50µL por poço de H₂SO₄ 9 N. As densidades óticas das reações foram determinadas a 492 nm em leitor de ELISA modelo MultiScan EX (Labsystems).

3.1.20 Citotoxicidade *in vivo* por linfócitos T CD8+

O ensaio de citotoxicidade *in vivo* foi realizado para verificar a presença de células T CD8+ citotóxicas específicas para o peptídeo E7 (RAHYNIVTF) em animais imunizados, de acordo com metodologia descrita por BARBER et al., 2003. Após 15 ou 30 dias do desafio, um grupo de animais não imunizados foi submetido à eutanásia, seus baços foram retirados e processados como já descrito. As células foram incubadas com 0,5 µM ou 5 µM de CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester, Invitrogen) em PBS, por 15 minutos a 37 °C. Após a incubação, as células foram lavadas e ressuspensas em meio RPMI acrescido de 1% de soro fetal bovino (RPMI 1%). Ao tubo contendo a população de células marcadas com 5 µM de CFSE foi adicionado 2,5 µg/mL do peptídeo E7 e incubado por 40 minutos a 37 °C. Após esse período, as células foram lavadas com meio RPMI 1% para a remoção do peptídeo não ligado e, em seguida, contadas. Quantidades iguais das duas populações de células marcadas foram misturadas e centrifugadas a 1.500 rpm. O sedimento de células foi ressuspensado em RPMI de modo a conter 2-4x 10⁷

células/100 μ L e injetado nos animais imunizados pela via do plexo retro orbital. No dia seguinte, todos os animais foram submetidos à eutanásia e os esplenócitos coletados. As células foram lavadas 3x com PBS 1X contendo soro fetal bovino a 1% (PBS 1%), ressuspensas em 400 μ L de PBS 1% e examinadas por citometria de fluxo. Os dados foram analisados para a determinação das porcentagens de células marcadas com 0,5 μ M ou 5 μ M de CFSE pelo programa "FlowJo".

3.1.21 ELISA de citocinas

Para avaliação da produção de citocinas frente a um re-estímulo *in vitro*, os animais foram submetidos à eutanásia após 15 dias do desafio com TC-1 e seus baços foram coletados para a obtenção dos esplenócitos. Os baços foram macerados em 5 mL de RPMI 1% e as células foram centrifugadas a 1.500 rpm e lavadas com RPMI 1%. Depois estas células foram tratadas com ACK (1 mL/baço) para a remoção das hemácias e novamente lavadas com RPMI 1%. As células foram contadas em câmara de Neubauer e 1×10^7 células/mL foram incubadas em estufa de CO₂ a 37 °C com a presença ou ausência de 1,5 μ g de peptídeo E7 durante 72 horas. Em seguida, as amostras foram coletadas e centrifugadas e os sobrenadantes coletados e estocados a -80 °C até serem usados para a dosagem das citocinas por ELISA. O ELISA foi realizado segundo protocolo descrito pelo fabricante (BD Biosciences).

3.1.22 Ensaio de neutralização viral (HSV-1)

Para a realização de ensaios de neutralização do HSV-1 utilizamos a cepa F gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Marco Antônio da Silva Campos da FIOCRUZ – MG e Profa. Dra. Erna Kroon da Universidade Federal de Minas Gerais. O vírus foi encubado por uma hora com cada um dos *pools* (diluição de 1:20) a 37 °C e então foi colocado em contato com células Vero a 80% de confluência para ocorrer a infecção. Após aproximadamente 65 horas de infecção, as células foram fixadas com formaldeído a 10% e coradas com cristal violeta para possibilitar a contagem das placas virais. As amostras de soros foram consideradas neutralizantes quando o

número de placas virais foi reduzido em 50% em relação ao controle somente infectado com o vírus.

3.1.23 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com o teste *t* de Student para comparações de médias. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados como indicativo de relevância estatística.

3.2 Construção dos vetores baculovirais e expressão das proteínas gD e gDE7 em células de inseto

3.2.1 Linhagens bacterianas e condições de cultivo

A linhagem de *E. coli* DH5 α foi utilizada nos experimentos de clonagem dos genes gD e gDE7. Para todos os ensaios realizados, as linhagens bacterianas foram cultivadas em meio Luria Broth (LB) (1% triptona, 0.5% extrato de levedura, 171 mM NaCl, pH 7.0) por um período de aproximadamente 18h a 37 °C sob agitação intensa (200 rpm) em agitador orbital. As linhagens recombinantes foram rotineiramente cultivadas em meio LB suplementado com ampicilina (100 μ g/mL).

3.2.2 Vetores de transferência

Os genes que codificam para as proteínas gD e gDE7 foram amplificados por PCR utilizando-se iniciadores específicos (**Tabela 3**) sintetizados a partir da seqüência do gene que codifica para a proteína gD depositada no banco do NCBI ([L09242](#)). O iniciador FwgD alinha-se imediatamente na região iniciadora do gene da gD/gDE7 enquanto o iniciador gDAnc alinha-se imediatamente antes da região de ancoramento á membrana da gD/gDE7 em sentido reverso, de forma a gerar os fragmentos sem a região transmembrana em relação à seqüência original da gD. Os vetores de transferência TOPOgD e TOPOgDE7 foram gerados a partir da amplificação dos genes gD e gDE7 oriundos do vetor pRE4 e pRE4E7 (LASARO et al., 2005) e clonados no vetor TOPO® (Invitrogen) que adiciona às seqüências seis aminoácidos de histidina (His-tag) para facilitar o processo de purificação dessas proteínas. As clonagens dos fragmentos no vetor TOPO® foram realizadas de acordo com as instruções do manual do kit pBlueBac 4.5/V5-His TOPO® TA da Invitrogen®. As reações de amplificação foram preparadas para um volume final de 50 μ L e continham 1 μ L de DNA (aproximadamente 30ng), 5 pmoles de cada um dos respectivos iniciadores Fw e Rv, 2,5 mM de MgSO₄, 10 mM de deoxinucleotídeos trifosfatados, 2,5 U da enzima “*Taq* DNA Polymerase (recombinante)” e seu respectivo tampão na concentração final de 1x (Fermentas). O programa de PCR utilizado envolve um passo de desnaturação a 94 °C por 2 minutos, seguido de 40

ciclos de 30 seg a 95 °C, 90 segundos a 68 °C e 2 minutos a 72 °C, com um passo final de extensão de 5 minutos a 72 °C. Os produtos da reação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/v) e corados com brometo de etídeo 0,1% (v/v).

Tabela 3 - Seqüências dos iniciadores utilizados para a clonagem dos genes da gD e gDE7 em sistema baculovírus/células de inseto.

Iniciadores	Seqüência
gDFw	5' TCC ATG GGG GGG ACT GCC GC 3'
gDAnc	5' GTG GTT GTT CGG GGT GGC CG 3'

3.2.3 Cultivo e manutenção da linhagem celular Sf9

Trabalhamos com a linhagem de células de inseto Sf-9 cultivadas em meio SF900 II (GIBCO BRL) não suplementado ou meio Grace (GIBCO BRL) suplementado com soro fetal bovino. Os repiques destas células foram realizados aproximadamente de sete em sete dias. Após a retirada do meio de cultivo, foram adicionados aproximadamente 10 ml de meio e as células foram desprendidas da garrafa de cultura por pipetagem ou com raspador de células. As células foram transferidas para novas garrafas de cultura para aderir no fundo por 15 minutos. Finalizado esse período, o meio foi substituído por 12 ml de meio fresco. Os cultivos foram mantidos em estufa de demanda de oxigênio biológico (BOD) a 27 °C. Dois ou três dias após o repique, foi realizada a troca de meio de cultivo.

3.2.4 Transfecção dos vetores de transferência em células Sf-9

Para a realização deste procedimento as recomendações do Kit Bac-N-Blue (Invitrogen) foram seguidas. Garrafas de cultura de 25 cm² de área foram semeadas com 2x10⁶ células em meio Grace suplementado 24 horas antes da transfecção. Prévio à realização da transfecção, foi preparada a solução de transfecção, contendo: 4 µg dos plasmídeos de transferência, 0,5 µg do DNA linear do baculovírus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis vírus (AcNPV), 1 ml de meio

Grace sem suplementos e 20 μ L de Cellfectin®. A solução foi bem misturada e incubada a temperatura ambiente por 15 minutos. O meio de cultivo das células foi retirado e as células lavadas com meio Grace sem suplementos. Adicionou-se a solução de transfecção às garrafas de cultivo e as mesmas foram incubadas a temperatura ambiente durante 4 horas em uma plataforma oscilante (duas oscilações por minuto). Finalizado esse período, 4 ml de meio Grace suplementado foi adicionado às células e as garrafas foram incubadas a 27 °C dentro de sacos plásticos selados até a observação de efeito citopático, sendo que o meio de cultura foi trocado e coletado periodicamente.

3.2.5 Isolamento de baculovírus recombinantes mediante ensaio de placa

Os baculovírus recombinantes foram isolados mediante ensaio de placa, utilizando-se como inóculo viral a última amostra de meio obtida no passo anterior. Placas de 60 mm de diâmetro foram semeadas com células Sf9 numa densidade de 2×10^6 células em meio Grace suplementado, 24 horas antes da realização do experimento. Foram realizadas três diluições do meio de cultura contendo vírus: 1/100, 1 /1000 e 1/10.000. As diluições foram realizadas em meio Grace completo. No momento da infecção o meio de cultivo das placas foi retirado e substituído por 1 ml das diluições virais, sendo que para cada diluição foram utilizadas duas placas incubadas durante uma hora a temperatura ambiente com agitação em plataforma oscilante (duas oscilações por minuto). Finalizado o período de infecção, o inóculo viral foi retirado e adicionou-se agarose diluída em meio completo contendo o substrato cromogênico Blue-gal. As placas foram cultivadas a 27 °C em estufa BOD por 5 a 6 dias, até a formação de placas virais de coloração azul. A agarose de cada placa viral foi recolhida com pipeta Pasteur e guardada em eppendorf a 4 °C.

3.2.6 Obtenção da primeira passagem viral

Células Sf-9 foram semeadas em placas de 24 poços, numa densidade de 5×10^5 células por poço no dia prévio à realização do experimento. Em cada poço foi adicionada a agarose obtida da coleta das placas virais realizada no experimento anterior. A placa foi incubada a 27 °C em estufa BOD por 3 dias, momento em que é

retirada uma alíquota para extração de DNA baculoviral e análise por PCR. Adicionou-se mais meio a cada poço e a placa foi incubada até verificar a lise de todas as células. O meio de cultura foi retirado e guardado a 4 °C. Este meio constituiu a primeira passagem viral.

3.2.7 Extração de DNA baculoviral

As amostras de meio contendo baculovírus (750 µl) foram centrifugadas a 5000 rpm por 3 minutos para retirar detritos celulares. O sobrenadante de cada amostra foi transferido a um tubo novo e foi adicionado 750 µl de uma solução gelada de polietileno glicol 20% preparado em 1M de NaCl. A amostra foi misturada por inversão e incubada em gelo por 30 minutos. Centrifugou-se a 12000 rpm por 10 minutos a 4 °C, descartando-se o sobrenadante. O pellet viral obtido foi ressuscitado em 100 µl de água estéril, e adicionou-se 10 µl de proteinase K (10 mg/ml). A amostra foi incubada a 50 °C durante uma hora. O DNA viral foi extraído com fenol: clorofórmio (1:1) e a amostra foi centrifugada por 5 minutos a 12000 rpm a temperatura ambiente, transferindo-se a fase aquosa a um tubo novo. O DNA foi precipitado com 1/10 de volume de acetato de sódio 3M, 5 µl de glicogênio (2 mg/ml) e dois volumes de etanol absoluto. A amostra foi incubada durante uma hora a -20 °C e posteriormente centrifugada a 12000 rpm a 4 °C por 15 minutos. O pellet obtido foi lavado com etanol 70 e ressuscitado em água estéril.

3.2.8 Análise por PCR de DNA baculoviral

As amostras de DNA baculoviral obtidas no passo anterior foram analisadas por PCR. Os objetivos desta etapa são: verificar a presença dos genes de interesse nas amostras virais analisadas, assim como verificar a ausência de baculovírus não recombinantes que podiam ter surgido como subproduto na reação de recombinação nas células de inseto. Foram utilizados os iniciadores baculovirus *reverse* e polyhedrina *forward* (**Tabela 4**), com uma temperatura de anelamento de 55 °C. Os produtos da reação foram analisados em eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/v) e corados com solução de brometo de etídeo 0,01% (v/v).

Tabela 4 - Sequências dos iniciadores utilizados para a triagem dos genes da gD e gDE7 na construção dos baculovírus recombinantes.

Iniciadores	Seqüência
Polyhedrina Foward	5' AAA TGA TAA CCA TCT CGC 3'
Baculovírus Reverse	5' CAA CAA CGC ACA GAA TCT AGC 3'

3.2.9 Amplificação de estoques virais

Para a amplificação dos estoques virais, utilizamos garrafas de cultura de 25 (segunda passagem) ou 75 cm² de área (sucessivas passagens), quando as células estavam numa confluência aproximada de 50%, e que foram semeadas no dia prévio à realização da infecção. As células foram infectadas numa multiplicidade de infecção (MOI) de 1 PFU/célula e incubadas a 27 °C no escuro até a obtenção de 100% de efeito citopático (aproximadamente 10 dias). Ao final deste período, o meio de cultura foi recolhido e estocado a 4 °C no escuro.

3.2.10 Titulação dos vetores baculovirais por ensaio de placa

No dia anterior à realização do ensaio foram semeadas 10⁶ células/placa, preparando-se 12 placas para cada amostra viral titulada. Durante o ensaio são preparadas diluições dos vírus em meio completo. Um volume de 10 µl de cada amostra a estudar é diluído em 990 µl de meio Grace completo (diluição -2), e a partir desta diluição, preparou-se diluições seriadas em base 10, em meio completo, até a diluição -8. Seguidamente, o meio das placas de células foi retirado e substituído por 100 µl de cada diluição, sendo que cada diluição foi analisada por duplicata e as células foram incubadas durante uma hora a temperatura ambiente no escuro. Finalizado este período, o inóculo viral foi retirado e substituído por uma mistura (1:1) de meio completo e agarose de baixo ponto de fusão 1% preparada em água milliQ e esterilizada em autoclave. As placas foram incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente e por 5 minutos a 4 °C para permitir a solidificação da agarose. Logo após foi adicionado 1 ml de meio de cultura completo por cima da agarose e as placas foram incubadas a 27 °C em BOD durante 6 dias no escuro. No sexto dia, o meio de cultura líquido foi retirado e substituído por 1 ml de meio de

cultura completo contendo 15 µL de X-Gal (20mg/ml). As placas foram incubadas *overnight* a 27 °C até a revelação das placas virais no dia seguinte.

3.2.11 Análise de expressão dos vetores baculovirais: Detecção por *Western Blot*

A expressão foi analisada a cada 24 horas, por um período de 72 até 120 horas. As células infectadas foram ressuspensas no meio de cultura e transferidas para um microtubo. As amostras foram centrifugadas a 800 x g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi transferido a um tubo novo e estocado a -20 °C. Ao pellet celular foram adicionados 600 µl de tampão de lise (PBS, leupeptina 0,5 µg/ml). Adicionou-se PMSF numa concentração final de 100 µg/ml e o pellet foi ressuspensado com vórtex. As amostras foram incubadas em gelo por 40 minutos, sendo homogeneizadas em aparelho tipo vórtex em intervalos de 10 minutos. Finalmente, as amostras foram centrifugadas a 1000 x g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante (lisado) foi transferido a um tubo novo e todas as amostras obtidas (meio de cultura, lisado) seguiram para SDS-PAGE. As proteínas dos géis foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Hybond-C Extra Amersham). O western blot foi conduzido da forma já descrita.

3.2.12 Purificação das proteínas gD e gDE7 produzidas em sistema baculovírus/ células de inseto

Para a extração das proteínas recombinantes os sobrenadantes das culturas (meio SF-900 SFM GIBCO) foram primeiramente dialisados contra tampão Tris 100 mM; NaCl 500 mM; 0,1% CHAPS pH 9,0 para a obtenção da gD e Tris 100 mM; NaCl 500 mM; 0,1% CHAPS pH 7,5 para obtenção da gDE7. Este processo prévio de diálise fez-se necessário para a retirada de substâncias presentes no meio de cultivo que atrapalham na ligação das proteínas á coluna.

As proteínas recombinantes foram purificadas por cromatografia de afinidade em coluna níquelada (His Trap 1mL, GE) em função da ligação específica da cauda de histidina ao metal. O processo de purificação automatizado fez uso de aparelho AKTA – FPLC existente em nosso laboratório e os tampões para a purificação

utilizados foram: **Tampão A**: Tris 100 mM, NaCl 500 mM, pH 9,0 e **Tampão B** Tris 100 mM, NaCl 500 mM, imidazol 1 M, pH 9,0 para a proteína gD; **Tampão A**: Tris 100 mM NaCl 500 mM pH 7,5 e **Tampão B** Tris 100 mM NaCl 500 mM 1 M imidazol, pH 7,5 para a proteína gDE7. As proteínas eluídas foram dialisadas contra solução fisiológica. As amostras foram quantificadas em SDS-PAGE 15% e por espectrofotometria a 280 nm, segundo Edelhoch (1967).

RESULTADOS

Este trabalho se dividiu em duas etapas: a primeira delas consistiu na construção dos vetores, expressão e purificação das proteínas recombinantes gD e gDE7 em sistema bacteriano e análise do seu potencial anti-tumoral *in vivo*. As proteínas geradas em sistema bacteriano foram acumuladas apenas no extrato insolúvel de *E. coli* e, devido à dificuldade inicial em realizar o *refolding* adequado, iniciamos as imunizações com as proteínas insolúveis em sua forma desnaturada. Proteínas solúveis provenientes do extrato insolúvel bacteriano foram obtidas a partir do *refolding* realizado em aparelho de filtração tangencial no qual a uréia foi retirada lentamente com tampões a 4 M, 2 M, 1 M e 0 M. Utilizando este sistema conseguimos que aproximadamente 20% das proteínas purificadas permanecessem em sua forma solúvel após a completa retirada da uréia. Os resultados de imunização apresentados no presente trabalho referem-se às imunizações feitas com as proteínas solúveis e insolúveis geradas em sistema bacteriano.

A segunda etapa deste trabalho consistiu em expressar as mesmas proteínas em um sistema de expressão mais adequado para proteínas virais, no qual proteínas expressas na forma solúvel sofrem modificações pós traducionais, características importantes para a adjuvanticidade da proteína gD. Escolheu-se o sistema baculovírus/células de inseto devido à relativa facilidade de cultivo dessas células em relação às de mamíferos, sendo capazes de se multiplicarem em temperaturas que variam de 25 a 30 °C, mostram boa resistência ao estresse e podem ser cultivadas em garrafas plásticas, *spinners* ou até mesmo em biorreatores (RODAS et al., 2005). Os resultados desta etapa concernem da construção dos vetores baculovirais, expressão em células *Sf-9*, purificação das proteínas gD e gDE7 e um ensaio preliminar que sugere atividade biológica das proteínas.

ETAPA 4.1

**Produção das proteínas recombinantes em sistema bacteriano
e análise de proteção antitumoral *in vivo***

4.1.1 Clonagem e subclonagem dos genes que codificam as proteínas gD e gDE7 nos vetores bacterianos pGEM-T Easy e pET28a

A amplificação dos genes das proteínas gD e gDE7 por PCR utilizando os iniciadores específicos listados na **tabela 1** foi o primeiro passo para a realização das clonagens nos vetores pGEM-T Easy e pET28a. Predições realizadas em programa computacional específico (PrimerSelect - DNASTAR, Inc., Madison, WI, USA.) sugeriam que os fragmentos obtidos por meio da técnica de PCR apresentariam tamanhos de 1000 pb para o gene gD e 1200 pb para o gene gDE7 (**Figura 4**).

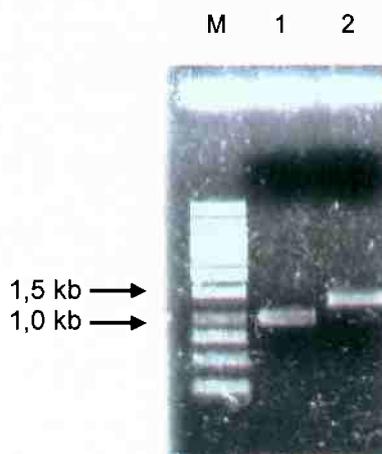


Figura 4 - Fragmentos de DNA que codificam para as proteínas gD e gDE7 amplificados por PCR. M – Marcador de peso molecular (Fermentas); 1 – gD amplificada a partir do vetor pRE4; 2 – gDE7 amplificada a partir do vetor pRE4E7.

Os genes das proteínas gD e gDE7 foram clonados no vetor pGEM-T Easy (Promega) e posteriormente subclonados no vetor de expressão pET28a (Novagen). A confirmação da clonagem e subclonagem dos genes nos vetores pGEM-T Easy e pET28a foi realizada por análise de restrição com as endonucleases *Bam* *HI* e *Xho* *I* após a extração de DNA plasmideal das linhagens recombinantes. O plasmídeo pGEMgD apresenta perfil de restrição com bandas de 3.500 pb e 1.000 pb após clivagem com as enzimas *Bam* *HI* e *Xho* *I* e o plasmídeo pGEMgDE7 apresenta perfil de restrição com bandas de 3.500 pb e 1.200 pb após clivagem com as mesmas enzimas. Já o plasmídeo pETgD apresenta o perfil de restrição com bandas de 5.000 pb e 1.000 pb quando digerido com as endonucleases *Bam* *HI* e *Xho* *I*.

Enquanto que o perfil de restrição do vetor pETgDE7 apresenta banda de 5.000 pb e 1.200 pb quando digerido com essas mesmas enzimas de restrição (Figura 5).

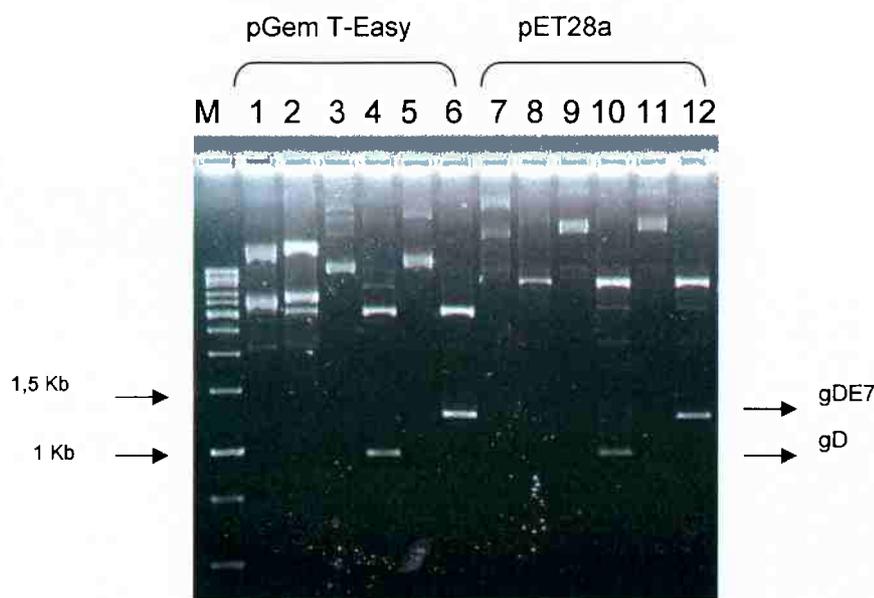


Figura 5 – Confirmação da clonagem dos fragmentos gD e gDE7 nos vetores pGEM T-Easy e pET28a por análise de restrição. M – Marcador molecular (Fermentas); 1 – pGem T- Easy; 2- pGem T- Easy duplamente digerido com *Bam* HI e *Xho* I; 3 – pGem gD; 4 – pGemgD duplamente digerido com *Bam* HI e *Xho* I; 5 – pGemgDE7; 6 – pGem gDE7 duplamente digerido com *Bam* HI e *Xho* I; 7 – pET28a; 8 – pET28a duplamente digerido com *Bam* HI e *Xho* I; 9 – pETgD; 10 – pETgD duplamente digerido com *Bam* HI e *Xho* I; 11 – pETgDE7; 12 – pETgDE7 duplamente digerido com *Bam* HI e *Xho* I.

As seqüências dos genes gD e gDE7 clonadas no vetor pET28a foram confirmadas pelo seqüenciamento dos plasmídeos purificados. A análise das seqüências obtidas confirmou que os plasmídeos continham as seqüências exatas dos genes da gD e da gDE7 oriundas dos vetores pRE4 e pRE4E7 respectivamente, porém sem a seqüência sinal e a região transmembrana retiradas através da reação de PCR e confirmou também a presença dos seis resíduos de histidina adicionados na região C´ terminal dessas proteínas.

4.1.2 Análise da expressão *in vitro* das proteínas gD e gDE7

A expressão dessas proteínas foi testada em quatro linhagens de *E. coli* e demonstradas por eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) de extratos protéicos obtidos de culturas induzidas (0,1 mM de IPTG) em condições de aeração e 37 °C em meio LB (Figura 6).

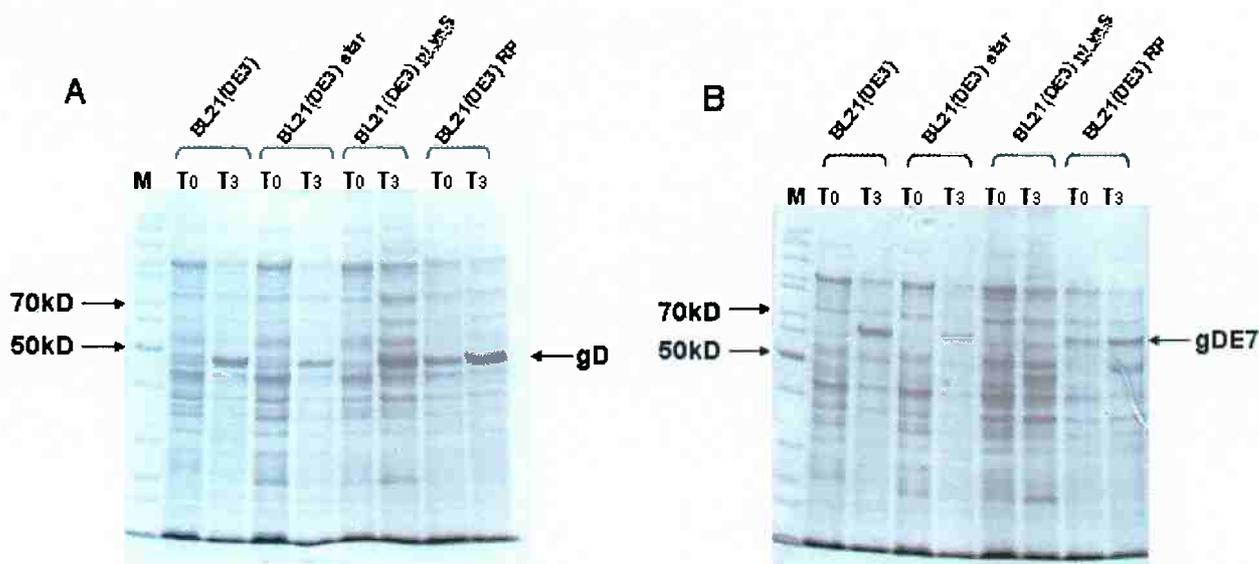


Figura 6 – Análise da composição protéica dos extratos totais de quatro linhagens bacterianas que albergaram os plasmídeos pETgD (A) e pETgDE7 (B). As condições de indução da expressão empregadas neste ensaio foram: 0.1 mM do agente indutor (IPTG), 37 °C, 200 rpm em meio LB. Linhagens: BL21(DE3), BL21(DE3) star, BL21(DE3) pLysS e BL21(DE3) RP.

Os resultados desses ensaios demonstram que as proteínas gD e gDE7 são expressas nas condições de cultivo escolhidas nas quatro linhagens bacterianas testadas, contudo é possível observar uma boa expressão das duas proteínas na linhagem BL21(DE3) de *E. coli*, sendo esta a linhagem escolhida para os ensaios de expressão e purificação das proteínas recombinantes. Os resultados demonstram ainda que a proteína gD apresenta a massa molecular predita em análises *in silico* de aproximadamente 44kD quando se tem como base a seqüência da proteína gD nativa. Isso não acontece com a proteína gDE7, que apresenta massa molecular predita *in silico* de aproximadamente 55kD, mas apresenta uma mobilidade eletroforética de aproximadamente 65 kD. Tal observação mostra-se concordante com a literatura (ARMSTRONG e ROMAN, 1993) que descreve um comportamento

eletroforético anômalo da proteína E7 do HPV-16 quando produzida em *E. coli*, sugerido pela presença de aminoácidos ácidos que conferem uma carga negativa à proteína. De fato, tal alteração também pode ocorrer na migração eletroforética da proteína de fusão estudada, gDE7.

4.1.3 Determinação da solubilidade das proteínas expressas pela linhagem BL21(DE3)

Como o principal objetivo do trabalho foi empregar as proteínas em ensaios *in vivo* e analisar a imunogenicidade da gD e gDE7, seria importante que as proteínas recombinantes mantivessem conformações mais próximas das proteínas nativas. O ideal, portanto, seria que essas proteínas fossem purificadas em forma solúvel e em condições não desnaturantes, ou seja, com tampões livres de agentes como a uréia e guanidina, por exemplo. A determinação da solubilidade das proteínas recombinantes foi realizada segundo protocolo descrito na metodologia. Na **figura 7** estão apresentados os resultados da determinação da solubilidade das proteínas gD e gDE7 recombinantes expressas a 37 °C sob agitação intensa (200 rpm) e com adição de 0,1 mM de IPTG em meio LB após 3 horas de indução. Os resultados de *western blot* demonstraram que as proteínas foram encontradas em sua totalidade no extrato insolúvel bacteriano. Optamos pela indução de expressão a 37 °C porque é a temperatura usualmente utilizada na maioria dos ensaios de indução em nosso laboratório.

Steinberg, Watson e Maiese (1986) e Li, M; Li, X e Liu (2002) demonstraram que a proteína gD do HSV-1 expressa em sistema bacteriano é depositada total ou parcialmente em corpos de inclusão. Existem ainda, dados que sugerem que a hidrofobicidade da gD se deve à porção de ancoramento à membrana na região C' terminal. Mesmo após a remoção desta região nas nossas construções, as proteínas gD e sua derivada gDE7, expressas no sistema escolhido ficaram acumuladas no extrato insolúvel de *E. coli*. Na tentativa de obter essas proteínas no extrato solúvel, optamos por testar temperaturas mais baixas de cultivo no momento da indução, esperando que o crescimento mais lento das culturas fosse suficiente para não permitir a formação de corpos de inclusão ou que pelo menos parte das proteínas expressas permanecesse na fração solúvel. As proteínas gD e gDE7 produzidas em culturas mantidas por aproximadamente 18 horas a 15 °C sob agitação intensa

(200rpm) permaneceram ainda em sua totalidade no extrato insolúvel de *E. coli*. Quando se tentou induzir essas proteínas em temperaturas ainda mais baixas, mantendo as culturas sem agitação por uma noite a 4 °C após a adição do IPTG, não foi possível sequer detectar a expressão das proteínas em gel (dados não mostrados).

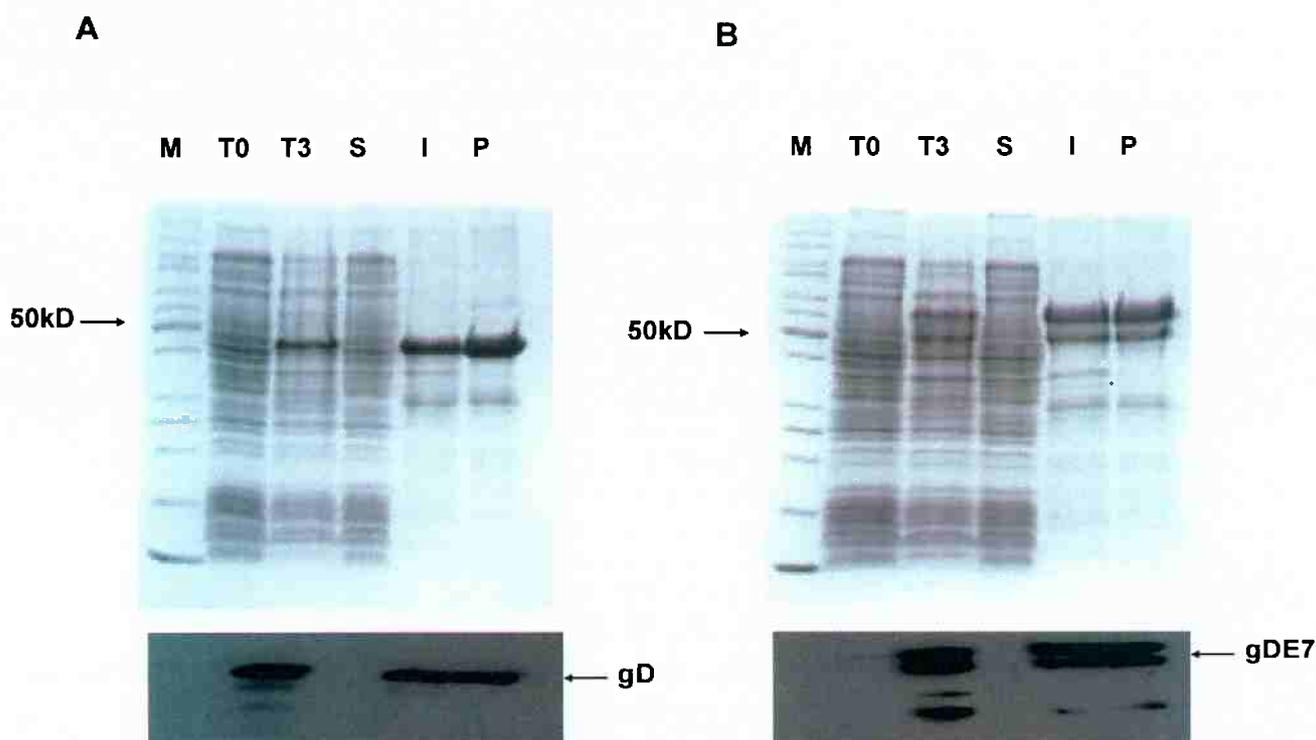


Figura 7 - Determinação da solubilidade das proteínas gD (A) e gDE7 (B) expressas em sistema bacteriano. O ensaio demonstrou que essas proteínas se concentram no extrato insolúvel quando expressas em sistema bacteriano. **M** – Marcador de massa molecular (Fermentas); **T0** – Extrato total da cultura não induzida; **T3** - Extrato total da cultura induzida por 3 horas; **S** – Extrato solúvel; **I** – Extrato insolúvel; **P** – Proteína purificada. Imunodeteção da gD e gDE7 realizada com anticorpo comercial α -gD (DL-6), mostrando que a antigenicidade dessas proteínas está preservada.

4.1.4 Purificação das proteínas gD e gDE7 por cromatografia de afinidade ao níquel

Para os ensaios de purificação, as proteínas gD e gDE7 foram expressas a 37 °C sob agitação intensa (200 rpm) e com adição de 0,1 mM de IPTG em meio LB. As proteínas expressas em sistema bacteriano possuem uma cauda de histidina (composta por seis resíduos desse aminoácido) fusionada geneticamente à porção C terminal, o que possibilitou sua purificação por cromatografia de afinidade em coluna de níquel. O processo de purificação foi realizado no aparelho AKTA – FPLC (GE) e os cromatogramas obtidos estão apresentados na **figura 8**.

Durante a eluição da gD e da gDE7 foi identificado um grande pico de absorvância demonstrando que as proteínas foram inicialmente adsorvidas à coluna e liberadas pela competição com concentrações crescentes do agente imidazol. Frações correspondentes aos picos encontrados nos cromatogramas foram caracterizadas por eletroforese em gel (SDS-PAGE 15%). Os resultados obtidos demonstraram que as proteínas recombinantes são passíveis de purificação do extrato insolúvel de *E. coli* quando utilizados tampões de solubilização com uréia a 8 M. A partir de 1 litro de cultura induzida foi possível obter um rendimento bruto de aproximadamente 0,12 g/L da proteína gD e 0,14 g/L da proteína gDE7 e após a purificação um rendimento de aproximadamente 0.055 g/L da proteína gD e 0.05 g/L da proteína gDE7.

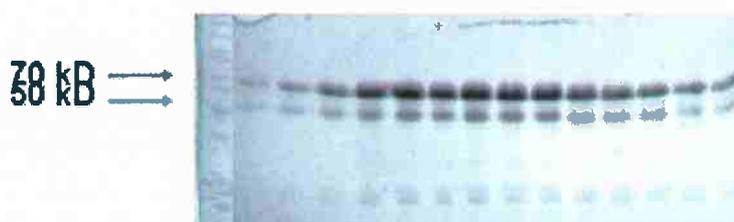
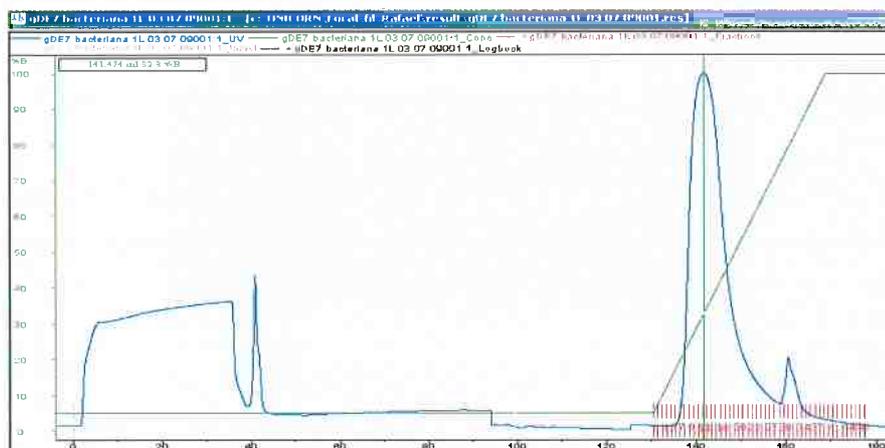
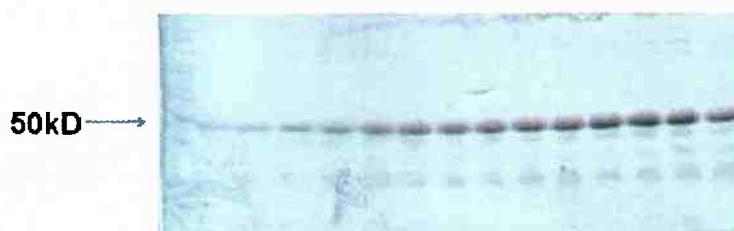
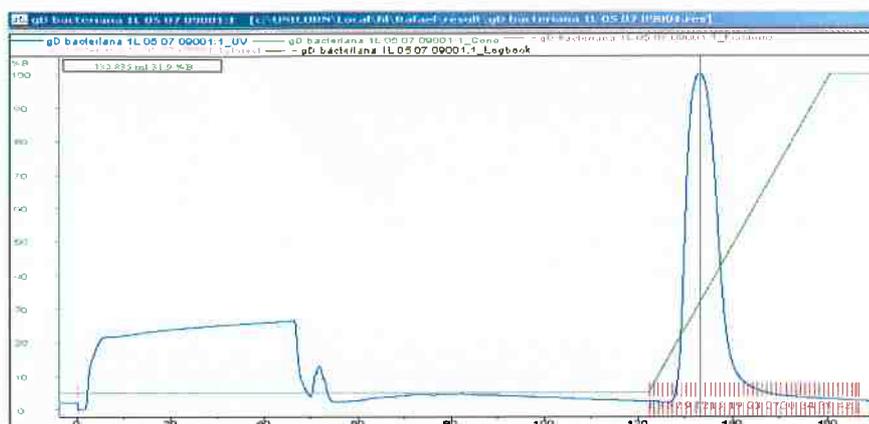


Figura 8 - Purificação das proteínas gD e gDE7 presente no extrato insolúvel de *E. coli*. Cromatograma representativo do processo de purificação e caracterização em SDS – PAGE a 15% das frações coletadas.

Destaca-se na análise eletroforética das frações purificadas das proteínas gD e gDE7 a presença de bandas com tamanho não esperado. A primeira hipótese para explicar o aparecimento dessas bandas envolve a utilização da uréia que poderia gerar produtos de degradação das proteínas. No caso da proteína gDE7, é interessante notar que quando esta é produzida a 37 °C, além da banda no tamanho esperado, pode se observar também a presença de uma banda com massa molecular de aproximadamente 52kD também reconhecida pelo anticorpo á-gD (vide imunodeteção na **Figura 7**). Isso não é reproduzido quando a gDE7 é expressa a 15 °C, onde a imunodeteção dessa proteína não reconhece a banda de 52 kD (dado não mostrado). Isso abre caminho para uma segunda hipótese: a ação de uma protease ativa a 37 °C, sobretudo na seqüência da proteína E7 inserida na gD, visto que a proteína gD em ambas condições de cultivo não sofreu essa clivagem. A terceira hipótese relaciona-se à composição da proteína E7 que confere um perfil eletroforético anômalo, inclusive demonstrado em trabalhos prévios. Isso pode, de alguma forma, interferir no perfil eletroforético da proteína de fusão gDE7.

Já que o intuito desta dissertação de mestrado é utilizar proteínas purificadas como formulações vacinais, sentimos a necessidade de retirar a uréia das amostras através do processo de diálise. A diálise, mesmo sendo um processo lento e gradual, levou à completa precipitação das proteínas gD e gDE7, tanto contra água destilada como em solução fisiológica, mostrando que essas proteínas não adquiriram conformação correta após a retirada do agente desnaturante. Ainda na tentativa de obter proteínas solúveis após retirar a uréia, realizou-se a técnica de *refolding* em coluna de cromatografia, processo em que se retiram gradativamente agentes desnaturantes das amostras ainda no processo de purificação em sistema AKTA – FPLC (LI, SU e JANSON, 2004; CABRITA e BOTTOMLEY, 2004). Não obtivemos sucesso com essa metodologia, a precipitação das proteínas ocorreu no interior das colunas de cromatografia.

As proteínas gD e gDE7 dialisadas, insolúveis e desnaturadas foram submetidas a ensaios de imunização em camundongos C57BL/6, administradas em quatro doses pela via subcutânea para a análise do tipo de resposta imunológica desencadeada e capacidade de proteção dos animais perante desafio com a linhagem tumoral TC-1.

4.1.5 Efeito profilático antitumoral da proteína gDE7 insolúvel em camundongos machos C57BL/6 perante desafio com TC-1

Os camundongos imunizados com as formulações vacinais descritas anteriormente receberam o desafio com a linhagem TC-1 quinze dias após a última dose do protocolo vacinal e foram acompanhados durante 60 dias para análise de sobrevivência. Observamos que o grupo imunizado com a proteína de fusão gDE7 insolúvel ficou protegido em 80% do desenvolvimento tumoral. Já a combinação gD+E7 protegeu apenas 20% dos animais e os grupos controles, como esperado, não ficaram protegidos (**Figura 9**). Portanto a fusão genética da proteína E7 à proteína gD é, de alguma forma, importante para a proteção anti-tumoral.

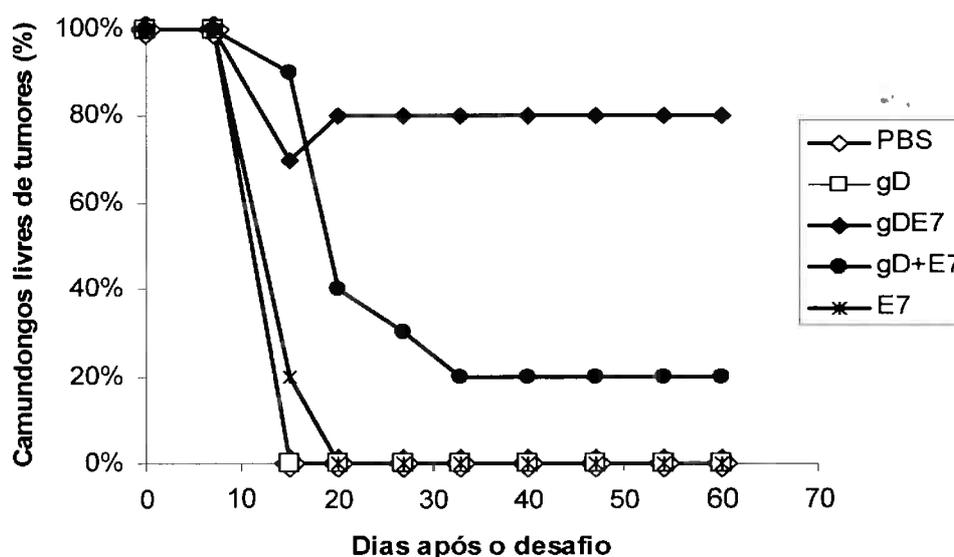


Figura 9 – Efeito profilático antitumoral da formulação vacinal insolúvel composta pela fusão genética da proteína gD do HSV-1 e da oncoproteína E7 do HPV-16 em camundongos desafiados com a linhagem tumoral TC-1. Dez animais por grupo foram imunizados, desafiados ($7,5 \times 10^4$ células TC-1 por animal) e acompanhados por 60 dias para análise de proteção antitumoral.

Esses animais imunizados e desafiados também tiveram seus baços coletados e submetidos a ensaios de ELISPOT e citotoxicidade *in vivo*, com quinze e trinta dias após o desafio com TC-1. Os melhores resultados com as formulações vacinais insolúveis foram obtidos com trinta dias após o desafio nos ensaios de ELISPOT. Como mostrado na **figura 10**, o grupo experimental gDE7 foi o único que apresentou diferença estatisticamente significativa no número de células do baço secretoras de IFN- γ quando estimulados com o peptídeo E7 MHC-I restrito em relação ao grupo controle imunizado somente com o antígeno E7. O grupo gD+E7 também apresentou produção de IFN- γ pelas células do baço porém sem diferença significativa em relação ao grupo controle imunizado apenas com a proteína E7, corroborando o efeito anti-tumoral observado no teste de sobrevivência.

O fato de linfócitos T CD8+ produzirem IFN- γ indica que foram ativados, mas não garante que apresentam estado efetor. Um linfócito T CD8+ efetor é capaz de produzir moléculas como as perforinas, proteínas que formam poros na célula alvo, e granzimas, proteases que induzem morte celular. Este estado efetor pode ser avaliado pelo ensaio de citotoxicidade *in vivo*. Observamos neste ensaio que a média da resposta citotóxica específica foi maior no grupo que recebeu a formulação vacinal gDE7 atingindo em torno de 15% (**Figura 11**). Porém, a porcentagem de lise específica das células-alvo sensibilizadas *in vitro* com o peptídeo E7 específico variou bastante entre os animais deste grupo e, portanto, não foi possível demonstrar diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle imunizado com a proteína E7. Este dado sugere que um percentual dos linfócitos T CD8+/IFN- γ + detectados no grupo gDE7 pela análise de ELISPOT estão ativados, mas sua atividade efetora pode estar reduzida.

Ensaio terapêuticos com as formulações vacinais insolúveis não foram realizados devido ao fato da proteção profilática não ter alcançado 100%.

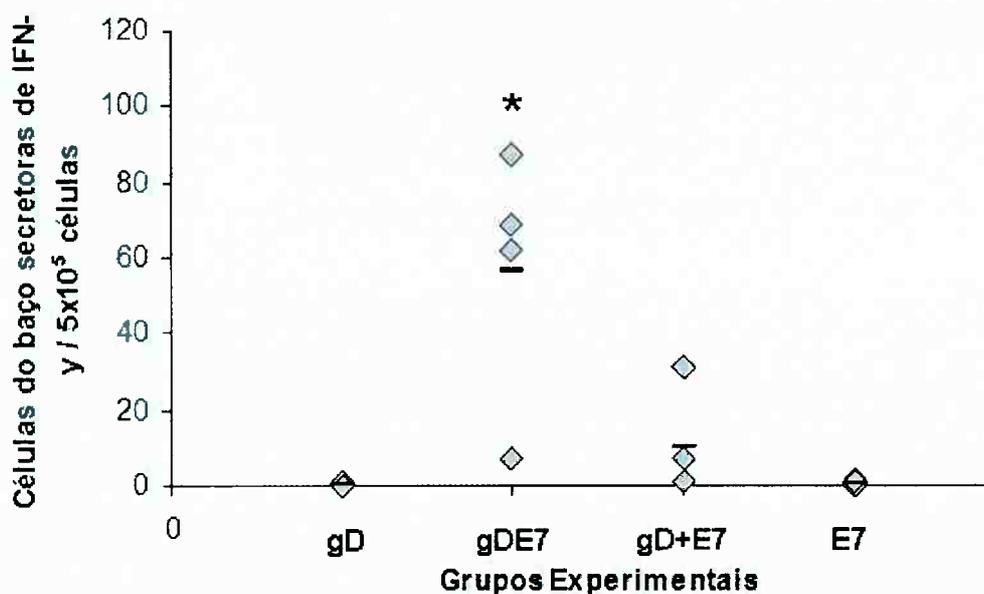


Figura 10 – Determinação do número de células do baço secretoras de IFN- γ por 5×10^5 células através de ELISPOT. Os animais foram imunizados com as proteínas bacterianas insolúveis, desafiados com as células TC-1 e após trinta dias foram sacrificados. Os esplenócitos foram re-estimulados *in vitro* com o peptídeo E7 e a resposta específica mensurada. * $p < 0,05$ em relação ao grupo E7.

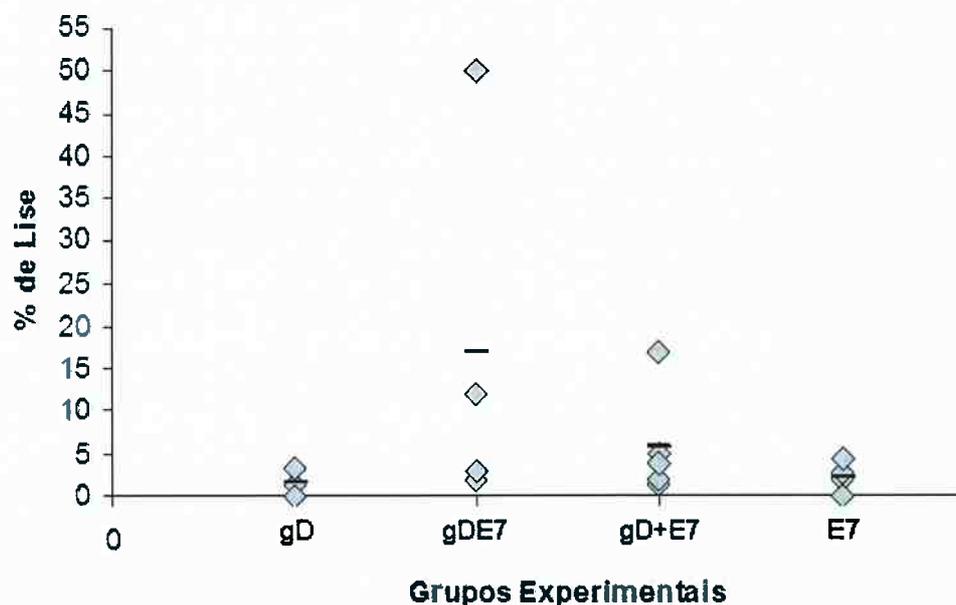


Figura 11 – Citotoxicidade *in vivo* e a determinação da porcentagem de lise específica mediado por células T CD8+ citotóxicas específicas para o peptídeo E7 em animais imunizados. Os animais foram imunizados com as proteínas bacterianas insolúveis, desafiados com as células TC-1 e após trinta dias foram inoculados com células de animais *naïves* marcadas com CFSE e estimuladas *in vitro* com o peptídeo E7. A presença de células T CD8+ citotóxicas específicas para o peptídeo E7 foi avaliada nos grupos experimentais imunizados.

4.1.6 Efeito profilático antitumoral da proteína gDE7 solúvel em camundongos machos C57BL/6 perante desafio com TC-1

Para podermos observar efetivamente o potencial imunomodulador da proteína gD em nossas formulações vacinais, administramos as proteínas solúveis obtidas após *refolding* em doses semanais totalizando quatro doses. Os camundongos imunizados receberam o desafio com a linhagem tumoral TC-1 quinze dias após a última dose do protocolo vacinal e foram acompanhados durante 60 dias para análise de sobrevivência. Como observado na **figura 12**, a formulação vacinal compreendida pela proteína de fusão gDE7 conferiu proteção profilática de desenvolvimento tumoral em 100% dos animais. Passados os 60 dias iniciais de observação da proteção, os animais do grupo gDE7 que permaneciam protegidos receberam um novo desafio com a mesma carga de células TC-1 e foram observados por mais 30 dias. Novamente, a proteção contra o tumor observada foi de 100%. Em contrapartida, a combinação gD+E7 e os grupos controles, obviamente, não ficaram protegidos perante o primeiro desafio. Portanto a fusão genética da proteína E7 à proteína gD é, de fato, importante para que ocorra proteção anti-tumoral.

A proteína E7 isolada possui uma meia vida intracelular muito baixa e é pouco imunogênica (NATALE et al., 2000), o que pode acarretar tolerância de linfócitos T às células tumorais (CLERICI et al., 1997). Por esse motivo, o emprego de adjuvantes que atuam como imunomoduladores ou que simplesmente melhoram a entrega do antígeno pode repercutir de forma muito positiva na maturação de células apresentadoras de antígenos e na produção de citocinas pró-inflamatórias, que, quando combinadas, tornam o micro ambiente favorável para o desenvolvimento de resposta celular efetora e específica contra o tumor. No caso deste trabalho o adjuvante escolhido foi a proteína gD do HSV-1, empregada nas formulações vacinais de forma fusionada ou co-administrada.

Realizamos também uma cinética de doses para verificar o nível de proteção relativo ao número de doses administradas. Este ensaio demonstrou que uma dose da proteína gDE7 não é capaz de proteger os animais do aparecimento do tumor. Com duas doses a proteção alcança 60% e, três doses são suficientes para proteger 70% dos animais desafiados com TC-1. Com esse resultado, concluímos que para

alcançar 100% de proteção profilática são necessárias quatro doses da formulação vacinal composta pela gDE7 solúvel (Figura 13).

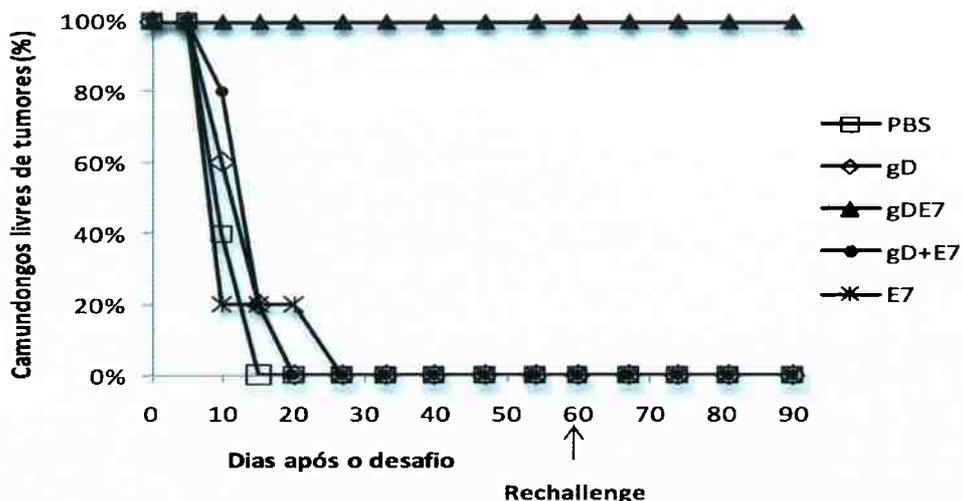


Figura 12 – Efeito profilático antitumoral da formulação vacinal solúvel composta pela fusão genética da proteína gD do HSV-1 e da oncoproteína E7 do HPV-16 em camundongos desafiados com a linhagem tumoral TC-1. Dez animais por grupo foram imunizados, desafiados ($7,5 \times 10^4$ células TC-1 por animal) e acompanhados por 60 dias para análise de proteção antitumoral. O grupo gDE7 protegido diante do primeiro desafio recebeu uma nova carga de células tumorais e sua sobrevivência foi acompanhada por mais 30 dias.

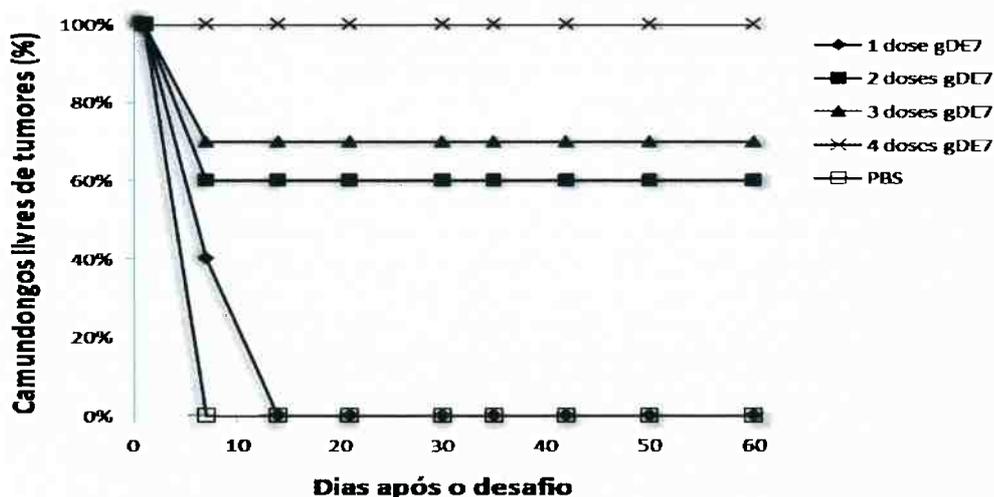


Figura 13 – Ensaio de cinética de doses da formulação vacinal gDE7 e análise do nível de proteção profilática antitumoral. Dez animais por grupo foram imunizados, desafiados ($7,5 \times 10^4$ células TC-1 por animal) e acompanhados por 60 dias para análise de proteção antitumoral. O grau de proteção conferido aos animais imunizados mostrou-se proporcional ao número de doses da formulação vacinal administrada.

Os animais imunizados com as proteínas solúveis e desafiados com TC-1 também tiveram sangue e baços coletados e submetidos a ensaios de ICS, ELISA de citocinas e citotoxicidade *in vivo*, com quinze dias e trinta dias após o desafio com TC-1. Os melhores resultados foram obtidos nos ensaios realizados após quinze dias do desafio com a linhagem tumoral. Como mostrado na **figura 14A**, foi possível detectar através de ICS, que o grupo experimental gDE7 apresentou uma porcentagem maior (dobro) de linfócitos TCD8⁺ secretores de IFN- γ do sangue quando estimulados com o peptídeo E7 CD8-restrito em relação ao grupo controle, imunizado somente com o antígeno E7. Essa diferença mostrou-se ainda maior quando a análise foi feita com os animais sobreviventes ao segundo desafio com a linhagem tumoral TC-1. Ensaios de ICS foram realizados anteriormente com animais que receberam somente as doses de imunização. Nesta circunstância não foi possível observar resposta positiva mesmo nos camundongos protegidos, o que ressalta a importância do desafio em estratégias vacinais antitumorais. A exposição às células tumorais funciona, como um reforço da vacina, o que aumenta a magnitude da resposta gerada tornando-a mensurável pelos ensaios empregados. Além disso, permite mimetizar um encontro real do patógeno, neste caso representado pela célula tumoral, com o sistema imune do hospedeiro.

O estado efetor dos linfócitos foi avaliado por ensaio de citotoxicidade *in vivo*. Para isso, após quinze dias do desafio com TC-1, os camundongos imunizados receberam células de camundongos *naive* sensibilizadas com o peptídeo E7 CD8-específico e marcadas com o corante CFSE. Após eutanásia destes animais, os baços foram coletados para pesquisa de células marcadas com CFSE por citometria de fluxo. A diminuição do número de células marcadas com a concentração maior de CFSE e sensibilizadas com o peptídeo em relação às células não sensibilizadas e marcadas com uma concentração menor do corante indica a atividade citotóxica dos linfócitos T CD8⁺ efetores e específicos para a E7. Constatamos neste ensaio que a média da resposta citotóxica também foi maior no grupo que recebeu a formulação vacinal gDE7, com porcentagem média de lise específica de 12%, enquanto nos animais tratados apenas com E7 a atividade citotóxica dos linfócitos T CD8⁺ alcançou apenas 2%. Novamente, a gD fusionada à E7 mostrou maior potencial adjuvante em relação à formulação gD co-administrada à E7 para respostas mediadas por células T CD8⁺ efectoras, o que corrobora com os resultados de

proteção tumoral observados (**Figura 14B**). Em comparação ao ensaio de citotoxicidade *in vivo* realizado com os animais que receberam a gDE7 em sua forma insolúvel, observamos que a resposta foi mais homogênea nos animais que receberam a proteína solúvel, apesar de as médias das respostas detectadas nos dois ensaios terem sido semelhantes.

O IFN- γ detectado no ensaio de ICS é consequência da utilização do peptídeo E7 CD8-restrito para estimular *in vitro* os linfócitos T presentes no sangue. Realizamos o ensaio de ELISA de citocinas com o intuito de dosar quantitativamente a secreção de IFN- γ pelos linfócitos presentes no baço. Os esplenócitos de todos os grupos experimentais foram reestimulados *in vitro* durante 72 horas com o peptídeo E7 CD8-restrito. Os resultados obtidos demonstram que somente o grupo imunizado com a proteína de fusão gDE7 produziu quantitativamente IFN- γ E7-específico em relação aos outros grupos experimentais que também foram imunizados com a proteína E7, corroborando o resultado obtido através do ICS (**Figura 15A**).

Também utilizamos a proteína E7 para fazer o estímulo *in vitro* dos esplenócitos dos grupos imunizados com a gDE7 e a E7 isolada para dosagem de outras citocinas além do IFN- γ , como a IL-4, IL-12 e IL-10, para podermos observar o papel adjuvante e imunomodulador da gD quando fusionada ao antígeno E7. A dosagem dessas citocinas foi realizada a partir do sobrenadante dos esplenócitos reestimulados *in vitro* durante 72 horas. Os dados revelaram que não houve secreção de IL-4 pelos esplenócitos em níveis detectáveis em nenhum dos dois grupos utilizando as condições de imunização e ensaios experimentais deste trabalho. Já os níveis de IFN- γ detectados permaneceram maiores no grupo imunizado com a proteína de fusão gDE7 em relação ao grupo controle imunizado com a proteína E7, mostrando que a gD potencializa, de fato, a secreção dessa citocina e deve modular a resposta anti-E7 para o tipo Th-1.

Dosamos também a IL-12, uma citocina com habilidade em promover a diferenciação de células T helper (CD4+) a favor do fenótipo Th-1 e estimular a produção de IFN- γ . Elevados níveis dessa citocina foram detectados em ambos os grupos experimentais. Em contrapartida, concluímos no ensaio de dosagem da IL-10 que esta citocina foi detectada apenas no grupo imunizado com a proteína E7. A IL-10 é classificada como uma citocina regulatória que inibe a produção de citocinas do tipo Th-1, suprime as funções dos macrófagos e privilegia a ativação de linfócitos B.

Portanto, o balanço desses resultados sugere que a proteína gD na formulação vacinal fusionada ao antígeno E7 tende a modular a resposta para o tipo Th-1 contra este antígeno, explicado pelos níveis de IFN- γ e IL-12 encontrados. Por outro lado, o antígeno quando administrado de forma isolada tende a ativar um padrão de respostas do tipo Th-2 e geração de anticorpos, explicado pelos níveis de IL-10 detectados (**Figura 15B**).

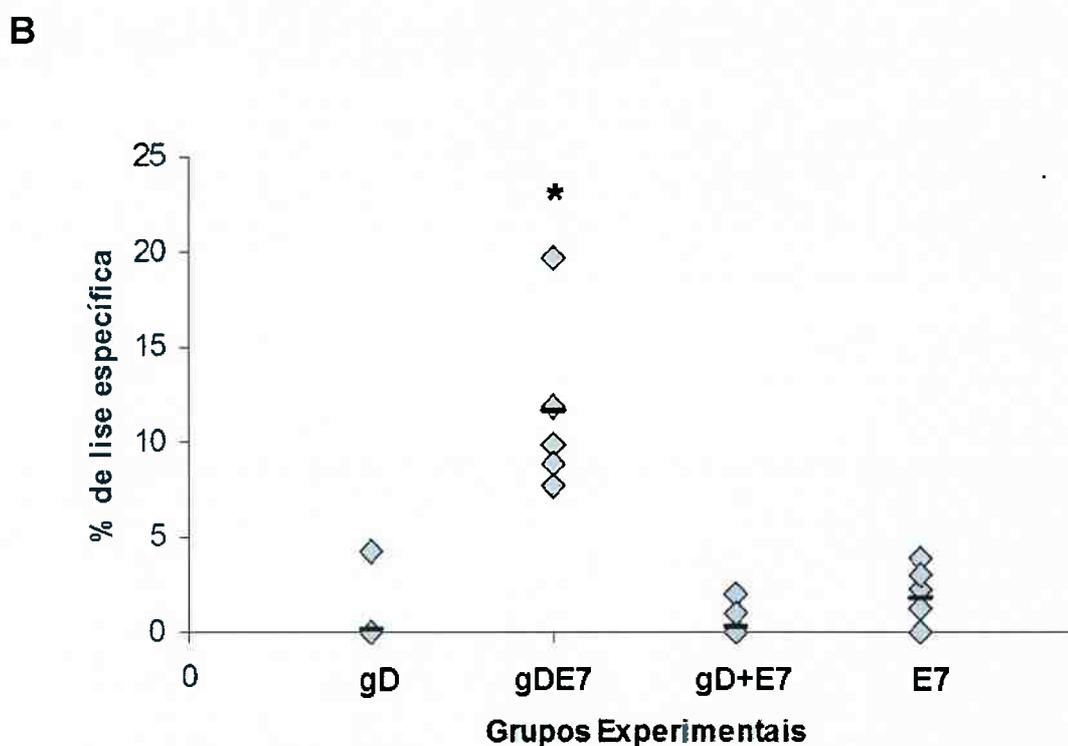
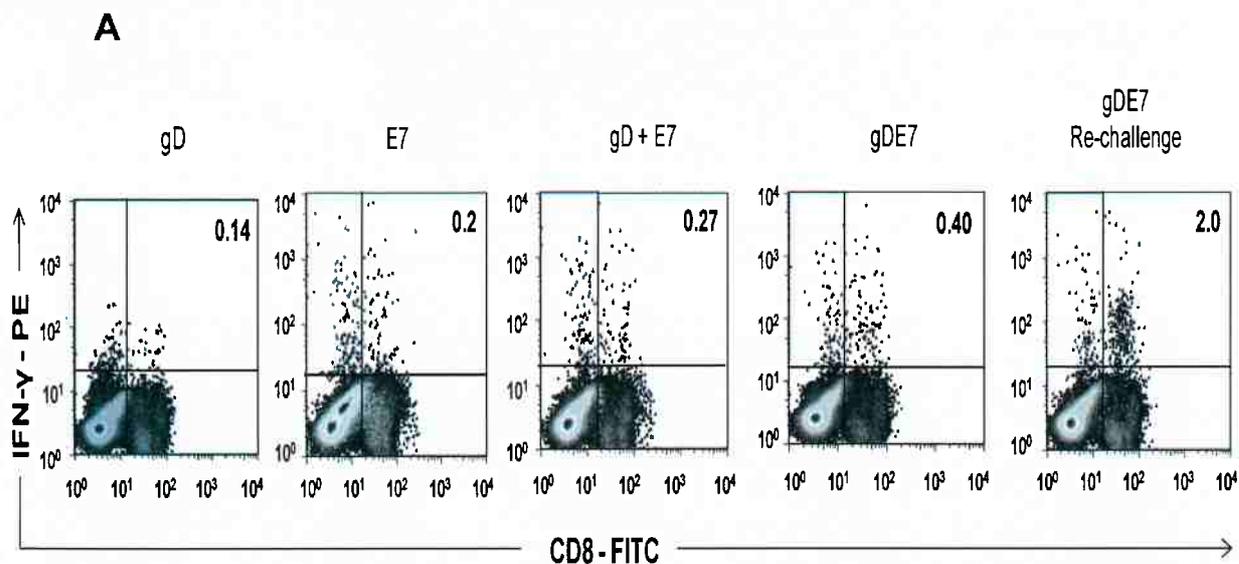
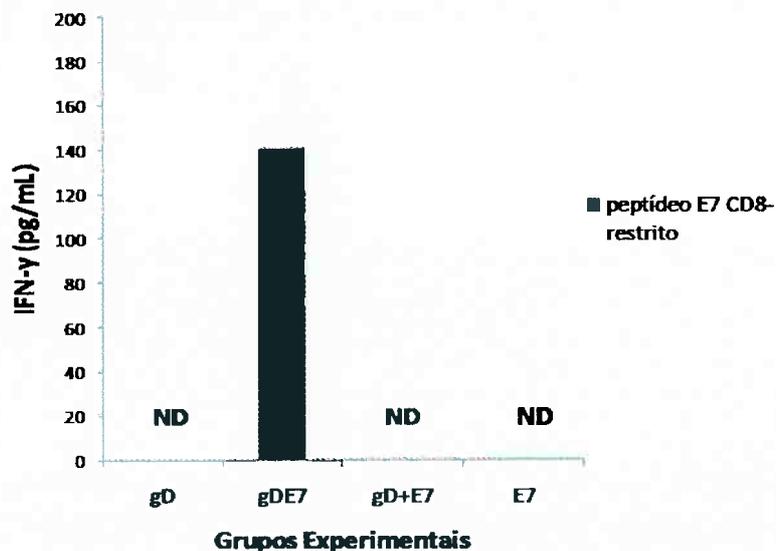


Figura 14 – Análise *in vitro* da resposta imunológica E7-específica gerada pela imunização subcutânea de camundongos machos C57BL/6 com as proteínas recombinantes solúveis. A) Intracellular Cytokine Staining (ICS) onde linfócitos de sangue periférico foram re-estimulados *in vitro* com o peptídeo E7-específico e utilizados no ensaio. Os números nos quadrantes superiores direitos indicam a porcentagem de linfócitos TCD8⁺ produtores de IFN- γ mediante o número total de linfócitos utilizados no ensaio. **B)** Citotoxicidade *in vivo* gerada nos camundongos imunizados com as proteínas recombinantes solúveis. Os resultados representam o percentual de células mortas por linfócitos TCD8⁺ citotóxicos específicos para o peptídeo E7 MHC-I restrito em um total de 2×10^7 células-alvo. Os dados representam a média de um experimento com grupos de cinco animais. * $p < 0,05$, versus grupo E7.

A



B

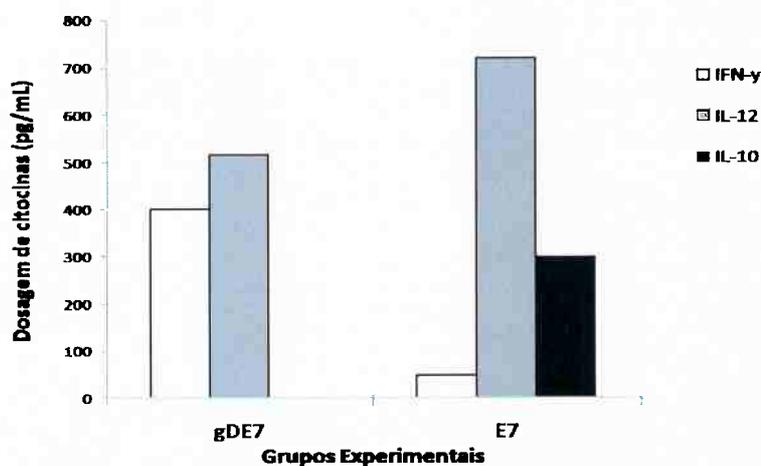


Figura 15 – Dosagem de citocinas por ELISA e análise do padrão Th1/Th2 *in vivo*. Os animais foram imunizados com quatro doses pela via subcutânea e desafiados com a linhagem tumoral TC-1. Após quinze dias do desafio, os esplenócitos (10^7 células) foram coletados e re-estimulados *in vitro* com o peptídeo E7 CD8-específico (A) ou com a proteína E7 (B). Os sobrenadantes dessas células foram coletados após 72 horas de contato com o estímulo e aplicados no ensaio. ND – não determinado.

4.1.7 Efeito terapêutico antitumoral da proteína gDE7 solúvel em camundongos C57BL/6 perante desafio com TC-1

Nem todas as mulheres infectadas pelo HPV-16 serão vítimas do câncer de colo de útero ao longo de suas vidas. A imunização profilática antitumoral em massa se torna inviável em termos de custos principalmente porque são necessárias quatro doses da vacina para se alcançar 100% de proteção. Por isso, o efeito mais interessante e eficaz de formulações em que se pretende combater tumores é o efeito terapêutico, para tratamento somente das mulheres que já apresentam lesões ou tumores.

Neste trabalho resolvemos investigar o efeito terapêutico da formulação vacinal gDE7 que protegeu em 100% os animais na análise profilática, e para isso, administramos a proteína solúvel obtida após *refolding* em camundongos um dia após o desafio com a linhagem TC-1 (dia 0). Grupos de 10 camundongos receberam quatro doses das formulações vacinais, uma dose por semana, e foram acompanhados durante 60 dias para análise de sobrevivência. Utilizamos como grupos controle animais que receberam somente o antígeno E7, para avaliarmos o efeito adjuvante da proteína gD na formulação fusionada, e animais que receberam somente PBS como controle de crescimento das células tumorais. A análise terapêutica da formulação gD+E7 não foi realizada porque essa formulação não foi capaz de proteger os animais na análise profilática de sobrevivência.

Como observado na **figura 16**, a formulação vacinal compreendida pela proteína de fusão gDE7 protegeu 30% dos animais para o desenvolvimento tumoral quando administrada em um sítio próximo ao da inoculação das células tumorais. Quando a mesma formulação foi administrada em um sítio distante ao da inoculação de TC-1, a proteção alcançou 20%. Observamos também que, mesmo nos animais não protegidos, o crescimento tumoral mostrou-se mais lento do que nos animais que receberam somente o antígeno E7.

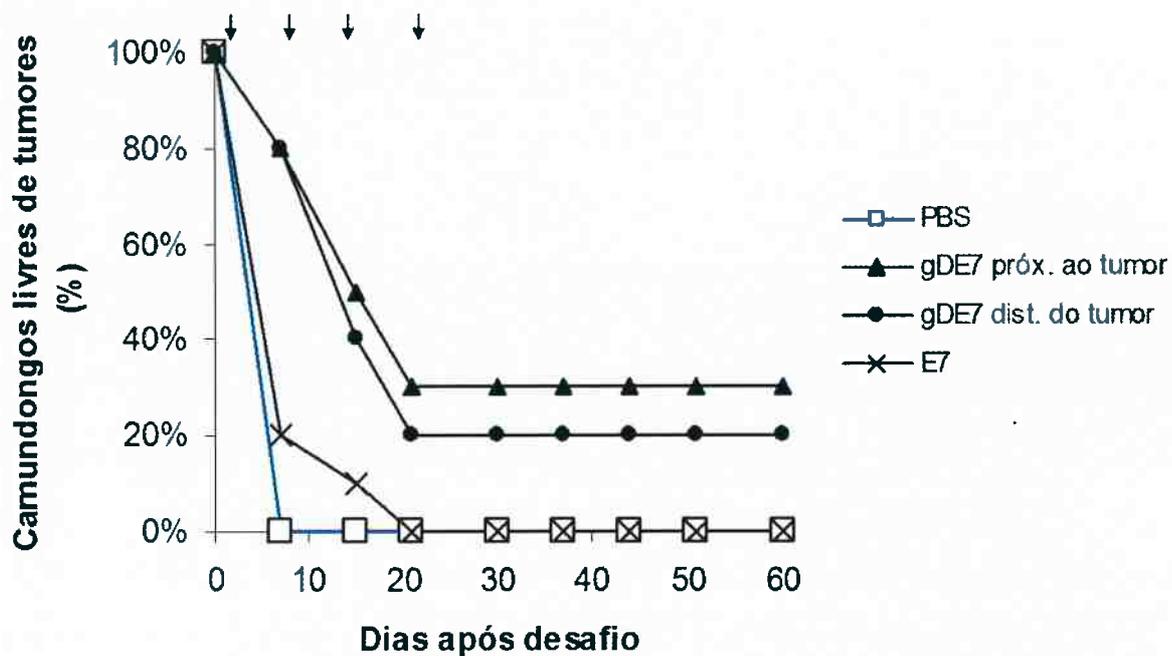


Figura 16 – Efeito terapêutico antitumoral da formulação vacinal solúvel composta pela fusão genética da proteína gD do HSV-1 e da oncoproteína E7 do HPV-16 em camundongos desafiados com a linhagem tumoral TC-1. Dez animais por grupo foram desafiados (dia 0), imunizados e acompanhados por 60 dias para análise de proteção antitumoral. As setas indicam as doses administradas nos dias 1, 8, 15 e 22 do regime vacinal.

4.1.8 Determinação da resposta humoral induzida pelas formulações vacinais solúveis

1) Resposta humoral contra a proteína gD (Imunogenicidade)

Anticorpos IgG séricos gerados pelas imunizações com as proteínas solúveis foram analisados como indicadores da imunogenicidade e adjuvanticidade da proteína gD nas formulações vacinais. Observamos que os anticorpos anti-gD detectados nos soros (IgG total e subclasses de IgG) dos animais apresentaram altos títulos em todos os grupo analisados, exceto naquele grupo imunizado somente com o antígeno E7 no qual, obviamente, não foi possível determinar anticorpos contra a proteína gD (**Figura 17**).

Para a análise das subclasses de IgG anti-gD utilizamos os soros obtidos uma semana após a quarta dose de imunização. Esses soros foram analisados para a presença de IgG1 e IgG2c. A análise das subclasses de IgG sugere um padrão de resposta mista Th1/Th2 para a proteína gD nas formulações vacinais, com uma tendência para o padrão Th2, sugerida pela razão entre anticorpos anti-gD IgG1/IgG2c (**Figura 18**). Não buscamos neste trabalho, investigar as respostas do tipo celular citotóxica específica contra a proteína gD, por isso, ensaios adicionais ainda precisam ser realizados para a confirmação deste dado.

Os resultados obtidos mostraram que a imunogenicidade da proteína gD ficou preservada e abriu perspectivas para investigarmos o potencial bivalente da formulação vacinal composta pela proteína gDE7, que privilegia tanto uma resposta do tipo celular citotóxica contra o antígeno tumoral E7 como também pode gerar resposta de anticorpos neutralizantes contra o vírus HSV-1. Testes de neutralização viral foram realizados com a utilização do HSV-1 da cepa F e mistura dos soros gerados após a quarta dose de imunização. Utilizamos como controle positivo um anticorpo monoclonal anti-gD (1D3) em que o epítipo de reconhecimento na proteína coincide com o sítio de interação desta com o receptor celular HVEM, na tentativa de bloquear ou diminuir a taxa de infecção do HSV-1 em células Vero. Além deste anticorpo, utilizamos também o soro gerado em imunizações com a vacina de DNA que codifica para a proteína gD nativa (pRE4), e também o soro gerado em imunizações com a vacina de DNA que codifica para a proteína gDE7 (pgDE7). Os

soros testados foram considerados neutralizantes quando as unidades formadoras de placas foram reduzidas em pelo menos 50% em relação ao controle de vírus.

Os resultados obtidos neste ensaio revelam que o soro gerado com a proteína gDE7 não foi capaz de neutralizar o vírus HSV-1. Os soros considerados neutralizantes nos ensaios foram aqueles em que a proteína gD foi administrada nos animais de forma isolada, ou seja, o soro gerado com a proteína gD, o soro gerado com a gD co-administrada a E7 e o soro gerado com a vacina de DNA pRE4, sendo que esse último, utilizado também como controle positivo, alcançou 100% de neutralização (**Figura 19**).

Acreditamos que a conformação das proteínas seja crucial na geração de anticorpos neutralizantes anti-HSV-1. A proteína gD administrada em nossas formulações vacinais além de ter a porção C terminal deletada, pode ter adquirido uma conformação diferente da proteína gD nativa após o *refolding*, prejudicando, portanto, a geração dos anticorpos neutralizantes contra o HSV-1 nos mesmos níveis que a vacina de DNA. Isso é evidente no caso da gDE7, a proteína E7 inserida dentro da gD deve ter modificado significativamente a estrutura quaternária da proteína a ponto de não deixar disponível os epítopos necessários para a geração dos anticorpos neutralizantes anti-HSV-1. Esse perfil foi observado tanto no soro gerado na imunização com a proteína gDE7 purificada quanto no soro gerado na imunização com a vacina de DNA pgDE7. Portanto, com os resultados de neutralização do HSV-1, descartamos o potencial bivalente da formulação vacinal da proteína purificada gDE7 produzida em sistema bacteriano.

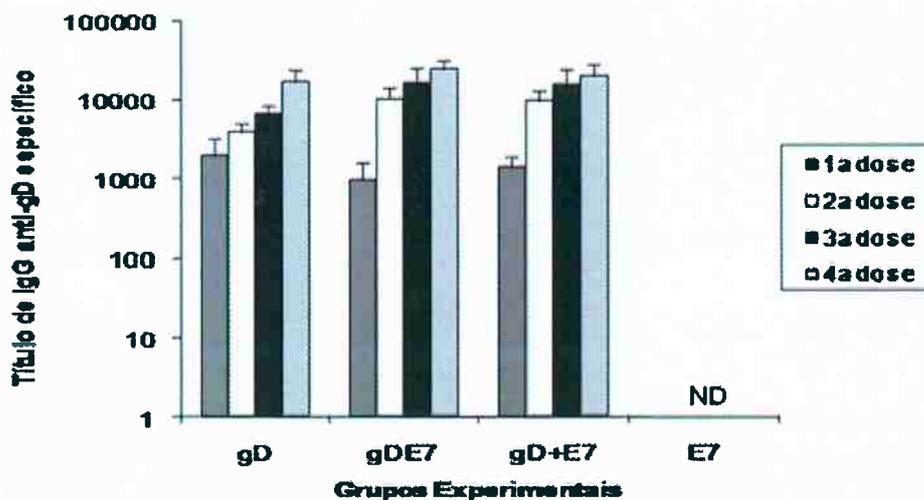


Figura 17 – Avaliação da imunogenicidade da proteína gD nas formulações vacinais solúveis empregadas após imunização subcutânea. Os camundongos C57BL/6 receberam quatro doses das vacinas conforme descrito na metodologia e os soros foram coletados uma semana após cada dose. Os valores do grupo pré-imune já foram descontados dos valores presentes no gráfico. ND – título não determinado. Os dados mostrados representam a média do resultado obtido com grupos de cinco animais analisados de forma individual. As barras indicam os desvios-padrão. ND – não determinado.

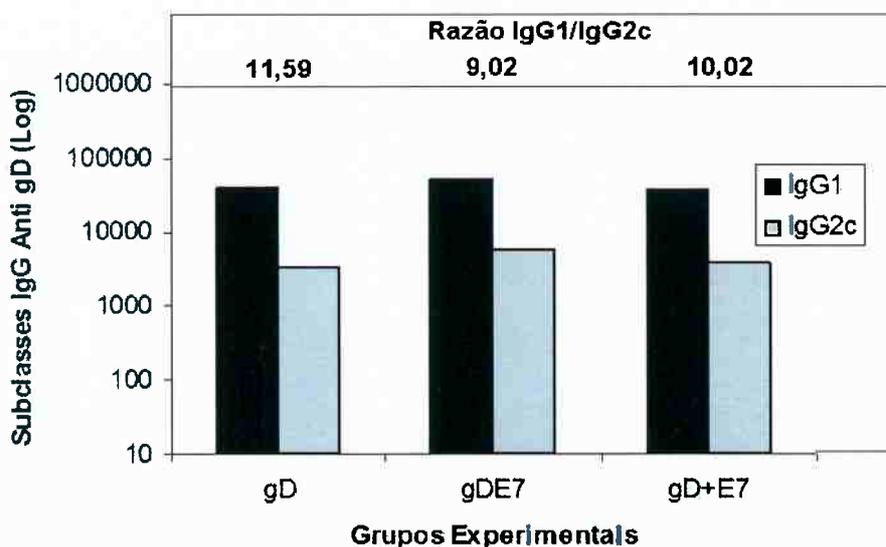


Figura 18 – Resposta das subclasses de IgG sérico contra a proteína gD. Camundongos machos C57BL/6 receberam quatro doses das formulações vacinais como descrito na metodologia. Os soros utilizados neste ensaio foram aqueles coletados uma semana após a quarta dose para dosagem por ELISA de anticorpos IgG1 e IgG2c anti-gD. Os dados mostrados representam a média do resultado obtido com *pool* de grupos de cinco animais.

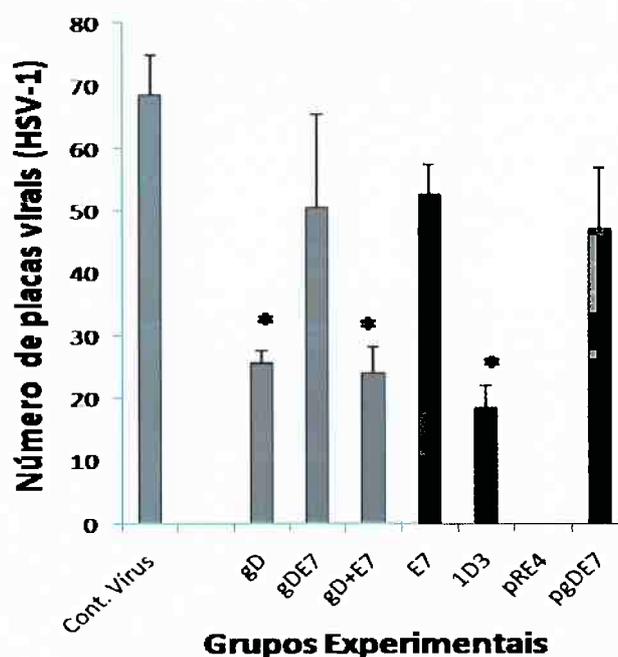


Figura 19 – Ensaio de redução de placas virais (neutralização) do HSV-1. O vírus HSV-1 foi encubado por uma hora com os *pools* dos soros dos animais imunizados com diferentes formulações vacinais, e então incubado com as células Vero por aproximadamente 65 horas. Depois deste período as células foram fixadas, coradas e as placas virais foram contadas. Os dados mostrados no gráfico representam a média do número de placas virais obtidas em cada grupo a partir de dois ensaios independentes de soro-neutralização. A tabela abaixo demonstra as porcentagens de redução de placas virais alcançadas com os *pools* dos soros gerados nas imunizações deste trabalho. * $p < 0,05$, versus grupo controle de vírus.

Tabela 5 – Propriedade neutralizante dos soros gerados com as formulações vacinais testadas contra o HSV-1.

	gD	gDE7	gD+E7	E7	1D3	pRE4	pgDE7
Neutralização	+	-	+	-	+	+	-
% de redução de placas virais	63,6 ± 3,0	27,9 ± 21,1	65,7 ± 6,0	25 ± 7,0	73,6 ± 5,0	100	33,0 ± 14,1

2) Efeito adjuvante da proteína gD frente à resposta humoral contra a proteína E7

Uma vez estabelecido o perfil de resposta humoral sistêmica contra a proteína gD, analisamos a capacidade desta proteína atuar como adjuvante na produção de anticorpos contra a proteína E7. Embora saibamos que os anticorpos gerados não são protetores nos casos de tumores induzidos pelo HPV-16, eles servem como indicativo do poder adjuvante da proteína gD nas formulações vacinais testadas. Como esperado, os títulos de IgG total E7-específicos são mais baixos do que os níveis gerados contra a proteína gD devido à baixa imunogenicidade da proteína E7. No entanto, como mostrado na **figura 20**, o grupo que recebeu a formulação vacinal gDE7 apresentou níveis mais altos de anticorpos anti-E7 em relação aos animais que receberam somente a proteína E7 e o grupo que recebeu a E7 co-administrada à gD. Esses dados demonstram o potencial adjuvante da proteína gD quando administrada na forma fusionada a um antígeno e, relação à produção de anticorpos.

Determinamos também as subclasses de IgG anti-E7 predominantes nos soros dos animais como indicativo do perfil dos linfócitos T CD4+ (Th1 e/ou Th2) gerados após as quatro doses de imunização, através da presença das subclasses IgG1 e IgG2c. A análise das subclasses de IgG indica um padrão de resposta do tipo Th2 gerado pelas formulações vacinais compostas pela proteína E7 isolada e pela proteína E7 co-administrada à proteína gD já que foram detectados apenas anticorpos da subclasse IgG1. A formulação composta pela proteína gDE7 foi a única capaz de gerar anticorpos anti-E7 da subclasse IgG2c, desviando o padrão de resposta contra o antígeno E7 para o perfil Th1 (**Figura 21**). É importante salientar que os resultados obtidos neste ensaio são complementares à dosagem de citocinas secretadas por células extraídas dos baços em animais vacinados. O resultado obtido corrobora a análise das citocinas secretadas em resposta à re-estimulação *in vitro* com a proteína E7, onde a produção de IFN- γ foi bem maior no grupo que recebeu a formulação vacinal gDE7 em comparação ao grupo que recebeu somente o antígeno E7. Ao passo que não houve secreção de IL-10 neste grupo, uma citocina que sinaliza para a resposta do tipo Th2.

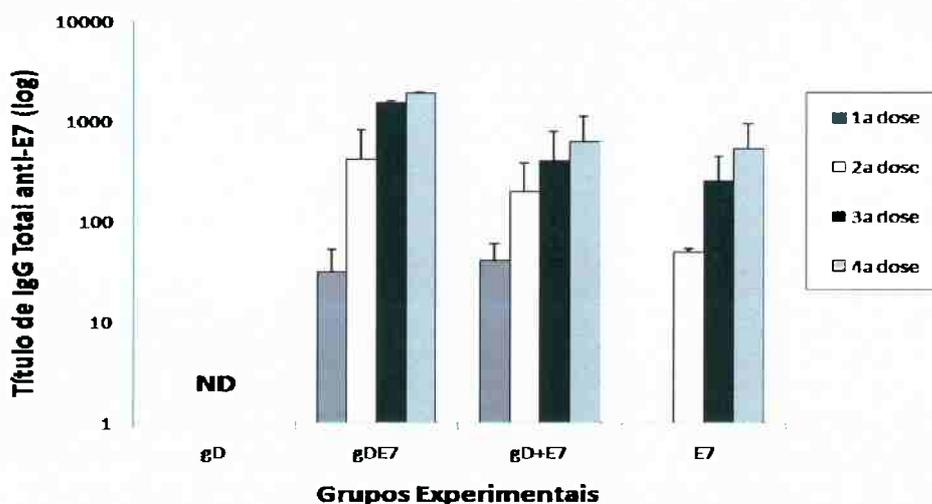


Figura 20 – Avaliação da adjuvanticidade da proteína gD nas formulações vacinais solúveis através dos níveis de anticorpos gerados contra o antígeno E7 por ensaio de ELISA. Os camundongos C57BL/6 receberam quatro doses das vacinas pela via subcutânea conforme descrito na metodologia e os soros foram coletados uma semana após cada dose. Os dados mostrados representam a média dos resultados obtidos com o soro de cinco animais analisados na forma de *pool* e as barras indicam o erro padrão de dois ensaios de Elisa. Os valores do grupo pré-imune já foram descontados dos valores presentes no gráfico. ND – título não determinado.

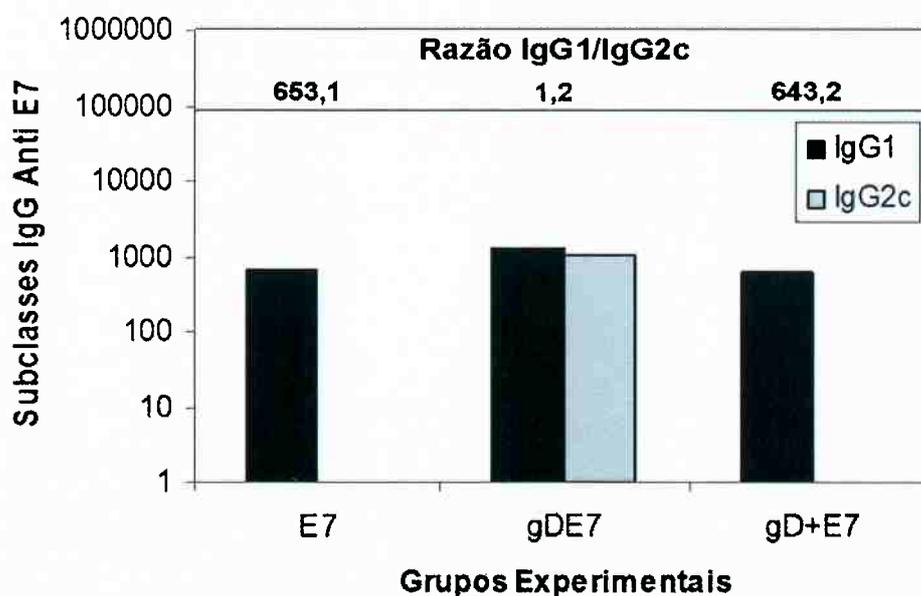


Figura 21 – Resposta de subclasses de IgG sérico contra a proteína E7. Camundongos machos C57BL/6 receberam quatro doses das formulações vacinais como descrito na metodologia. Os soros utilizados neste ensaio foram coletados uma semana após a quarta dose para dosagem por ELISA de anticorpos IgG1 e IgG2c anti-E7. Os títulos foram determinados através da média do resultado obtido em ensaio de ELISA com grupos de cinco animais.

4.1.9 Avaliação da atividade biológica das proteínas gD e gDE7 *in vitro*

Para analisar as propriedades imunomoduladoras da proteína gD é necessário que a mesma se mantenha solúvel e com atividade biológica, ou seja, com capacidade de interagir com seu receptor celular HVEM. Sabe-se que a interação gD-HVEM interfere na ligação de BTLA e CD160 ao receptor e, portanto, especula-se que os sinais co-inibitórios para linfócitos T ficam bloqueados no sítio de inoculação e próximo ao tumor, aumentando as chances do ligante LIGHT desencadear sinais co-estimulatórios para a proliferação de linfócitos e secreção de citocinas através de NF- κ B.

Realizamos um ensaio preliminar para tentar demonstrar *in vitro* a atividade biológica das proteínas geradas em sistema bacteriano, ou seja, a capacidade de interagirem com seu receptor celular, o HVEM. Desta forma, pode-se explicar os efeitos observados *in vivo* das formulações vacinais, principalmente aqueles observados com proteína de fusão gDE7. Neste ensaio utilizamos uma linhagem celular derivada de monócitos, a U937 (SCIORTINO et al., 2008) e também três anticorpos monoclonais anti-HVEM gentilmente cedidos pelo Dr Gary Cohen e Dra Roselyn Eisenberg da Universidade da Pennsylvania nos Estados Unidos. São eles: CW1, que reconhece um epítipo linear dentro do segundo CRD; CW3, que reconhece um epítipo conformacional dentro do primeiro CRD; e CW7, que reconhece um epítipo linear dentro do terceiro CRD do HVEM (WHITBECK et al., 2001). Vale salientar que dos três monoclonais, somente o CW3 interfere na ligação da proteína gD no receptor celular, sendo uma importante ferramenta na identificação da interação das proteínas no HVEM.

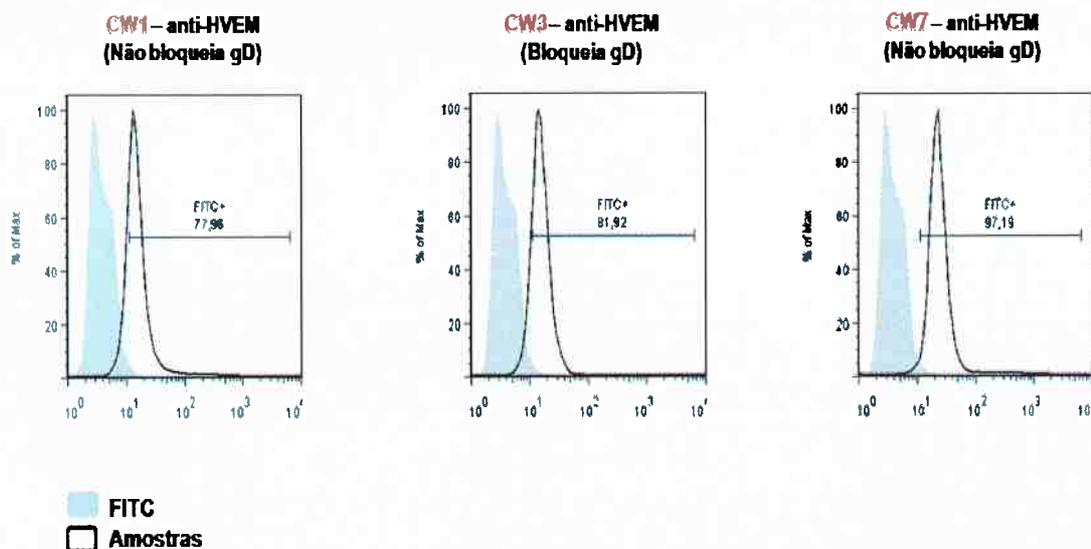
Sabe-se que além do HVEM, a gD possui outros dois receptores celulares, são eles o nectin-1 e o heparan sulfato. Os três receptores são moléculas estruturalmente não relacionadas mas cada uma pode mediar de forma independente a entrada do vírus HSV-1 em células permissivas por meio da interação com a proteína gD presente na partícula viral (STILES et al., 2008). Por isso, ensaios adicionais ainda são necessários para identificar se a interação que observamos a seguir está realmente ocorrendo com o receptor HVEM ou com os outros receptores celulares da proteína gD. Esses ensaios nos permitirão relacionar

o efeito adjuvante promovido pela proteína gD fusionada à proteína E7 em ensaios *in vivo* à interação com o receptor HVEM.

Na primeira etapa deste experimento procuramos provar que a linhagem celular utilizada realmente expressava o receptor HVEM em sua superfície e pudemos constatar, através de citometria de fluxo, que de fato a linhagem monocítica escolhida expressa o HVEM, já que todos os monoclonais utilizados foram capazes de marcar o receptor nos monócitos (**Figura 22A**). A segunda etapa do experimento consistiu em encubar os monócitos com dois microgramas de cada uma das proteínas bacterianas solúveis ou insolúveis, e analisar a interação destas proteínas no receptor através da marcação com um anticorpo monoclonal anti-gD (DL-6) por citometria de fluxo (**Figura 22B**).

Os resultados indicam que somente as proteínas solúveis obtidas após *refolding* são capazes de interagir com receptores celulares, o que já era esperado, visto que esta interação depende da conformação das proteínas. A interação da proteína gDE7 solúvel, medida pela intensidade de fluorescência parece ser maior do que a detectada pela proteína gD solúvel. Esse dado é de extrema relevância já que condiz com dados presentes na literatura que preconizam que a afinidade da proteína gD pelo receptor HVEM tende a aumentar quando porções da região C terminal desta proteína são deletadas, ou quando seqüências heterólogas são inseridas nesta região. Portanto, este é um indicativo de que pelo menos a proteína gDE7 esteja interagindo com o receptor HVEM, mas este ainda é um dado a ser confirmado com ensaios complementares.

A



B

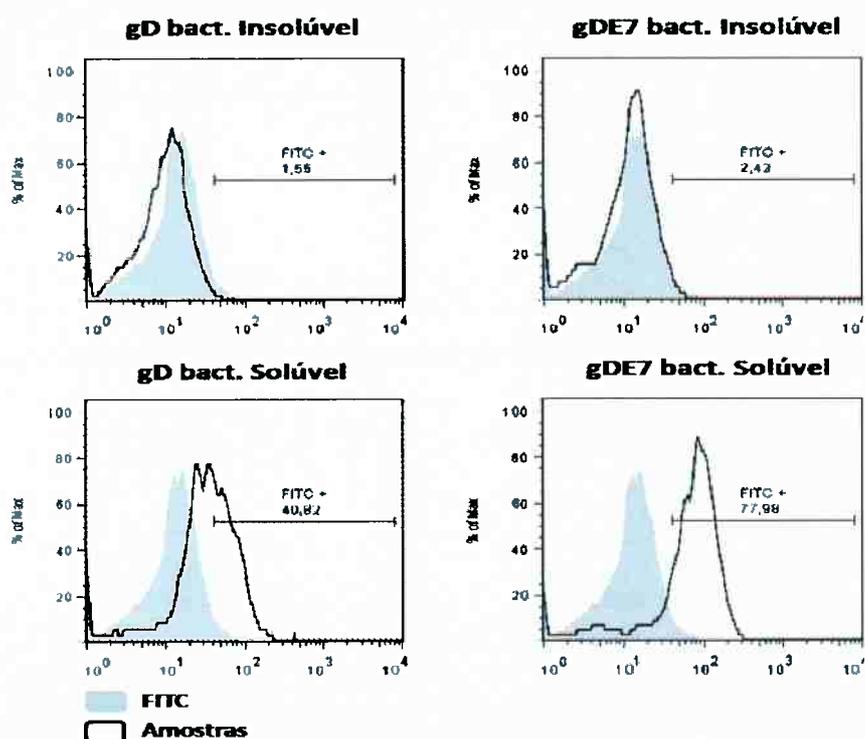


Figura 22 – Ensaio de reconhecimento do HVEM na superfície de monócitos U937 (A) e ligação das proteínas gD e gDE7 solúveis e insolúveis geradas em sistema bacteriano em monócitos (B). As proteínas foram encubadas durante uma hora com a linhagem monocítica U937, foram marcadas com o anticorpo monoclonal anti-gD DL6 e então com anticorpo secundário anti-IgG conjugado ao FITC. A intensidade da fluorescência foi analisada através de citometria de fluxo e foi considerada positiva quando superava a fluorescência atingida pelo controle negativo marcado somente com o FITC.

Devido à dificuldade inicial em obter as proteínas bacterianas na forma solúvel, iniciamos esforços na construção de vetores baculovirais para expressão dessas proteínas em células de inseto. Para essa etapa do trabalho contamos com a colaboração efetiva do Prof. Dr. Armando Moraes Ventura e da sua equipe do Instituto de Ciências Biomédicas II da USP.

ETAPA 4.2

Produção das proteínas recombinantes em sistema baculovírus/células de inseto

4.2.1 Clonagem dos genes da gD e gDE7 no vetor de transferência TOPO®

A amplificação dos genes das proteínas gD e gDE7 por PCR utilizando os iniciadores específicos listados na **tabela 3** foi o primeiro passo para a realização das clonagens no vetor TOPO®. Predições realizadas em programa computacional específico (PrimerSelect - DNASTAR, Inc., Madison, WI, USA.) sugeriam que os fragmentos obtidos por meio da técnica de PCR apresentariam tamanhos aproximados de 1000 pb e 1200 pb para os genes da gD e gDE7 respectivamente.

A clonagem dos fragmentos no vetor TOPO não requer a utilização de enzimas de restrição porque os produtos da reação de PCR podem ser imediatamente ligados ao vetor. A confirmação das clonagens foi realizada através de análise de restrição utilizando as endonucleases *Xba I* e *Bsp 120 I*. O perfil de restrição esperado dos clones gD positivos é de duas bandas: a primeira com massa molecular de ~ 5 kb e a segunda de ~ 815 pb, para os clones gDE7 positivos, são esperadas três bandas: a primeira de ~ 5 kb, a segunda de ~ 815 pb e a terceira de ~ 300 pb, sendo esta última, a banda correspondente ao gene da proteína E7 inserida dentro da gD (**Figura 23**).

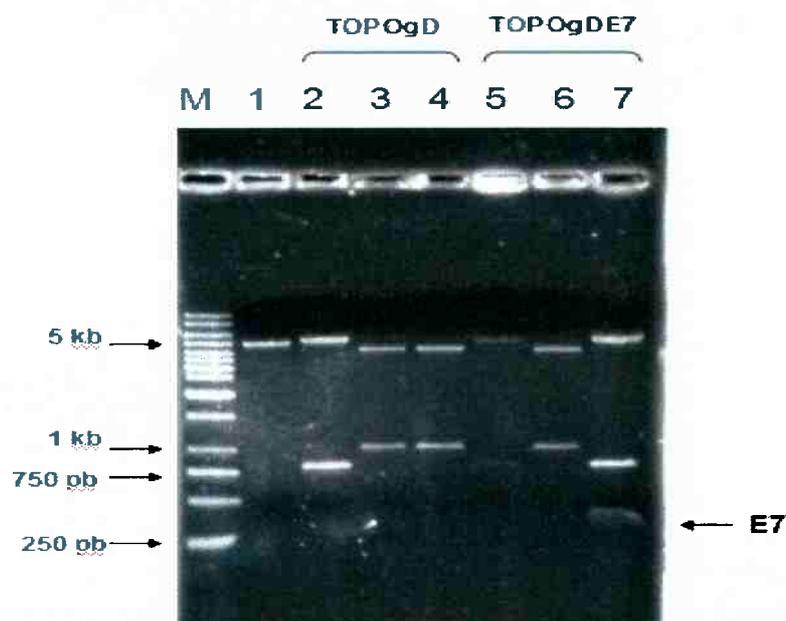


Figura 23 – Confirmação da clonagem dos fragmentos gD e gDE7 no vetor TOPO® por análise de restrição. M – Marcador molecular (Fermentas); 1 – Vetor TOPO® vazio; 2 – Clone TOPOgD positivo; 3 e 4 – Clones TOPOgD negativos; 5 – Clones TOPOgDE7 positivo; 6 – Clone TOPOgDE7 negativo; 7 – Clone TOPOgDE7 positivo.

As clonagens também foram confirmadas após análise das seqüências completas dos genes gD e gDE7 pela técnica de seqüenciamento. Os iniciadores utilizados para as reações de seqüenciamento foram:

Polyhedrina Foward: 5' AAA TGA TAA CCA TCT CGC 3'

V5 C Reverse: 5' ACC GAG GAG AGG GTT AGG GAT 3'

E7 Fw Apal : 5' CAG CTG GGC CCA TGC ATG GAG ATA CAG 3'

E7 Rv Apal: 5' CCC GGG CTG GTT TCT GAG AAC AGA TGG GGC 3'

4.2.2 Obtenção e análise dos vetores baculovirais

Todas as transfecções dos vetores TOPO juntamente com o DNA baculoviral foram realizadas com sucesso, pois foi observado o efeito citopático esperado em todos os experimentos. A visualização das placas virais foi facilitada mediante o uso do substrato cromogênico X – Gal já que todos os dois vetores gerados possuem um gene da β - galactosidase ativo. Na **figura 24** está representada a construção dos

vetores baculovirais através da recombinação dos vetores de transferência TOPOgD e TOPOgDE7 com o DNA baculoviral em células *Sf-9*.

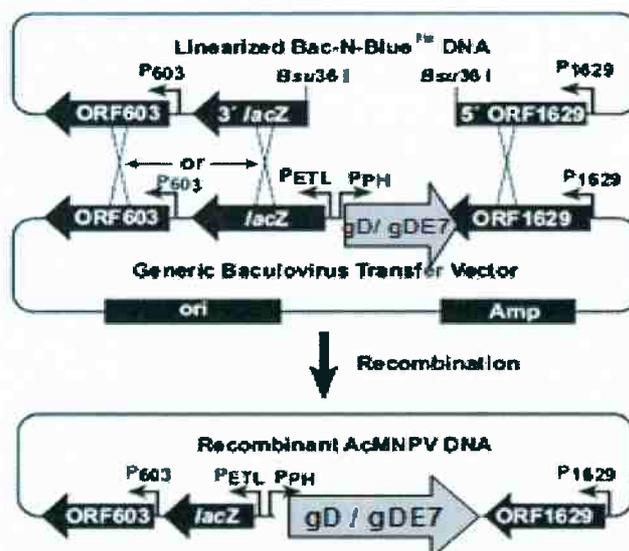


Figura 24 – Representação esquemática da recombinação dos vetores TOPOgD e TOPOgDE7 com o DNA baculoviral em *Sf-9*.

4.2.3 Análise por PCR do DNA baculoviral de primeira passagem

O objetivo dessa etapa foi verificar a presença dos genes das proteínas gD e gDE7 nas amostras virais analisadas, assim como verificar a presença de baculovírus não recombinantes. A primeira passagem dos vetores baculovirais foi realizada a partir das placas virais obtidas no passo anterior. Placas virais isoladas foram retiradas com cuidado com o auxílio de uma pipeta Pasteur estéril, e cada placa foi transferida a um poço de uma placa de 24 poços, previamente semeada com células *Sf-9*. As placas foram incubadas por três dias e uma alíquota do meio de cultura foi utilizada para a extração do DNA dos vírus e análise por PCR. A análise dos genomas baculovirais tem extrema importância já que distingue os baculovírus recombinantes dos não recombinantes mediante a utilização de iniciadores específicos para o genoma baculoviral que flanqueiam a região de clonagem dos genes da gD e gDE7. Nos vírus não recombinantes observa-se um produto de amplificação de aproximadamente 900 pb. As amostras positivas foram

identificadas pela presença de uma banda única de aproximadamente 1.9 kb e 2.1 kb para baculovírus com o gene para a gD e o baculovírus com o gene que codifica a gDE7, respectivamente. Na **figura 25** pode-se observar que muitas amostras apresentaram duas bandas de amplificação. A obtenção destas duas bandas em uma única amostra revela a presença de baculovírus não recombinantes como contaminantes.

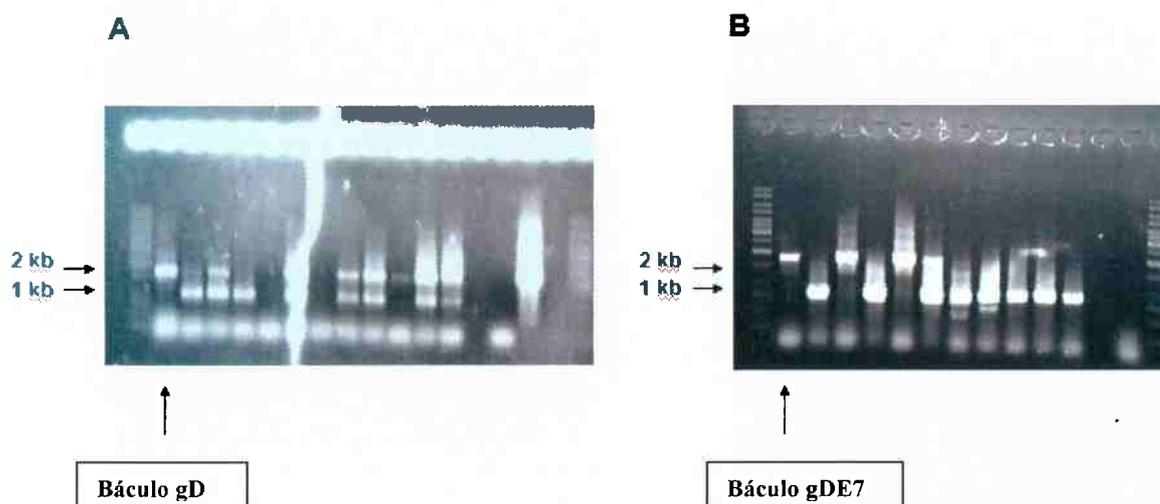


Figura 25 – Detecção de vetores baculovirais gD (A) e gDE7 (B) recombinantes. Nos vírus não recombinantes observa-se um produto de amplificação de aproximadamente 900 pb, enquanto que os vetores recombinantes têm bandas únicas esperadas de 1.9 kb e 2.1 kb para a gD e gDE7 respectivamente.

Para os ensaios de titulação viral e infecção de *Sf-9* optou-se por trabalhar com os vírus indicados pelas setas na **figura 25**, já que ambos não apresentavam contaminação com baculovírus não recombinante.

4.2.4 Titulação dos vetores baculovirais por ensaio de placa

Após o “screening” dos vetores baculovirais obtidos foram realizadas amplificações dos estoques virais até a oitava passagem. Todas as passagens foram tituladas por ensaio de placa. Ao final da oitava passagem, foram obtidos títulos virais de 2×10^8 PFU/mL para o báculo gD e 5×10^8 PFU/mL para o báculo gDE7 e esses vírus foram utilizados para o início dos ensaios de infecção de *Sf-9* e produção das proteínas gD e gDE7. Na **figura 26** está ilustrado um ensaio de titulação dos vetores gD e gDE7 de terceira passagem.

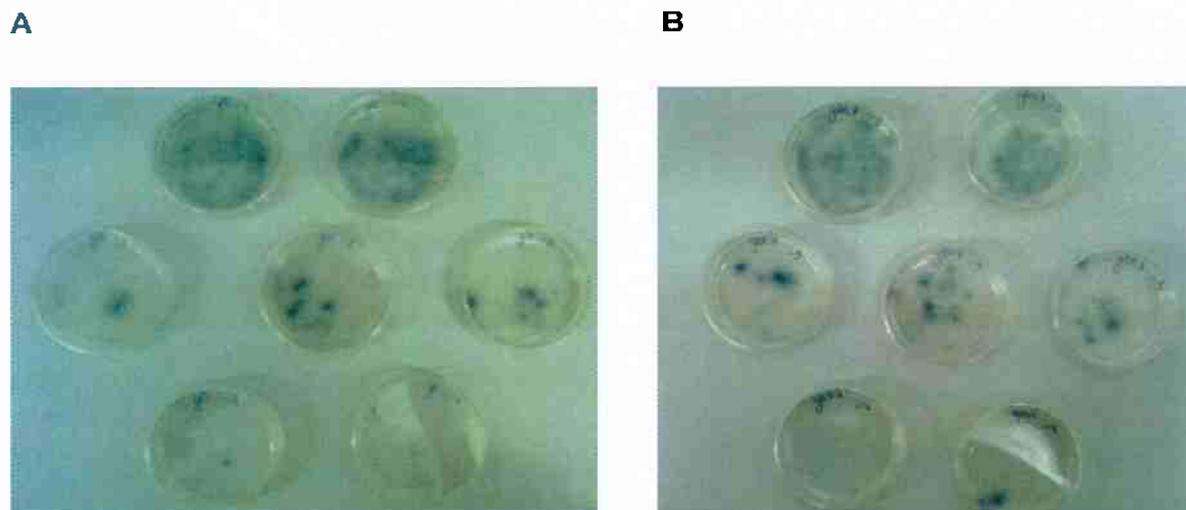


Figura 26 – Titulação da terceira passagem viral por ensaio de placa dos vetores baculovirais gD (A) e gDE7 (B). A presença das placas virais foi visualizada por causa da utilização do substrato cromogênico X-Gal que conferia às placas virais uma coloração azulada. Foram realizadas três diluições (10^{-2} a 10^{-4}) em triplicata e os títulos obtidos neste ensaio foram: 1×10^5 PFU/ mL para báculo gD e 2×10^5 PFU/mL para báculo gDE7.

4.2.5. Teste de expressão dos vetores baculovirais e purificação das proteínas recombinantes

Para analisar a expressão das proteínas recombinantes foram realizadas infecções em cultura estática de células *Sf-9* com os vetores baculovirais obtidos e titulados. A expressão da gD e da gDE7 foi analisada em uma cinética entre 72 e 120 horas. As amostras foram resolvidas em SDS-PAGE a 15% e transferidas para membrana de nitrocelulose para a realização de *western - blot*. Comprovamos com este ensaio que os dois vetores baculovirais construídos expressam as proteínas e que foi possível detectá-las no sobrenadante da cultura e na fração solúvel de *Sf-9* com 72, 96 e 120 horas pós-infecção (dados não mostrados).

Para alcançarmos a quantidade de proteínas necessária para as imunizações, contamos com a colaboração do Prof. Dr. Carlos Augusto Pereira e sua equipe do Instituto Butantan para a realização de culturas de células de inseto em biorreatores. Iniciamos os testes de expressão neste sistema empregando o vetor bgDE7 para a realização de uma cinética. A cultura foi iniciada com uma concentração de 5×10^5 células/mL e quando o crescimento atingiu 10^6 células/mL (cerca de 24 horas após o início) as células foram infectadas com o vetor baculoviral. Essa cultura foi

acompanhada durante 120 horas para a identificação do tempo exato em que atinge-se os picos de expressão e secreção da proteína para o sobrenadante da cultura (**Figura 27**). Nos ensaios de expressão que se seguiram, tanto da proteína gD como da própria gDE7, esses parâmetros foram levados em conta e os cultivos foram interrompidos com aproximadamente 65 horas após a infecção.

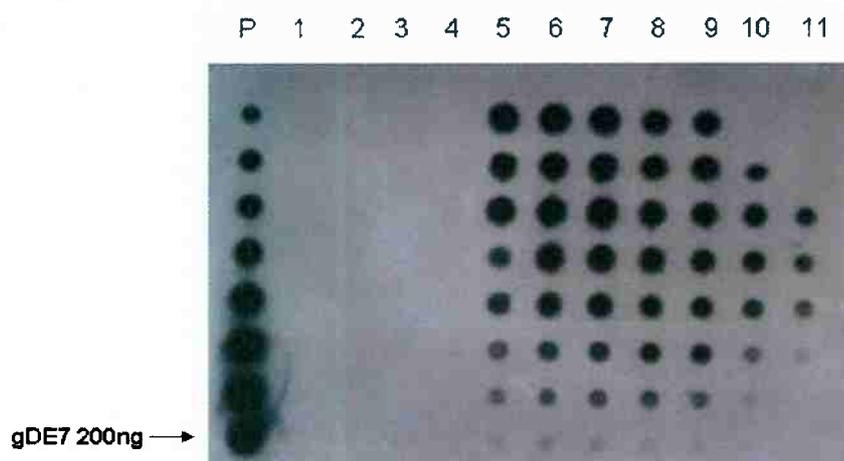


Figura 27 - Análise por densitometria da cinética de expressão e transporte para o sobrenadante da cultura da proteína gDE7 expressa em Sf-9. P) Proteína gDE7 produzida em sistema bacteriano utilizada como padrão (200ng no último poço da canaleta). 1-11) Alíquotas retiradas do cultivo desde a hora 0 (1) até a hora 120 (11) após a infecção com báculo gDE7 em intervalos de 12h. Nota-se que a proteína começa a ser expressa 48h (5) após a infecção com o vírus e o pico de expressão ocorre entre 60 e 72h (6 e 7). Imunoblot realizado com anticorpo monoclonal anti-gD (1D3).

Para os ensaios de purificação as proteínas gD e gDE7 foram expressas em culturas em biorreator a 27 °C, com rotação de 100 rpm empregando o meio SF-900 SFM (1L). As culturas de Sf-9 foram infectadas com os vetores baculovirais em uma multiplicidade de infecção (MOI) de 5 PFU/célula e após 65 horas de infecção o sobrenadante foi coletado, concentrado para 100 mL, dialisado como previamente descrito na metodologia e purificado no AKTA-FPLC (GE). Os cromatogramas obtidos estão apresentados nas **figuras 28 e 29**.

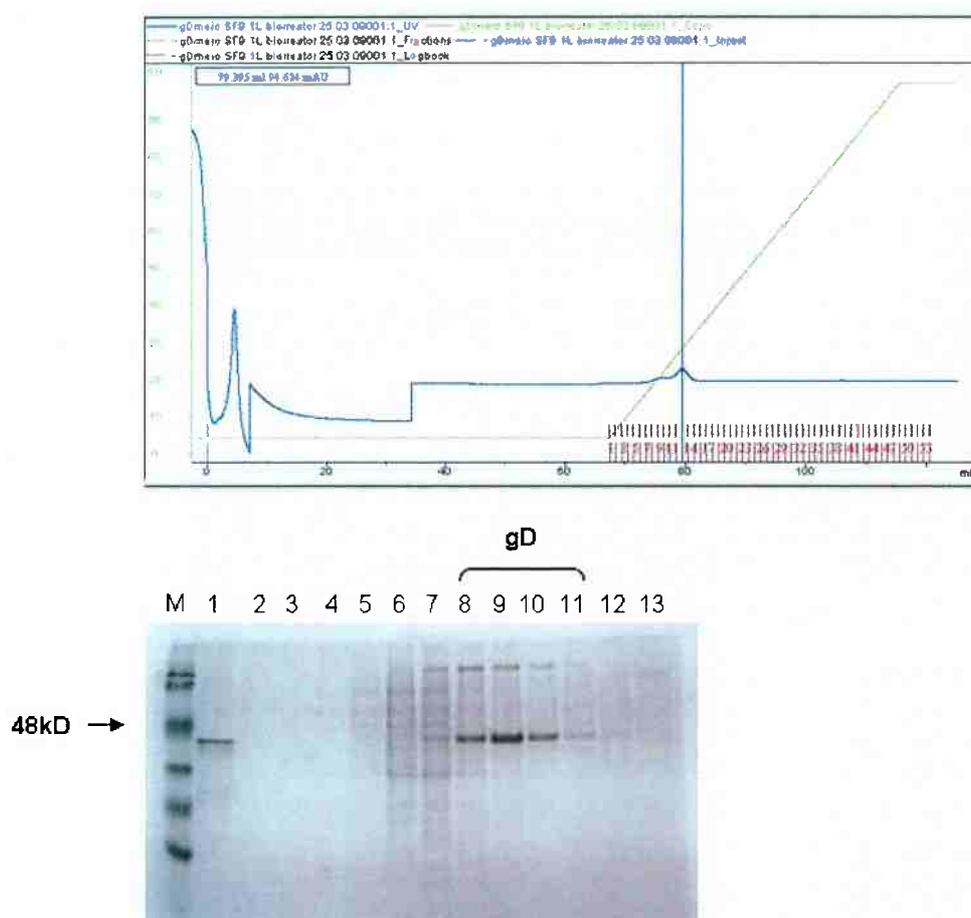


Figura 28 - Purificação da proteína gD presente no sobrenadante de cultura de Sf-9. Cromatograma representativo do processo de purificação e caracterização em SDS – PAGE a 15% das frações coletadas. **M** – Marcador de peso molecular, **1** – gD purificada (padrão), **2-13** – Frações coletadas na purificação. A proteína gD encontra-se concentrada nas frações 8 a 11.

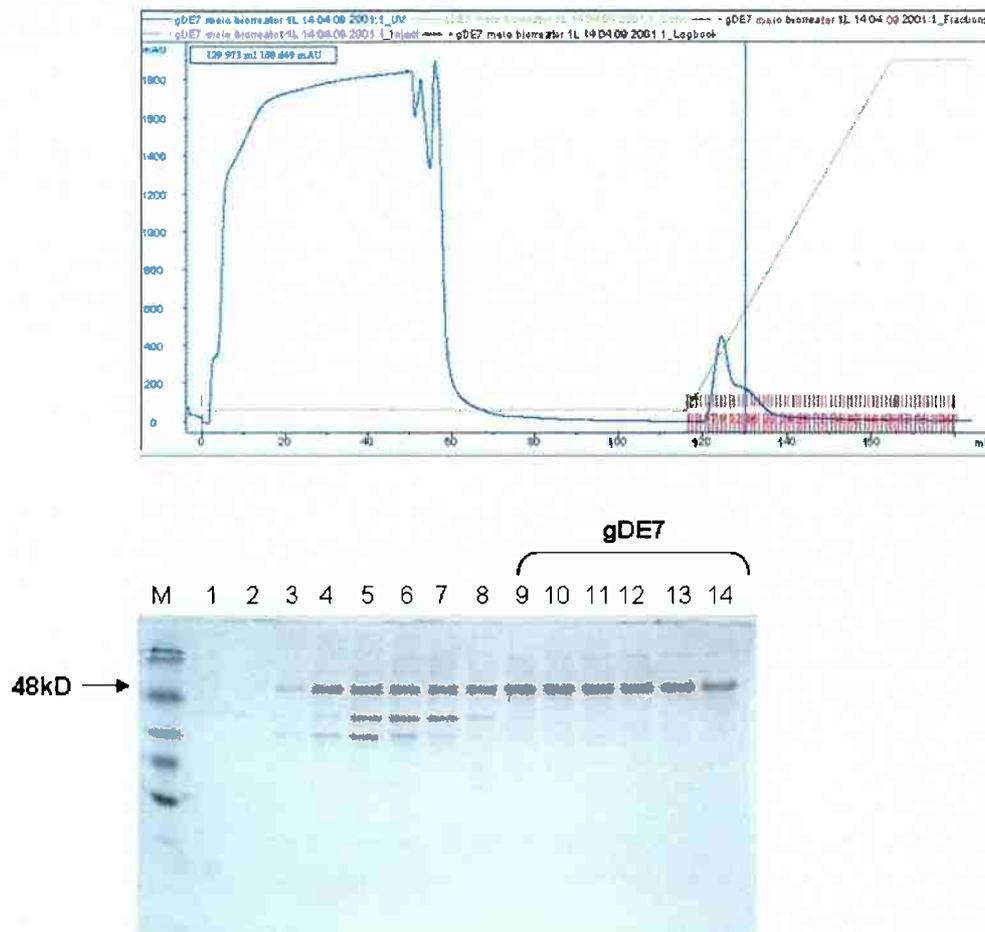


Figura 29 - Purificação da proteína gDE7 presente no sobrenadante de cultura de Sf-9. Cromatograma representativo do processo de purificação e caracterização em SDS – PAGE a 15% das frações coletadas. **M** – Marcador de peso molecular, **1-14** – Frações coletadas na purificação. A proteína gDE7 encontra-se concentrada nas frações 9 a 14.

A partir de 1 litro de cultura de Sf-9 foi possível obter um rendimento após a purificação de 1 mg/L da proteína gD e 1,2 mg/L da proteína gDE7. Infelizmente a quantidade de proteína obtida neste sistema é bem inferior á quantidade necessária para se realizar as imunizações e as análises feitas com as proteínas obtidas nos sistema bacteriano. Por esse motivo, realizamos somente um teste preliminar que demonstra que as proteínas obtidas em sistema eucariótico estão providas de atividade biológica, visto que a capacidade de interação com receptores celulares que pode ser o HVEM parece estar preservada. Este ensaio foi realizado nas

mesmas condições descritas com as proteínas bacterianas, utilizando a mesma linhagem monocítica U937 e os monoclonais anti-HVEM e anti-gD. Os resultados gerados por citometria de fluxo sugeriram que tanto a proteína gD quanto a proteína gDE7 foram capazes de ligar nos monócitos, possivelmente através do HVEM (**Figura 30**). Esse resultado era aguardado já que a chance dessas proteínas apresentarem uma conformação mais próxima da nativa é maior do que as proteínas geradas em sistema bacteriano, mesmo após *refolding*.

Devido à falta de tempo para concluir os estudos com as proteínas geradas em sistema baculovírus/células de inseto, os passos seguintes de otimização de cultivo para melhora de rendimento e os ensaios *in vivo* de proteção tornam-se perspectivas para um trabalho futuro, visto o potencial antitumoral observado com a proteína de fusão gDE7 bacteriana purificada.

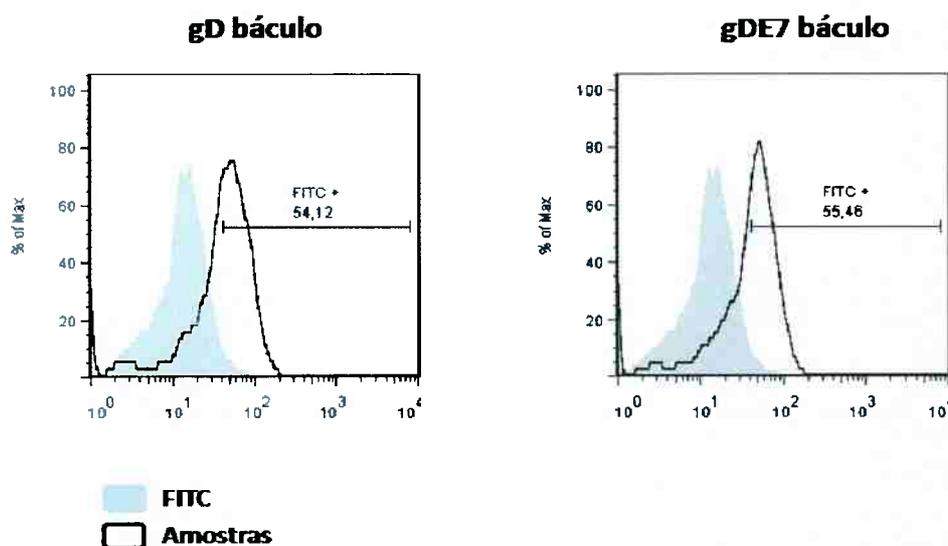


Figura 30 – Ensaio de ligação das proteínas gD e gDE7 produzidas em sistema eucarioto em monócitos, possivelmente através do receptor celular HVEM. As proteínas foram encubadas durante uma hora com a linhagem monocítica U937, foram marcadas com o anticorpo monoclonal anti-gD DL6 e então com anticorpo secundário anti-IgG conjugado ao FITC. A intensidade da fluorescência foi analisada através de citometria de fluxo e foi considerada positiva quando superava a fluorescência atingida pelo controle negativo marcado somente com o FITC.

5 DISCUSSÃO

O uso de estratégias vacinais para controle de tumores é objeto de estudo de vários grupos de pesquisa em todo o mundo. A idéia de que células tumorais adaptam-se e podem evadir-se de respostas imunológicas antitumorais é convidativa para o desenvolvimento de imunoterapias que contornem os mecanismos de escape de tumores. Além disso, existem muitas vantagens em se utilizar estas estratégias, como a baixa toxicidade e alta especificidade, quando comparada às terapias tradicionais, como a quimioterapia e a radioterapia.

Dentre as proteínas do HPV-16, a oncoproteína E7 é a melhor caracterizada imunologicamente e a mais empregada em estratégias vacinais contra tumores associados a esse vírus. Sabe-se que ela é expressa continuamente nos tumores e caracterizada pela baixa imunogenicidade, o que pode acarretar em torerização do antígeno tumoral pelo sistema imune (TINDLE, 2002). Há relatos na literatura de que o HPV explora a redundância do código genético e assim utiliza códons raros à célula hospedeira reduzindo a expressão de genes virais. Assim, tornam-se reduzidas as chances de apresentação via MHC-I. Devido a esse fato, a grande maioria das estratégias vacinais contra tumores cervicais que utilizam a E7 como antígeno, faz uso de adjuvantes nas formulações. Diferente das vacinas profiláticas contra patógenos que requerem títulos protetores de anticorpos, as vacinas terapêuticas contra o câncer necessitam ativar respostas imunológicas do tipo celular, sobretudo, aquelas mediadas por linfócitos T citotóxicos (CTLs). De acordo com alguns trabalhos publicados, há uma estreita relação entre a geração de CTLs específicos contra E7 e a proteção frente ao desafio com células TC-1 (RODEN et al., 2004; KIM, 2004; LASARO et al., 2005; LASARO et al., 2008). Porém, infelizmente, as vacinas baseadas em células T ainda não se tornaram uma realidade pois não se conhecem adjuvantes adequados para tais tipos de vacinas (APPAY et al., 2008).

Lasaro e colaboradores (2005) desenvolveram no Centro de Vacinas e Terapia Gênica (CEVAT – GENE) da Universidade de São Paulo, uma vacina de DNA baseada na expressão da oncoproteína E7 do HPV-16 fusionada geneticamente com a glicoproteína D do Herpes simplex vírus 1 (HSV-1). Os animais imunizados com essa formulação apresentaram proteção profilática de 100% quando desafiados

com a linhagem tumoral TC-1, enquanto a abordagem terapêutica alcançou 40% de eficácia após quatro doses das vacinas. Os resultados foram atribuídos às propriedades adjuvantes da proteína gD codificada pelas vacinas de DNA. Embora o mecanismo preciso de ativação associado à proteína gD sobre o sistema imune ainda não seja totalmente conhecido, os resultados relativos à ativação de linfócitos T citotóxicos se mostraram muito promissores e levaram ao presente estudo em que avaliamos o papel adjuvante da proteína gD quando usada na forma de proteína purificada e não mais como vacina de DNA em que a proteína é codificada pelas células transfectadas.

Ainda não existem modelos ideais para o estudo de imunoterapias contra tumores em humanos. Os testes de novas vacinas são frequentemente feitos em pacientes em que a patologia já se encontra avançada e possivelmente outras estratégias de contenção já foram empregadas (MOCCELIN et al., 2004). Os modelos animais, apesar de não substituírem os testes clínicos, podem ser ferramentas úteis para o melhoramento de sistemas de entrega das formulações vacinais e desenvolvimento de novos adjuvantes, além, é claro da elucidação de respostas imunológicas protetoras (FINN et al., 2003). O modelo adotado no presente estudo baseia-se no uso das células TC-1 provenientes do epitélio pulmonar de camundongos C57BL/6, imortalizadas pelas oncoproteínas E6 e E7 do HPV-16, e transformadas por uma cópia do gene *c-ras* mutado. Quando inoculadas pela via subcutânea em camundongos da mesma linhagem, observa-se o crescimento de um tumor localizado que expressa os antígenos E6 e E7 do HPV-16 encontrados em lesões do colo uterino em humanos. Amplamente empregado por grupos dedicados à pesquisa de vacinas voltadas para o controle profilático e/ou terapêutico de tumores induzidos pelo HPV-16, a inoculação de células TC-1 no flanco de camundongos representou uma ferramenta essencial para que pudéssemos demonstrar o efeito vacinal das formulações testadas. Nota-se, porém algumas limitações em relação ao processo tumoral observado em seres humanos. Por exemplo, ao contrário do que se observa em humanos nos quais os tumores apresentam crescimento lento (muitas vezes décadas), o crescimento das células TC-1 é rápido e, aproximadamente $7,5 \times 10^4$ células são implantadas artificialmente em um sítio histológico onde normalmente não seriam encontradas. Tais diferenças dificultam a interpretação de resultados encontrados, sobretudo em se tratando de

vacinas com caráter preventivo para o crescimento de tumores. No entanto, em relação ao teste de efeitos vacinais terapêuticos, no qual o processo tumoral no paciente já se encontra em estado avançado e as metastases representam uma característica comum, a inoculação de células TC-1 representa um modelo experimental que reproduz de forma similar as condições clínicas esperadas para pacientes com tumores associados ao HPV-16.

Nas duas últimas décadas, o sistema procariótico de expressão, particularmente *E. coli*, vem sendo muito explorado para a produção de proteínas de valor biotecnológico em escala industrial. As bactérias são normalmente escolhidas para expressão de proteínas heterólogas porque oferecem condições de crescimento de baixo custo, acumulam biomassa rapidamente, permitem a implantação de processos simples de escalonamento além da possibilidade de cultivos de alta densidade (SAHDEV, KHATTAR e SAINI, 2008). Tendo em vista essas vantagens, resolvemos expressar as proteínas gD e gDE7 em sistema bacteriano. Nossas construções se basearam nas seqüências destas proteínas presente nos vetores pRE4 e pRE4E7 (LASARO et al., 2005), porém, algumas modificações foram feitas nas moléculas para a expressão em sistema bacteriano. Retiramos o peptídeo sinal e a região transmembrana da seqüência nativa da gD porque acreditávamos que facilitaria a expressão destas proteínas no extrato solúvel bacteriano. Porém, as proteínas expressas neste sistema só puderam ser recuperadas no extrato insolúvel de *E. coli*. De acordo com Steinberg, Watson e Maiese (1986) e Li, M., Li, X. e Liu (2002), a hidrofobicidade da gD expressa em bactérias se deve justamente à porção transmembrana localizada na região C-terminal. Diversas tentativas foram feitas para obter essas proteínas na forma solúvel como, por exemplo, realizando os cultivos a temperaturas mais baixas e com menor rotação. No entanto, não foi possível obter as proteínas gD e gDE7 no extrato solúvel de *E. coli*. Deste modo, foi preciso realizar as purificações utilizando tampões desnaturantes capazes de solubilizar os corpúsculos de inclusão. Ao final dos processos de purificação utilizando cromatografia de afinidade ao níquel, obtivemos um rendimento de 0.055 g/L da proteína gD e 0.05 g/L da proteína gDE7.

Para a realização dos ensaios *in vivo* de proteção e análise de resposta imunológica foi necessário retirar a uréia presente nos tampões utilizados na purificação das proteínas. Diversos métodos de retirada do agente desnaturante

foram testados: remoção da uréia utilizando sacos de diálise, diálise em coluna de cromatografia (LI, SU e JANSON, 2004; CABRITA e BOTTOMLEY, 2004) e diálise por diluição. Todos eles resultaram na completa precipitação das proteínas recombinantes, deixando claro que o *refolding* não estava sendo conduzido de forma correta. Iniciamos os ensaios de imunização com as proteínas insolúveis e precipitadas porque até então não era possível obter proteínas solúveis suficientes para administrar nos animais.

O primeiro ensaio de proteção profilática se mostrou promissor já que a formulação compreendida pela proteína de fusão gDE7 insolúvel foi capaz de proteger 80% dos animais mediante desafio com TC-1. Enquanto o grupo imunizado com a proteína E7 co-administrada à gD mostrou proteção de 20% frente ao desafio com células TC-1. Ensaios de análise de resposta imunológica foram realizados e constatamos que a proteína gDE7 foi capaz de estimular a ativação de linfócitos T CD8+ em níveis estatisticamente diferentes em relação ao antígeno E7 administrado sozinho ou a gD co-administrada à E7. Porém, a porcentagem de lise específica das células-alvo sensibilizadas *in vitro* com o peptídeo E7 variou bastante entre os animais e não observamos diferenças significativas em relação ao grupo controle imunizado com a proteína E7. Esse dados sugerem que um percentual dos linfócitos T CD8+/IFN- γ + detectados no grupo gDE7 estão ativados, mas sua atividade efetora é reduzida. Não acreditamos que o efeito antitumoral da proteína gDE7 insolúvel observado seja resultado de imunomodulação da gD através da interação com o receptor celular HVEM, visto que as proteínas foram administradas na forma insolúvel na qual a estrutura nativa está alterada. De acordo com NATALE et al. (2000), a proteína E7 isolada possui baixa imunogenicidade devido à sua estreita meia vida intracelular. Logo, o efeito antitumoral da gDE7 insolúvel pode ser explicado pelo fato de que, quando fusionada à gD, a proteína E7 aumenta sua estabilidade intracelular, particularmente em APCs e, desta forma, pode ser apresentada de forma mais eficiente a linfócitos T após processamento e acoplamento a moléculas de MHC-I.

Proteínas purificadas e solúveis foram obtidas somente após a diálise realizada em aparelho de filtração tangencial onde a uréia foi retirada de forma mais gradual por meio de tampões com concentrações decrescentes de uréia. Utilizando esta estratégia, conseguimos que aproximadamente 20% do rendimento final da proteína

recombinante na forma solúvel após a completa retirada da uréia. Empregando a proteína gDE7 solúvel, atingimos valores de proteção profilática antitumoral de 100% dos animais após quatro doses. A proteção permaneceu em 100% após um segundo desafio com a mesma carga de células TC-1.

Um ensaio de cinética de doses e análise de proteção demonstrou a proteção seque uma relação dependente de dose. Quatro doses foram realmente necessárias para a formulação vacinal gDE7 conferir 100% de proteção enquanto que três doses da vacina protegeram 70% dos animais, duas doses foram capazes de proteger 60% dos animais desafiados e uma dose não conferiu proteção. Em contrapartida, a combinação gD+E7 solúvel não protegeu os animais desafiados com as células TC-1. Portanto a fusão genética da proteína E7 à proteína gD é, de fato, importante para que ocorra proteção anti-tumoral. A capacidade adjuvante da proteína gD quando fusionada ao antígeno E7 também pode ser confirmada pelo aumento das respostas celulares e humorais E7-específica induzidas. Esses perfis foram demonstrados pelas seguintes observações: 1) a detecção de linfócitos TCD8⁺ IFN- γ ⁺ por ICS foi mais elevada no grupo tratado com a proteína gDE7 em comparação com aquele tratado com o antígeno isolado, e essa diferença fica ainda maior quando a detecção é feita após o segundo desafio; 2) a porcentagem de lise E7-específica de células alvo *in vivo* por linfócitos TCD8⁺ citotóxicos do grupo tratado com gDE7 foi maior em relação aos grupos tratado com o antígeno E7 isolado ou no grupo tratado com a gD co-administrada à E7; 3) citocinas do tipo Th1 (IFN- γ) foram detectadas em níveis significativamente maiores no grupo imunizado com a formulação gDE7 do que no grupo imunizado com o antígeno E7 isolado; 4) presença de anticorpos da subclasse IgG2c no soro dos animais imunizados com a proteína gDE7, indicando que a proteína de fusão tende a mudar o padrão de resposta para Th1 em relação aos grupos imunizados com o antígeno isolado, corroborando com o resultado obtido na dosagem de citocinas. A proteção terapêutica antitumoral da formulação vacinal compreendida pela proteína de fusão gDE7 solúvel atingiu 30% dos animais após as quatro doses e permaneceu protetora durante os 60 dias de observação.

Existem atualmente duas hipóteses que explicam os mecanismos de ativação do sistema imune exercidos pela proteína gD e ambas baseiam-se na interação da proteína com o receptor celular HVEM e ativação do ativador transcricional NF- κ B. A primeira hipótese, preconiza que a proteína gD bloqueia a via inibitória exercida

pelas interações de BTLA e CD160 com o HVEM no sistema imune. Diversos trabalhos já demonstraram que o sítio de interação da proteína gD no receptor HVEM coincide com o sítio de ligação de BTLA e CD160 (CONNOLLY et al., 2002; CROFT, 2005; LASARO e ERTL, 2009). Desta forma, por meio de competição, a gD impede a interação desses dois ligantes no receptor HVEM permitindo a ativação de NF- κ B mediada pelo ligante LIGHT cujo sítio de interação no receptor HVEM permanece livre após ligação da gD. E o resultado é a ativação e proliferação de linfócitos e secreção de citocinas pró-inflamatórias após contato com APCs ativadas. A segunda hipótese é embasada em um trabalho publicado recentemente que demonstra que a proteína gD por si só, é capaz de ativar NF- κ B através da interação com HVEM, sem interferência da sinalização pelo LIGHT (CHEUNG et al., 2009).

Para melhor entendermos os efeitos da formulação vacinal gDE7 observados *in vivo*, realizamos um ensaio para avaliar a capacidade de interação da proteína recombinante com os receptores celulares de APCs. Utilizamos a linhagem monocítica U937 que sabidamente expressa o HVEM (SCIORTINO et al., 2008) e incubamos as diversas formas da gD e gDE7 produzidas em nosso estudo. Os resultados gerados por citometria de fluxo mostraram que as proteínas insolúveis perderam a capacidade de ligar nos receptores, visto que as interações são normalmente dependentes da conformação das proteínas. Já as proteínas solúveis, expressas tanto no sistema bacteriano quanto em células de inseto, foram capazes de ligar-se aos monócitos. Em particular, a interação da proteína gDE7 solúvel bacteriana, medida pela intensidade de fluorescência, mostrou-se superior àquela detectada com a proteína gD solúvel bacteriana. Rux e colaboradores (1998) demonstraram que a proteína gD possui quatro regiões funcionais ao longo de sua seqüência. Ensaio de ligação ao receptor HVEM utilizando formas deletadas da proteína gD, mostraram que a afinidade da proteína quando deletada da região C-terminal aumentou cerca de 100 vezes em relação à gD nativa. Preconiza-se que a região funcional quatro da gD, localizada na região C-terminal, modula a ligação da proteína gD ao receptor HVEM por meio da interação com a porção N-terminal da proteína, local onde está localizada o domínio estrutural da proteína gD que sabidamente interage com o receptor HVEM. Quando a região C-terminal da gD é retirada ou modificada, ocorre uma alteração estrutural que libera a porção N-terminal de modo a permitir uma interação mais eficiente com o receptor HVEM.

Acredita-se que a inserção de seqüências heterólogas na região C-terminal da gD tenha um efeito semelhante e exerça o mesmo efeito sobre o grau de afinidade da gD pelo HVEM.

Sabe-se que além do HVEM, a gD possui outros dois receptores celulares, são eles o nectin-1 e o heparan sulfato. Ensaio adicionais são necessários para confirmar se a ligação das proteínas solúveis nos monócitos detectada pelo ensaio de citometria de fluxo está ocorrendo de fato no HVEM. Só assim poderemos afirmar que o efeito adjuvante da proteína gD solúvel observado nos ensaios *in vivo* é decorrente da interação com HVEM, e não somente resultado da melhora do sistema de entrega do antígeno ao sistema imune, como é o provável caso da proteína gDE7 insolúvel.

Além das respostas que privilegiam o controle e proteção contra tumores induzidos pelo HPV-16, também buscamos respostas de anticorpos neutralizantes contra o HSV-1 mediadas pela proteína gD. Altos níveis de anticorpos anti-gD específicos foram detectados nos soros dos animais após a quarta dose de imunização. Testes de neutralização viral foram realizados com a utilização do HSV-1 da cepa F e das misturas dos soros gerados após a quarta dose de imunização. Os resultados obtidos mostram que os anticorpos gerados com a proteína gDE7 não foram capazes de neutralizar a infecção do vírus HSV-1 em células Vero. Os soros considerados neutralizantes foram gerados com a proteína gD administrada de forma isolada, o soro gerado com a gD co-administrada a E7 e o soro gerado com a vacina de DNA pRE4, sendo que esse último, utilizado também como controle positivo com 100% de neutralização das partículas virais.

Sabemos que a conformação das proteínas é crucial para a geração de anticorpos neutralizantes anti-HSV-1. A proteína gD administrada em nossas formulações vacinais além de ter a porção C-terminal deletada, pode ter adquirido uma conformação diferente da proteína gD nativa após o *refolding*, prejudicando a geração dos anticorpos neutralizantes contra o HSV-1 nos mesmos níveis que a vacina de DNA. Isso é mais evidente no caso da gDE7, a proteína E7 inserida dentro da gD deve ter modificado significativamente a estrutura quaternária da proteína a ponto de não deixar disponível os epítomos necessários para a geração dos anticorpos neutralizantes anti-HSV-1. Esse perfil foi observado tanto no soro gerado na imunização com a proteína gDE7 purificada quanto no soro gerado na

imunização com a vacina de DNA pgDE7. Portanto, com os resultados de neutralização do HSV-1, descartamos o potencial bivalente da formulação vacinal da proteína purificada gDE7 produzida em sistema bacteriano.

Devido à dificuldade na obtenção de proteínas solúveis expressas no sistema bacteriano, iniciamos a construção de vetores baculovirais para a expressão das proteínas recombinantes em células de inseto. Para a expressão em sistema eucarioto, a região transmembrana também foi retirada, mas o peptídeo sinal foi mantido, para facilitar a recuperação das proteínas solúveis no meio de cultura. Os fragmentos gD/gDE7 foram clonados em vetor de transferência TOPO® e transfectados juntamente com o DNA linear do baculovírus em células *Sf-9*, dando origem aos baculovírus recombinantes gD e gDE7. Concluímos que os dois vetores construídos expressam as proteínas de interesse e que as mesmas foram encontradas tanto no sobrenadante de culturas estáticas como na fração solúvel das células *Sf-9* no período entre 48 e 120 horas pós-infecção. Para os ensaios de purificação, as proteínas gD e gDE7 foram coletadas do meio após cultivo das células em biorreator após 65 horas de infecção com os vetores baculovirais em uma multiplicidade de infecção (MOI) de 5 PFU/célula. O rendimento após purificação dessas proteínas chegou a aproximadamente 1mg/L da proteína gD e 1,2mg/L da proteína gDE7.

Os dados de expressão e purificação da proteína gDE7 em *E. coli* e em sistema baculovírus/células de inseto são inéditos e devem compor, juntamente com os dados gerados a partir das imunizações, um artigo científico a ser publicado em periódico de circulação internacional. Infelizmente as quantidades obtidas das proteínas no sistema baculoviral não foram suficientes para a realização dos ensaios *in vivo*, como foram conduzidos com as proteínas geradas em sistema bacteriano. Portanto, a otimização do cultivo e os ensaios *in vivo* se tornam perspectivas de um trabalho futuro, visto os efeitos observados com a formulação vacinal composta pela gDE7 produzida em sistema bacteriano.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Baseando-se nos resultados obtidos durante a execução do presente estudo podemos chegar às seguintes conclusões:

1) Foi possível clonar e expressar o gene que codifica para as proteínas gD e gDE7 em vetor de expressão em *E. coli*. As seqüências clonadas possuem uma cauda de seis resíduos de histidina e foram confirmadas pela técnica de seqüenciamento. As proteínas expressas neste sistema permaneceram no extrato insolúvel de *E. coli*, mesmo após várias tentativas de solubilização e otimização das condições de cultivo;

2) Conseguimos purificar as proteínas a partir do extrato insolúvel de *E. coli* quando tampões contendo 8M de uréia foram utilizados para solubilizar os corpúsculos de inclusão. O rendimento de produção após purificação alcançou 0,055 g/L para a proteína gD e 0,05 g/L para a proteína gDE7;

3) As proteínas insolúveis provenientes das diálises foram administradas na forma desnaturada por via subcutânea em camundongos C57BL/6 para a análise da resposta imunológica e de proteção contra desafio com TC-1. Camundongos imunizados de forma profilática com a formulação vacinal gDE7 insolúvel e desnaturada ficaram protegidos em 80% após desafio com a linhagem tumoral TC-1. Já o grupo imunizado com as proteínas co-administradas gD+E7 apresentaram valores de proteção de 20% após o desafio com as células tumorais. Provavelmente o efeito adjuvante da proteína gD na formulação vacinal não é dependente da interação com o receptor HVEM e deve refletir uma melhor entrega do antígeno E7 às células apresentadoras de antígeno e o aumento da sua persistência intracelular;

4) Ensaio de ELISPOT confirmaram a secreção de IFN- γ pelos esplenócitos dos animais imunizados com a gDE7 em relação ao grupo imunizado somente com a proteína E7;

5) Proteínas solúveis provenientes do extrato insolúvel bacteriano foram obtidas a partir do *refolding* realizado em aparelho de filtração tangencial no qual a

uréia foi retirada. Utilizando esse sistema de purificação conseguimos que aproximadamente 20% das proteínas purificadas permanecessem a forma solúvel após a completa retirada da uréia;

6) A proteção profilática antitumoral da formulação vacinal compreendida pela proteína de fusão gDE7 solúvel atingiu 100% dos animais após quatro doses e permaneceu protetora perante segundo desafio com a mesma carga de células TC-1. A capacidade adjuvante da proteína gD quando fusionada ao antígeno E7 também foi confirmada pelo aumento das respostas celular e humoral E7-específica induzidas:

- a) detecção de linfócitos TCD8⁺ IFN- γ ⁺ por ICS foi mais elevada no grupo tratado com a proteína gDE7 em comparação com aquele tratado com o antígeno isolado;
- b) a porcentagem de lise E7-específica de células alvo in vivo por linfócitos TCD8⁺ citotóxicos do grupo tratado com gDE7 foi maior em relação aos grupos tratado com o antígeno E7 isolado e tratado com a gD co-administrada à E7;
- c) citocinas do tipo Th1 (IFN- γ) foram detectadas em níveis significativamente maiores no grupo imunizado com a formulação gDE7 do que no grupo imunizado com o antígeno E7 isolado;
- d) a detecção de anticorpos da subclasse IgG2c no soro dos animais imunizados com a proteína gDE7 mostrou que a proteína de fusão tende a mudar o padrão de resposta imunológica induzida para um padrão Th1 em relação aos grupos imunizados somente com o antígeno E7, corroborando com o resultado obtido na dosagem de citocinas.

7) Testes de neutralização viral contra o HSV-1 foram realizados para investigação do potencial bivalente da formulação vacinal gDE7 mediado pela proteína gD. Os resultados obtidos neste ensaio revelaram que o soro gerado com a proteína gDE7 não foi capaz de neutralizar o vírus HSV-1. Os soros considerados neutralizantes nos ensaios foram aqueles em que a proteína gD foi administrada nos animais de forma isolada.

8) A proteção terapêutica antitumoral da formulação vacinal da gDE7 solúvel alcançou 30% dos animais previamente inoculados com células tumorais quando administrada próxima ao sítio do tumor e 20% quando administrada em um sítio distante do tumor;

9) Detectamos através de citometria de fluxo a interação das proteínas solúveis produzidas durante a execução deste trabalho com monócitos U937, células que expressam o HVEM em sua superfície. Ensaio complementares ainda são necessários para confirmar se a interação detectada ocorre com o receptor celular HVEM;

10) Os genes da proteína gD e da gDE7 foram clonados e expressos em sistema baculovírus/células de inseto e as proteínas solúveis puderam ser coletadas e purificadas a partir do sobrenadante das culturas. Após a purificação, alcançamos rendimentos de 1mg/L da proteína gD e 1,2 mg/L da proteína gDE7. Infelizmente as quantidades obtidas não foram suficientes para a realização de ensaios *in vivo*, e por esse motivo, se tornam perspectivas para um trabalho futuro visto o potencial antitumoral promissor alcançado pela proteína gDE7 solúvel gerada em sistema bacteriano de expressão.

REFERÊNCIAS*

ALVES, A.M.B et al. DNA immunization against CFA/I fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). **Vaccine**, v. 19, p. 788-795, 2001.

APPAY, V.; DOUEK, D.C.; PRICE, D.A. CD8+ T cell efficacy in vaccination and disease. **Nat. Med.**, v.14, n. 6, p. 623-8, 2008.

ARMSTROG, D.J.; ROMAN, A. The anomalous behavior of the human papillomaviruses type 16 E7 protein is due to de high content of acidic amino acid residues. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 192, p. 1380-87, 1993.

AURELIAN, L. et al. Immune responses to herpes simplex virus in guinea pigs (footpad model) and mice immunized with vaccinia virus recombinants containing herpes simplex virus glycoprotein D. **Rev. Infect. Dis.**, v. 13, p. 924-934, 1991.

AURELIAN, L. Herpes simplex virus type 2 vaccines: new ground for optimism? **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v.11, n. 3, p. 437-445, 2004.

AVIGAN, D. Dendritic cell/tumour fusions vaccine. **Dev Biol.**, v. 116, p. 179-86, 2004.

BARBER, D.L.; WHERREY, E.J.; AHMED, R. Cutting Edge: In vivo killing by memory CD8 T cells. **J. Immunol.**, v.171, p. 27-31, 2003.

BARBUTO, J.A. et al. Dendritic cell-tumor cell hybrid vaccination for metastatic cancer. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 53, n. 12, p. 1111-8, 2004.

BREITBURD, F.; COURSAGET, P. Human papillomavirus vaccines. **Semin. Cancer Biol.**, v. 9, n. 6, p. 431-44, 1999.

CABRITA, L.D.; BOTTOMLEY, S.P. Protein expression and refolding--a practical guide to getting the most out of inclusion bodies. **Biotechnol. Annu. Rev.**, v.10, p. 31-50, 2004.

CAI, G.; FREEMAN, G.J. The CD160, BTLA, LIGHT/HVEM pathway: a bidirectional switch regulating T-cell activation. **Immunol. Rev.**, v. 229, n. 1, p. 244-58, 2009.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- CHEN, C.H. et al. Boosting with recombinant vaccinia increases HPV16 E7-specific T cell precursor frequencies of HPV16 E7-expressing DNA vaccines. **Vaccine**, v.18, p. 2015-2022, 2000.
- CHEN, R.W. et al. Establishment and characterisation of human papillomavirus type 16 DNA immortalised human tonsillar epithelial cell lines. **Eur. J. Cancer**, v. 39, n. 5, p. 698-707, 2003.
- CHENG, W.F. et al. Tumor-specific immunity antiangiogenesis generated by a DNA vaccine encoding calreticulin linked to a tumor antigen. **J. Clin. Invest.**, v. 108, n. 5, p. 669-678, 2001.
- CHEUNG, T.C. et al. Unconventional ligand activation of herpesvirus entry mediator signals cell survival. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.106, n. 15, p. 6244-9, 2009.
- CHU, N.R. et al. Immunotherapy of a human papillomavirus (HPV) type 16 E7-expressing tumor by administration of fusion protein comprising *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin (BCG) hsp65 and HPV16 E7. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 121, p. 216-225, 2000.
- CLERICI, M. et al. Cytokine production patterns in cervical intraepithelial neoplasia: association with human papillomavirus infection. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 89, n. 3, p. 245-50, 1997.
- CONNOLLY, S.A. et al. Structure-Based Analysis of the Herpes Simplex Virus Glycoprotein D Binding Site Present on Herpesvirus Entry Mediator HveA (HVEM), **J. Virol.**, v. 76, n. 21, p. 10894-10904, 2002.
- CROFT, M. The evolving crosstalk between co-stimulatory and co-inhibitory receptors: HVEM-BTLA **TRENDS Immunol.**, v. 26, n. 6, p. 292-294, 2005.
- CRUSIUS, K.; AUVINEN, E.; ALONSO, A. Enhancement of EGF- and PMA-mediated MAP kinase activation in cells expressing the human papillomavirus type 16 E5 protein. **Oncogene**, v. 15, n. 12, p. 1437-44, 1997.
- EDELHOCK, H. Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. **Biochemistry**, v. 7, p. 1948-51, 1967.
- FELTKAMP, M.C. 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.**, v.9, p. 2242-9, 1993.
- FERNANDO, G.J.P. et al. Expression, purification and immunological characterization of the transforming protein E7, from cervical cancer-associated human papillomavirus type 16. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 115, p. 397-403, 1999.

FINN, O.J. Cancer vaccines: between the idea and the reality. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 3, n. 8, p.630-41, 2003.

GOLDIE, S.J. et al. Cost-effectiveness of HPV 16, 18 vaccination in Brazil. **Vaccine**, v. 25, p. 6257-6270, 2007.

GOLDSBY, R.A.; KINDT, T.J.; OSBORNE, B.A. **KUBY Immunology**. New York: W.H. Freeman & Company, 2000.

GONZALEZ, L.C. et al. A coreceptor interaction between the CD28 and TNF receptor family members B and T lymphocyte attenuator and herpesvirus entry mediator. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 102, n. 4, p. 1116-1121, 2005.

GRANGER, S.W.; RICKERT, S. LIGHT – HVEM signaling and the regulation of T-cell mediated immunity, **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 14, p. 289-296, 2003.

HALLIN, P.A.; ADAMS, V.R. Cancer vaccines. **J. Am. Pharm. Assoc.**, v. 37, n. 5, p. 598-9, 1997.

HALLEZ, S. et al. Phase I/II trial of immunogenicity of a human papillomavirus (HPV) type 16 E7 protein-based vaccine in women with oncogenic HPV-positive cervical intraepithelial neoplasia. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 53, n. 7, p. 642-650, 2004.

HSIEH, C.J. et al. Enhancement of vaccinia vaccine potency by linkage of tumor antigen gene to gene encoding calreticulin. **Vaccine**, v. 22, p. 3993-4001, 2004.

HUNG, C.F. et al. Cancer immunotherapy using a DNA vaccine encoding the translocation domain of a bacterial toxin linked to a tumor antigen. **Cancer Res.**, v. 61, p. 3698-3703, 2001.

JONG, A. et al. Enhancement of human papillomavirus (HPV) type 16 E6 and E7-specific T-cell immunity in healthy volunteers through vaccination with TA-CIN, an HPV16L2E7E6 fusion protein vaccine. **Vaccine**, v. 20, p. 3456-3464, 2002.

KIM, T.W. et al. A DNA vaccine co-expressing antigen and an anti-apoptotic molecule further enhances the antigen-specific CD8+ T-cell immune response. **J. Biomed. Sci.**, v.11, n. 4, p. 493-9, 2004.

KARANAM, B. et al., Vaccination with HPV16 L2E6E7 fusion protein in GPI-0100 adjuvant elicits protective humoral and cell-mediated immunity. **Vaccine**, v. 27, p. 1040-1049, 2009.

LASARO, M.O.; ERTL, H.C. Human papillomavirus-associated cervical cancer: Prophylactic and therapeutic vaccines. **Gene Ther. Mol. Biol.**, v. 8, p. 291-306, 2004.

LASARO, M.O. 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.**, v. 15, p. 1541-50, 2005.

LASARO, M.O. et al. Targeting of antigen to the herpesvirus entry mediator augments primary adaptive immune responses. **Nat. Med.**, v.2, p. 205-12, 2008.

LASARO, M.O.; ERTL, H.C. Potentiating vaccine immunogenicity by manipulating the HVEM/BTLA pathway and other co-stimulatory and co-inhibitory signals of the immune system. **Hum. Vaccine**, v. 5, n. 1, p. 6-14, 2009.

LEWIN, M. et al. Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells. **Nat. Biotechnol.**, v. 18, n. 4, p. 410-414, 2000.

LI, M.; LI, X.; LIU, M. Cloning and expression of HSV-I, II type-common antigen gD in *Escherichia coli*. **Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi**, v. 16, p. 176-8, 2002.

LI, M.; SU, Z.G.; JANSON, J.C. In vitro protein refolding by chromatographic procedures. **Protein Expr. Purif.**, v. 33, p. 1-10, 2004.

LIN, K.Y. et al. Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. **Cancer Res.**, v.56, p.21-26, 1996.

LONG, D. et al. Glycoprotein D protects mice against lethal challenge with herpes simplex virus types 1 and 2. **Infect. Immun.**, v. 43, n. 2, p. 761-764, 1984.

LU, S. et al. Vaccines in leukemia. **Adv. Pharmacol.**, v. 51, p. 255-70, 2004.

MATSUKURA, T.; SUGASE, M. Pitfalls in the epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer using polymerase chain reaction: driver and passenger. **Int. J. Gynecol. Cancer**, v.18, n. 5, p. 1042-50, 2008.

MIKLOSKA, Z.; CUNNINGHAM, A. L. Herpes simplex virus type 1 glycoproteins gB, gC, and gD are major targets for CD4 T-lymphocyte cytotoxicity in HLA-DR expressing human epidermal keratinocytes. **J. Gen.Virol.**, v. 79, p. 353-361, 1998.

MOCELLIN, S.; ROSSI, C.R.; NITTI, D. Cancer vaccine development: on the way to break immune tolerance to malignant cells. **Exp. Cell Res.**, v. 299, n. 2, p. 267-78, 2004.

MURPHY, K.M.; NELSON, C.A.; SEDY, J.R. Balancing co-stimulation and inhibition with BTLA and HVEM. **Nat. Rev. Immunol.**, v.6, p. 671-681, 2006.

- NATALE, C. et al. Computer-assisted analysis of molecular mimicry between human papillomavirus 16 E7 oncoprotein and human protein sequences. **Immunol. Cell Biol.**, v. 78, n. 6, p. 580-5, 2000.
- NICOL, A.F.; FERNANDES, A.T.G.; BONECINI-ALMEIDA, M.G. Immune response in cervical dysplasia induced by human papillomavirus: the influence of human immunodeficiency virus-1 co-infection. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 1, p. 1-12, 2005.
- NORRILD, B. et al. Preparation of three major glycoprotein antigens of herpes simplex virus type 1 early in the infection cycle as determined by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. **Infect. Immun.**, v. 28, n. 1, p. 38-44, 1980.
- OAKNIN, A.; BARRETINA, M.P. Human papillomavirus vaccine and cervical cancer prevention. **Clin. Transl. Oncol.**, v. 10, n.12, p. 804-11, 2008.
- O'HAGAN, D.T.; VALIANTE, N.M. Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 2, n. 9, p. 727-35, 2003.
- PAAVONEN, J. Human papillomavirus infection and the development of cervical cancer and related genital neoplasias. **Int. J. Infect Dis.**, v.11, p. 3-9, 2007.
- PENG, S. et al. Development of a DNA vaccine targeting human papillomavirus type 16 oncoprotein E6. **J. Virol.**, v.78, n. 16, p. 8468-8476, 2004.
- PERRIE, Y. et al. Vaccine adjuvants systems: Enhancing the efficacy of sub-unit protein antigens. **Int. J. Pharm.**, v. 364, p. 272-280, 2008.
- PISANI, P. et al. Estimate of worldwide mortality from 25 cancers in 1990. **Int. J. Cancer**, v. 83, p. 18-29, 1999.
- POLLARA, G. et al. Herpes simplex virus type-1-induced activation of myeloid dendritic cells: the roles of virus cell interaction and paracrine type I IFN secretion. **J. Immunol.**, v. 173, p. 4.108-4.119, 2004.
- REED, S.G. et al. New horizons in adjuvants for vaccine development. **Trends Immunol.**, v. 30, n. 1, p. 23-32, 2008.
- RODAS et al. Cell Culture Derived AgMNPV Bioinsecticide: Biological Constraints and Bioprocess Issues. **Cytotechnology**, v. 48, p. 27-39, 2005.
- RODEN, R. B. S.; MORRIS LING, B.S.; WU, T.C. Vaccination to prevent and treat cervical cancer. **Hum. Pathol.**, v. 35, n. 8, p. 971-982, 2004.

- RUX, A.H. et al. Functional region IV of glycoprotein D from herpes simplex virus modulates glycoprotein binding to the herpesvirus entry mediator. **J. Virol.**, v. 72, n. 9, p 7091-7098, 1998.
- SAHDEV, S.; KHATTAR, S.K.; SAINI, K.S. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. **Mol. Cell Biochem.** v. 307, p. 249-64, 2008.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL D.V. **Molecular Cloning**. New York: CSHL Press, 2001.
- SCIORTINO, M.T. et al. Involvement of gD/HVEM interaction in NF-kB-dependent inhibition of apoptosis by HSV-1 gD. **Biochem Pharmacol.**, v. 76, p. 1522-32, 2008.
- SENGER, T. et al. Enhanced papillomavirus-like particle production in insect cells. **Virology**, v. 388, n. 2, p. 344-53, 2009.
- STANLEY, M. Immune response to human papillomavirus. **Vaccine**, v. 24, p. 16-22, 2006.
- STANLEY, M. Prophylactic HPV vaccines. **Drugs Today**, v. 10, p. 737-44, 2007.
- STEINBERG, D.A.; WATSON, R.J.; MAIESE, W.M. Synthesis of fused glycoprotein D of herpes simplex virus type 1 but not type 2 inhibits *Escherichia coli* hosts. **Gene**, v. 43, p. 311-17, 1986.
- STILES, K.M. et al. The herpes simplex virus receptor nectin-1 is down-regulated after *trans*-interaction with glycoprotein D. **Virology**, v.373, p. 98-111, 2008.
- TINDLE, R.W. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v. 2, n. 1, p. 59-65, 2002.
- TRIMBLE, C. et al. Comparison of the CD8+ cell responses and anti-tumor effects generated by DNA vaccine administered through gene gun, biojector, and syringe. **Vaccine**, v. 21, p. 4036-4042, 2003.
- WALBOOMERS, J.M.; JACOBS, M.V.; MANOS, M.M. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **J. Pathol.**, v. 189, p. 12-19, 1999.
- WANG, J.; SAFFOLD, S.; CAO, X. Eliciting T cell immunity against poorly immunogenic tumors by immunization with dendritic cell-tumor fusion vaccines. **J. Immunol.**, v. 161, n. 10, p. 5516-5524, 1998.
- WHITBECK, J.C. et al. Localization of the gD-binding region of the human Herpes Simplex Virus receptor, HveA. **J. Virol.**, v. 75, n.1, p. 171-180, 2001.

WU, Y.C.; DEYRIEUX, A.F.; WILSON, V.G. Papillomaviruses and the host sumoylation system. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 35, p. 1433-5, 2007.

YUGAWA, T.; KIYONO, T. Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins. **Rev. Med. Virol.**, v. 19, n. 2, p. 97-113, 2009.

ZHENG, J. et al. Highly efficient and economical baculovirus expression system for preparing human papillomavirus type 16 virus-like particles. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 36, n. 8, p. 548-552, 2004.

ZUR HAUSEN, H. Papillomavirus infections – a major cause of human cancers, **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1288, p. 55-78, 1996.

ZUR HAUSEN, H. Immortalization of human cells and their malignant conversion by high risk human papillomavirus genotypes. **Semin. Cancer Biol.**, v. 9, n. 6, p. 405-11, 1999.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses in human cancers. **Proc. Assoc. Am. Physians**, v. 111, n. 6, p. 581-7, 1999.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nat. Rev. Cancer**, v. 2, n. 5, p. 342-50, 2002.

ZUR HAUSEN, H. Perspectives of contemporary papillomavirus research. **Vaccine**, v. 24, 2006. Suppl. 3.