BIANCA MARIGLIANI

**CARACTERIZAÇÃO DE PARTÍCULAS SEMELHANTES AO VÍRUS HPV16
PRODUZIDAS EM CÉLULAS HEK293T**

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

São Paulo
2013

BIANCA MARIGLIANI

CARACTERIZAÇÃO DE PARTÍCULAS SEMELHANTES AO VÍRUS HPV16

PRODUZIDAS EM CÉLULAS HEK293T

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

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Profa. Dra. Aurora M. Cianciarullo

Versão original

São Paulo
2013

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

© reprodução total

Marigliani, Bianca.

Caracterização de partículas semelhantes ao vírus HPV16 produzidas em células HEK293T / Bianca Marigliani. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Aurora Marques Cianciarullo.

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 recombinantes profiláticas e terapêuticas contra o HPV e os cânceres associados ao vírus.

Versão do título para o inglês: Characterization of HPV16 virus-like particles produced in HEK293T cells.

1. Proteínas recombinantes 2. Vacinas 3. Biotecnologia 4. Vírus oncogênicos 5. Neoplasias do colo uterino 6. Saúde pública
I. Cianciarullo, Profa. Dra. Aurora Marques II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB094/2013

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

Candidato(a): Bianca Marigliani.

Título da Dissertação: Caracterização de partículas semelhantes ao vírus HPV16 produzidas em células HEK293T.

Orientador(a): Profa. Dra. Aurora Marques Cianciarullo.

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

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
INSTITUTO BUTANTAN

São Paulo, 26 de abril de 2012.

Ilma. Sra.
Dra. Aurora Marques Cianciarullo
Pesquisadora do Laboratório de Genética
Unidade de Microscopia Eletrônica
Instituto Butantan

Prezada Dra. Aurora

Comunicamos que a Comissão Técnica Nacional em Biossegurança –CTNBio, autorizou o desenvolvimento do projeto de pesquisa: **“Desenvolvimento de vacinas recombinantes profiláticas e terapêuticas contra o HPV e os cânceres associados ao vírus”**, dentro do Certificado de Qualidade em Biossegurança 039/98 – CQB 039/98, ao Laboratório de Genética, com Nível de Biossegurança 2, NB-2.

Em anexo encaminhamos o extrato de Parecer Técnico Nº 3250/2012, publicado na seção de “Documentos Publicados do DOU” em 25 de abril de 2012 e disponível no site da CTNBio: <http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/17080.html>

Atenciosamente,

Aryene Góes Trezena
Presidente Interina
CIBio-Instituto Butantan

C/C –Dra. Dr^a Rita de Cassia Stocco
Diretora do Laboratório de Genética

À minha mãe, Marilda Gonçalves Dias, meu eterno amor e gratidão.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Aurora Marques Cianciarullo por ter me recebido em seu laboratório, pela confiança em mim depositada, pela paciência, pelos ensinamentos, críticas e também por compartilhar comigo sua visão do que é ser cientista.

Ao meu pai científico, Prof. Dr. João Luiz Moreira Coutinho de Azevedo, por todos os ensinamentos sobre Metodologia da Pesquisa e por tantos outros ensinamentos, discussões, apoio, incentivo, reconhecimento e amizade.

Ao meu amigo, Prof. Dr. Thales de Astrogildo e Tréz, pela amizade, por ter me inspirado a seguir a carreira científica e pelas conversas sempre proveitosas.

A todos os membros do laboratório, Prof. Dr. Edécio Armbruster de Moraes e Profa. Dirce Sakauchi pelos ensinamentos, contribuição e boa convivência, Vera Lúcia A. de Rodrigues e Dulcinéia Rosa pelo auxílio na preparação dos materiais utilizados neste trabalho e por tornarem o dia-a-dia mais agradável no laboratório.

À doutoranda Érica Akemi Kavati, por ter me ensinado tanta coisa, pelas discussões de artigos e protocolos, pelos incentivos, amizade e ótima convivência nestes anos. Espero um dia me tornar pelo menos um pouco da pesquisadora brilhante que você é.

Às alunas do Programa de Aprimoramento Profissional do Instituto Butantan, Emanuela Gomes Vieira pela receptividade e amizade construída, Raquel Agonilha Canalli e Heloisa Balalrino de Oliveira pela participação neste trabalho, amizade é ótimos momentos de convivência nesses dois anos.

À Profa. Dra. Itamar Romano Garcia Ruiz por permitir a utilização dos equipamentos em seu laboratório principalmente para manipulação bacteriana.

Aos membros de minha banca de qualificação Prof. Dra. Flavia Saldanha Kubrusly, Prof. Dr. Armando Moraes Ventura e Profa. Dra. Soraia Attie Calil Jorge pelas críticas e sugestões tão importantes.

Ao técnico do microscópio confocal LSM 510 Meta Zeiss, Alexander Seixas de Souza, do Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan, pelas discussões de protocolos e dedicada assistência técnica durante a execução deste trabalho.

Ao pesquisador Prof. Dr. Jorge Mario da Costa Ferreira Junior, sempre com seu bom humor contagiante, pelo auxílio na realização dos ensaios de citometria de fluxo.

Aos funcionários da secretaria do Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/IBU, Marcos, Fábiana e Eliane pelas solicitações sempre atendidas.

Às presidentes da Comissão de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/IBU, Profa. Dra. Ana Clara Guerrini Schenberg e Profa. Dra. Maria Lucia Zaidan Dagli e aos demais membros da comissão de Pós-Graduação.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/IBU pelos ensinamentos teóricos, práticos e por contribuir para a

minha formação científica, em especial ao Prof. Dr. Aldo Tonso, exímio pesquisador, capaz de me fazer compreender e até gostar de Engenharia Bioquímica.

A todos os professores e amigos que me incentivaram e tornaram possível meu ingresso na carreira científica, entre eles especialmente Naja Vergani, Laura Scatena, Dulci do Nascimento Fonseca Vagenas e Alexandre Toledo de Barros.

Às minhas queridas amigas da Pós-graduação em Biologia Molecular da Universidade São Judas Tadeu, pela amizade e pelas conversas sempre divertidas e motivadoras.

Às agências de fomento CAPES, FAPESP, Instituto Butantan e Fundação Butantan pela bolsa de estudos e auxílio financeiro que permitiram a realização desta pesquisa.

A todos os meus familiares e amigos, por todo apoio, compreensão e incentivos, em especial ao meu namorado, Gabriel Arino Fraga, que esteve comigo durante todas as etapas deste trabalho.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, meu sincero muito obrigada!

"É preciso suportar duas ou três larvas se quiser conhecer as borboletas."

(Antoine de Saint-Exupéry – O Pequeno Príncipe)

RESUMO

MARIGLIANI, B. **Caracterização de partículas semelhantes ao vírus HPV produzidas em células HEK293T**. 2013. 89 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

O HPV (Papilomavírus Humano) é o agente etiológico de verrugas anogenitais e alguns tipos de câncer. A infecção persistente por HPVs de alto risco, como os HPVs 16 e 18, pode levar ao câncer de colo do útero, o terceiro tipo mais comum entre mulheres do mundo todo. O capsídeo do HPV é formado pelas proteínas L1 e L2. Quando produzida em sistemas heterólogos, a L1 é capaz de se autoestruturar em partículas semelhantes ao vírus, as VLPs (*virus-like particles*) utilizadas em vacinas profiláticas comercializadas atualmente. A vacina quadrivalente Gardasil® protege contra os HPVs 16, 18, 6 e 11 e a bivalente Cervarix® contra os HPVs 16 e 18. Apesar de alguns relatos de proteção cruzada, como as vacinas atuais oferecem proteção somente contra os HPVs cujas proteínas L1 correspondentes estão presentes nas vacinas, há uma busca por vacinas de segunda geração, capazes de proteger contra mais tipos de HPV. Entre as diferentes propostas para aumentar o espectro de proteção, aquelas que contêm a proteína L2 parecem mais promissoras. Isto porque a L2 é capaz de gerar proteção cruzada, entre diferentes tipos de papilomavírus. O principal objetivo desta pesquisa foi produzir e caracterizar VLPs compostas pelas proteínas L1 e L2 do HPV16, para contribuir com o desenvolvimento de uma vacina profilática de amplo espectro de proteção contra o HPV. Para isso, células HEK293T foram transfectadas com um dos vetores plasmídeos para expressão das proteínas L1 ou L2, ou cotransfectadas com ambos os vetores (L1L2). A expressão proteica foi analisada por citometria de fluxo, microscopia confocal a laser, microscopia eletrônica de transmissão e Western blotting. Em células cotransfectadas, as proteínas L1 e L2 foram observadas no núcleo e no citoplasma celular, formando VLPs de L1L2. A cinética da expressão proteica demonstrou que a máxima expressão e formação de VLPs no maior número de células cotransfectadas da amostra ocorre 12 horas após a transfecção. As VLPs de L1L2 intracelulares apresentam conformação heterogênea e diâmetros que variam de 40 a 80 nm e podem ser encontradas tanto no núcleo quanto no citoplasma celular. A proteína L1 destas VLPs apresenta mobilidade eletroforética de cerca de 60 kDa, enquanto que a L2 tem cerca de 100 kDa. Os testes de maturação e extração das VLPs utilizando protocolo para produção de pseudovírus demonstraram que as proteínas L1 e L2 estavam presentes em abundância na amostra extraída, em diferentes estágios de estruturação, incluindo VLPs morfologicamente bem estruturadas. Assim, foi possível estabelecer um sistema eficaz de produção heteróloga das proteínas L1, L2 e de VLPs de L1L2. Após alguns ajustes nos protocolos, essas partículas poderão ser utilizadas em testes pré-clínicos, diretamente na pesquisa básica do HPV e indiretamente no desenvolvimento de uma vacina profilática de amplo espectro de proteção contra os diversos tipos de HPVs.

Palavras-chave: Papilomavírus humano. Vacina. VLP. Câncer anogenital. Saúde pública.

ABSTRACT

MARIGLIANI, B. **Characterization of HPV16 virus-like particles produced in HEK293T cells.** 2013. 89 p. Masters thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Human Papillomavirus (HPV) is the causative agent of anogenital warts and several types of cancer. Persistent infection with high-risk HPVs such as HPVs 16 and 18 can lead to cervical cancer, the third most common cancer in women worldwide. The HPV capsid is composed of proteins L1 and L2. When produced in heterologous expression systems, L1 can self-assemble into VLPs (virus-like particles), which are the basis for HPV commercially available prophylactic vaccines. Quadrivalent vaccine Gardasil® prevents HPVs 16, 18, 6 and 11, and Cervarix® (GlaxoSmithKline) prevents HPVs 16 and 18. Despite some cross-protection effects, as current vaccines prevent only HPVs from which correspondent L1 are present in the vaccine, there is a need for second generation vaccines, that would protect against additional HPV types. Among proposed strategies to expand spectrum protection, L2-based vaccines show the greatest promise, as L2 cross-protection capacity has already been proved. The main objective of this research was to produce and characterize VLPs composed of HPV16 L1 and L2 proteins, in order to contribute to the development of an HPV broad-spectrum prophylactic vaccine. In this regard, HEK293T cells were transfected with one of the plasmid vectors expressing L1 or L2 proteins, or cotransfected with both plasmid vectors (L1L2). Protein expression was analyzed by flow cytometry, confocal laser scanning microscopy, transmission electron microscopy and Western blotting. Protein kinetics showed maximum L1 and L2 expression and VLP formation in the highest number of cotransfected cells at 12 h post-transfection. Intracellular L1L2 VLPs presented heterologous conformation that varies in diameter from 40 to 80 nm. These VLPs were found in the cell nucleus and cytoplasm. The L1 and L2 proteins from VLPs showed electrophoretic mobility of 60 kDa and 100 kDa, respectively. VLPs maturation and extraction tests using a pseudovirus production protocol showed that L1 and L2 proteins were highly present, at different maturation stages, including morphologically well structured VLPs. Nevertheless, it was possible to establish an efficient system of heterologous L1 and L2 proteins and L1L2 VLPs production. After some adjustments in protocols, these particles could be used in preclinical tests, directly in HPV basic research and also indirectly in the development prophylactic broad-spectrum vaccine against several HPV types.

Keywords: Human Papillomavirus. Vaccine. VLP. Anogenital cancer. Public health.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 – Os 10 tipos de HPV mais frequentes em mulheres diagnosticadas com câncer de colo do útero no Brasil	19
Figura 2 – Representação esquemática do genoma do HPV	21
Figura 3 – O capsídeo do HPV.	22
Figura 4 – Modelo 3D predito da interação L1L2.....	24
Figura 5 – Reconstrução 3D computadorizada do capsídeo do HPV	24
Figura 6 – Ciclo de vida do HPV.....	28
Tabela 1 – Atuais vacinas profiláticas comerciais contra o HPV	33
Figura 7 – Vetores plasmídeos	42
Tabela 2 – Cinética da expressão da proteína L1 do HPV16 por citometria de fluxo	53
Figura 8 – Cinética da expressão da proteína L1 por MCL em células HEK293T transfectadas	54
Figura 9 – MCL das células HEK293T 12 h após a transfecção	55
Figura 10 – MCL das células HEK293T não transfectadas	56
Figura 11 – MCL das células HEK293T transfectadas com o plasmídeo para expressão da proteína L1	56
Figura 12 – MCL das células HEK293T transfectadas com o plasmídeo para expressão da proteína L2	57
Figura 13 – MCL da célula HEK293T cotransfectada com os plasmídeos para expressão das proteínas L1 e L2	58
Figura 14 – MCL das células HEK293T cotransfectadas com os plasmídeos para expressão das proteínas L1 e L2	58
Figura 15 – MCL das células HEK293T cotransfectadas após 12 h	59
Figura 16 – MCL das células HEK293T cotransfectadas após 24 h	60
Figura 17 – MCL das células HEK293T cotransfectadas após 48 h	60
Figura 18 – MCL das células HEK293T transfectadas e mitocôndrias	61
Figura 19 – Micrografia eletrônica de corte ultrafino de HEK293T não transfectada	62
Figura 20 – MET em imunocitoquímica ultraestrutural das células HEK293T cotransfectadas	63
Figura 21 – MET em imunocitoquímica ultraestrutural da célula HEK293T cotransfectada... ..	64
Figura 22 – MET em imunomarcção de partículas extraídas de células HEK293T cotransfectadas	65

Figura 23 – MET em imunomarcação das VLPs extraídas	65
Figura 24 – MET em imunomarcação das VLPs extraídas	66
Figura 25 – WB do lisado de células HEK293T	67
Figura 26 – WB após extração.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	Albumina sérica bovina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BPV	<i>Bovine Papillomavirus</i>
CRPV	<i>Cottontail Rabbit Papillomavirus</i>
DIC	Contraste de interferência diferencial
E	<i>Early protein</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
g	Força centrífuga relativa
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
HEK293T	Linhagem celular <i>Human Embryonic Kidney T</i>
HPV	Papilomavírus Humano
kDa	Quilodalton
kV	Quilovolt
L	<i>Late protein</i>
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
mA	Miliampere
MCL	Microscopia confocal a laser
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
ml	Mililitro
mm	Milímetro
nM	Nanomolar
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PBS-T	PBS contendo Tween 20 a 0,05%
pCMV	Promotor do Citomegalovírus
PI	Iodeto de propídeo
PV	Papilomavírus
rpm	<i>Rotações por minuto</i>
SBF	Soro bovino fetal
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SV40	Simian vírus 40
TBE	Tampão tris-borato-EDTA
TE	Tampão tris-EDTA
v	Volt
VLP	<i>Virus-Like Particle</i>
WB	<i>Western blotting</i>
µg	Micrograma
µl	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	Incidência do HPV no Brasil e no mundo	18
1.2	O HPV	19
1.3	A infecção viral e o ciclo de vida do HPV	27
1.4	Vacinas contra o HPV	31
1.5	Novas alternativas vacinais contra o HPV	36
2	OBJETIVOS	41
2.1	Objetivos gerais	41
2.2	Objetivos específicos	41
3	MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.1	Vetores plasmídeos para expressão das proteínas do HPV16	42
3.2	Cultivo de células humanas HEK293T	43
3.3	Transfecção e produção das proteínas recombinantes.....	44
3.4	Citometria de fluxo	46
3.5	Microscopia confocal a laser	46
3.6	Microscopia eletrônica de transmissão	47
3.7	SDS-PAGE e Western blotting	50
3.8	Coleta, maturação e extração das VLPs	52
4	RESULTADOS.....	53
4.1	Cinética da expressão proteica	53
4.2	Análise da expressão das proteínas L1 e L2 por microscopia confocal a laser	55
4.3	Célula HEK293T não transfectada por microscopia eletrônica de transmissão.....	62
4.4	Expressão e localização das proteínas L1 e L2 por MET	63
4.5	Microscopia eletrônica de transmissão das VLPs extraídas	64
4.6	SDS-PAGE e Western blotting	66
5	DISCUSSÃO	69
6	CONCLUSÃO.....	76
	REFERÊNCIAS	77

1 INTRODUÇÃO

Os papilomavírus (PVs) são pequenos vírus de DNA não envelopados, que infectam diferentes espécies de vertebrados. Atualmente a família *Papillomaviridae* tem mais de 180 genótipos de PVs caracterizados e classificados em 29 gêneros. Cinco destes gêneros são compostos por 120 PVs que infectam os humanos, chamados de papilomavírus humanos, ou HPVs (*Human Papillomaviruses*) (BERNARD et al., 2010). O HPV é o agente etiológico de lesões proliferativas benignas, como as verrugas anogenitais, e transformações malignas, causando algumas das doenças sexualmente transmissíveis mais comuns (MANDIC, 2012; ZUR HAUSEN, 2009). Entre essas transformações está o câncer cervical, ou câncer de colo do útero, o terceiro tipo de câncer mais frequente em mulheres de todo o mundo (JEMAL et al., 2011).

O HPV é responsável por cerca de 5% das mortes globais que acontecem em decorrência do câncer (KARANAM et al., 2009). É um dos mais importantes agentes infecciosos causadores de câncer, pois além de ser responsável por todos os casos de câncer de colo do útero, também está associado a outros tipos de câncer anogenitais e orofaríngeos. Os HPVs associados aos cânceres e lesões pré-cancerosas são chamados HPVs de alto risco, sendo os HPVs 16 e 18 os causadores de 70% dos casos de câncer de colo do útero (MUÑOZ et al., 2006). Já os HPVs de baixo risco são causadores das verrugas anogenitais, entre eles os HPVs 6 e 11 são responsáveis por mais de 90% dos casos (GREER et al., 1995; LACEY et al., 2006).

A via de transmissão mais comum do HPV é a relação sexual vaginal ou anal com penetração, porém o contato manual-genital ou genital-oral também tem sido associado à transmissão viral. Há também vias não sexuais de transmissão, incluindo a materno-fetal durante a gestação e o parto vaginal (ARMBRUSTER-MORAES et al., 1994; BURCHELL et al., 2006; KAVATI et al., 2012; PALUMBO et al., 2009; ROMBALDI et al., 2008).

O exame de Papanicolau, desenvolvido na década de 40, demonstrou ser eficaz na detecção de lesões precursoras do câncer de colo do útero. Porém, esta doença impacta de maneira desproporcional as regiões menos desenvolvidas, que não contam com programas de rastreamento da doença e onde ocorrem 83% dos casos de câncer de colo do útero. Além dos programas de prevenção terem custo elevado e serem impraticáveis em várias partes do mundo, a infecção por HPV causa morbidade significativa em alguns pacientes. Sendo assim,

o ideal seria, principalmente em regiões menos favorecidas, a combinação de programas de rastreamento eficazes e programas de prevenção da infecção utilizando uma vacina de baixo custo (KARANAM et al., 2009).

Apesar de muito comum, principalmente entre jovens, a infecção por HPV geralmente é transiente. Para que ocorra a transformação maligna, é necessário que a infecção seja persistente (KOSHIOL et al., 2008; MOSCICKI et al., 2006). As infecções por HPVs de alto risco geralmente duram de 12 a 18 meses, sendo então eliminadas pelo sistema imune. Porém, cerca de 10% das mulheres infectadas não conseguem eliminar o vírus, o que resulta em uma infecção persistente, o principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer (BODILY; LAIMINS, 2011; STANLEY, 2008). Alguns cofatores têm sido associados à persistência da infecção pelo HPV e progressão da lesão, entre eles o fumo, uso prolongado de contraceptivos orais e infecções por micro-organismos como a *Chlamydia trachomatis* e o *Trichomonas vaginalis* (BERRINGTON de GONZÁLEZ et al., 2004; PALMER et al., 2009).

Por um longo período o HPV não foi considerado uma infecção importante, pois só se sabia de sua relação com as verrugas anogenitais. Porém, no final da década de 80, quando ficou evidente a alta incidência de doenças graves associadas ao HPV, o desenvolvimento de vacinas profiláticas para prevenir a infecção e as doenças associadas se tornou um importante objetivo para a saúde pública (STANLEY, 2010). O desenvolvimento de vacinas contra o HPV só foi possível graças às pesquisas realizadas por Harald zur Hausen, laureado com o prêmio Nobel de Medicina em 2008 e responsável por descobrir a relação entre o HPV e o câncer de colo do útero (HEPBURN; KAUFMANN, 2009).

No início dos anos 90, Meyers e colaboradores desenvolveram a produção de vírions de HPV em culturas organotípicas, utilizando queratinócitos infectados em sistemas de cultivo ar-líquido (MEYERS et al., 1992). Antes disso não era possível propagar o HPV suficientemente em cultura para a produção convencional de vacinas, o que atrasou o desenvolvimento da vacina contra o HPV. Somente nas últimas décadas o avanço tecnológico possibilitou o desenvolvimento de vacinas recombinantes, como é o caso das vacinas atualmente disponíveis contra o HPV, compostas por subunidades proteicas heterólogas (STANLEY, 2010).

Atualmente existem duas vacinas comerciais contra o HPV, ambas utilizam a proteína L1 do capsídeo viral do HPV na forma de VLPs (*Virus-Like Particles*) ou partículas semelhantes aos vírus. Essas VLPs não contêm DNA viral, porém são morfológica e

antigenicamente muito semelhantes ao vírus, capazes de gerar forte resposta imune e induzir memória imunológica. Apesar de haver pelo menos 15 tipos de HPV com potencial oncogênico, essas vacinas profiláticas atuais contêm antígenos de somente dois deles, os HPVs 16 e 18 (PALMER, 2009; SZAREWSKI, 2012). As duas vacinas são compostas de VLPs derivadas da L1 dos HPVs mais prevalentes em câncer, o HPV16 e o HPV18, sendo que uma dessas vacinas protege também contra verrugas anogenitais, pois inclui VLPs derivadas da L1 dos HPVs 6 e 11, causadores de cerca de 90% dessas verrugas (KWAK; YEMELYANOVA; RODEN, 2011; POLJAK, 2012).

As vacinas atuais não são ideais. Apesar de haver alguns relatos de proteção cruzada, elas oferecem proteção eficaz e duradoura contra poucos tipos de HPV, têm custo elevado, são aplicadas intramuscularmente e devem ser mantidas sob refrigeração (STANLEY, 2010). Todos esses fatores dificultam sua utilização em países em desenvolvimento, onde são mais necessárias, pois são estes os países que mais sofrem em termos de morbimortalidade decorrente de infecções causadas pelo HPV, principalmente devido à ausência ou ineficiência de programas de rastreamento do câncer de colo do útero (GARLAND; SMITH, 2010).

A eficácia das vacinas de VLPs de L1 licenciadas encorajou o desenvolvimento de vacinas de segunda geração visando expandir a cobertura para todos os tipos oncogênicos e também reduzir as barreiras para a implementação global da vacina (KWAK; YEMELYANOVA; RODEN, 2011). Para produzir uma nova geração de vacinas, os desafios incluem desenvolver um produto de baixo custo, termoestável, que possa ser administrado por métodos não injetáveis, que promova uma proteção de longo prazo contra a maioria (se não todos) dos tipos virais e que seja tão eficaz quanto as vacinas atuais (STANLEY, 2010).

Algumas vacinas de segunda geração já estão em fase de testes, incluindo vacinas contendo VLPs polivalentes, capsômeros de L1 ou a proteína L2, a outra proteína que compõe o capsídeo viral do HPV (STANLEY, 2010). Apesar de ser pouco imunogênica, a L2 demonstrou ser capaz de gerar resposta imune contra diferentes tipos de HPV em modelos animais, o que se conhece por proteção cruzada (ALPHS et al., 2008). As vacinas contendo a L2 são as estratégias mais promissoras, principalmente em relação à amplitude de proteção, baixo custo e termoestabilidade (STANLEY, 2010).

O rastreamento de lesões precursoras utilizando métodos citológicos e moleculares, juntamente com o advento das vacinas contra o HPV, fazem do câncer de colo do útero uma

doença prevenível (KWAK; YEMELYANOVA; RODEN, 2011; WALBOOMERS et al., 1999; ZUR HAUSEN, 2002). Além deste, muitos casos de cânceres orofaríngeos, de pênis, vagina e ânus são causados por HPV e são, portanto, preveníveis por vacinas (KWAK; YEMELYANOVA; RODEN, 2011; PARKIN; BRAY, 2006). Sendo assim, novas estratégias vacinais são necessárias para a obtenção de uma vacina altamente imunogênica e de amplo espectro contra o HPV, podendo inclusive utilizar ambas as proteínas do capsídeo viral de HPV.

1.1 Incidência do HPV no Brasil e no mundo

Atualmente o HPV é uma das infecções sexualmente transmissíveis mais comuns em todo o mundo. A maioria dos indivíduos sexualmente ativos são infectados por este vírus em algum momento da vida (BASEMAN; KOUTSKY, 2005; ZUR HAUSEN, 2009). A prevalência da infecção em mulheres com citologia normal varia de 1,6% a 41,9% em diferentes regiões geográficas. A prevalência média mundial está em torno de 12% e as taxas mais altas são encontradas na África e na América Latina. Diferentes estudos identificaram uma tendência em relação à idade das mulheres infectadas. O primeiro pico ocorre antes dos 25 anos de idade em todas as regiões geográficas e o segundo é observado em mulheres acima de 45 anos nas Américas, África e Europa. O primeiro pico ocorre logo após o início da vida sexual e está atribuído a altos níveis de atividade sexual com múltiplos parceiros e à baixa imunidade viral. Em seguida ocorre um declínio na prevalência, o que demonstra a importância da imunidade naturalmente adquirida na proteção contra a infecção por HPV. O segundo pico de infecção, que ocorre na meia idade, pode estar relacionado com a senescência imune, mudanças hormonais que antecedem a menopausa, mudanças no comportamento sexual ou aumento nas taxas de infecção persistente na idade mais avançada. Os principais fatores de risco estão relacionados à atividade sexual e incluem principalmente o número de parceiros sexuais recentes e ao longo da vida e a idade de início da atividade sexual (TOTA et al., 2011).

Estima-se que a prevalência do HPV seja de quase 100% em cânceres de colo do útero (WALBOOMERS et al., 1999), em torno de 85% nos cânceres anais, 70% nos cânceres vaginais, 40% nos cânceres de vulva (DE VUYST et al., 2009), 45% nos cânceres de pênis (PARKIN; BRAY, 2006) e 25% nos cânceres de cabeça e pescoço (KREIMER et al., 2005).

Anualmente a infecção por HPV é responsável por 530 mil novos casos de cânceres de colo do útero, levando à morte de 270 mil mulheres em todo o mundo. A grande maioria, isto é, 86% dos casos e 88% das mortes, acontece em países em desenvolvimento (TOTA et al., 2011). No Brasil, estimativas indicam que a cada ano mais de 24 mil mulheres são diagnosticadas com câncer de colo do útero e que 11 mil delas morrem em decorrência desta doença. A Figura 1 mostra que, assim como na maior parte do mundo, no Brasil os tipos de HPV mais frequentes em pacientes com este câncer são o 16 e o 18 (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO)/ICO INFORMATION CENTRE ON HPV AND CERVICAL CANCER, 2010).

Figura 1 – Os 10 tipos de HPV mais frequentes em mulheres diagnosticadas com câncer de colo do útero no Brasil.

Fonte: Adaptado de WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer, 2010.

1.2 O HPV

Todos os HPVs conhecidos são exclusivamente epiteliotrópicos (DOORBAR, 2005). Mais de 100 tipos de HPV já foram molecularmente caracterizados, sendo que 40 deles infectam o trato genital (MUÑOZ et al., 2006). Segundo o Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV – *International Committee on the Taxonomy of Viruses*), os papilomavírus são uma família taxonômica distinta, a Papillomaviridae. Os tipos, subtipos e variantes dos vírus são baseados na homologia da sequência nucleotídica do gene que codifica a proteína L1, assim classificados quando esta sequência se difere da outra em pelo menos 10% para os tipos, de 2 a 10% para os subtipos e no máximo 2% para as variantes (ZHENG; BAKER, 2006). Os

papilomavírus humanos mais importantes pertencem aos gêneros alfa, beta e gama, que incluem HPVs associados tanto a lesões benignas quanto malignas (BERNARD et al., 2010).

De acordo com o potencial oncogênico, os HPVs podem ser divididos em diferentes grupos. O uso dos termos “alto e baixo risco oncogênico” se tornou comum no final da década de 80, na mesma época em que foi desenvolvido o sistema Bethesda (LACEY; LOWNDES; SHAH, 2006). Este sistema classifica diferentemente as anormalidades do epitélio escamoso cervical em lesão intraepitelial de baixo grau e de alto grau, entre outras (SOLOMON et al., 2002).

Os HPVs de alto risco estão associados a cânceres e lesões pré-cancerosas chamadas neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC), entre eles temos os HPVs 16 e 18, responsáveis por 70% dos casos de câncer de colo do útero. Também estão neste grupo os HPVs dos tipos 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59. Os HPVs considerados potencialmente de alto risco incluem os tipos 26, 53, 66, 68, 73, 82, associados ao câncer cervical, apesar da baixa incidência (MUÑOZ et al., 2006). Já os HPVs de baixo risco são aqueles associados a verrugas anogenitais ou condilomas, causados na grande maioria dos casos por HPVs dos tipos 6 e 11 (LACEY; LOWNDES; SHAH, 2006).

O genoma do HPV é uma dupla fita de DNA circular associado a histonas, com 8000 pares de bases divididas em três regiões distintas. Uma região codifica as proteínas L1 e L2 (L = *late*, de expressão tardia) do capsídeo viral, outra codifica as proteínas não estruturais E1, E2, E4, E5, E6 e E7 (E = *early*, de expressão precoce), necessárias para a replicação do DNA viral e formação das novas partículas virais na célula hospedeira. Essas duas regiões são separadas por uma terceira região chamada URR (*upstream regulatory region*) ou LCR (*long control region*) com cerca de mil pares de bases, que contém elementos reguladores da expressão gênica, replicação e empacotamento do genoma em partículas virais (Figura 2). Apesar da aparente organização gênica simples, os produtos proteicos são complexos devido ao uso de promotores alternativos e múltiplos eventos de *splicing* de RNA (MUÑOZ et al., 2006; STANLEY, 1994).

Figura 2 - Representação esquemática do genoma do HPV. Região reguladora (URR), genes que codificam as proteínas do capsídeo viral (L) e as proteínas não estruturais (E).
Fonte: Muñoz et al., 2006.

As funções dos produtos do genoma viral podem ser resumidas da seguinte maneira: as proteínas L1 e L2 formam o capsídeo viral, a proteína E1 é uma helicase com função na replicação viral, assim como a E2, que também participa da transcrição, a E4 desestabiliza a rede de citoqueratina, a E5 está relacionada com a mediação de sinais mitóticos, enquanto que a E6 e a E7 são as principais oncoproteínas virais, participam da transformação celular e evasão do sistema imune (GHITTONI et al., 2010).

A investigação da estrutura do capsídeo do HPV é limitada devido à dificuldade de propagar o vírus *in vitro*. A estrutura proposta é um capsídeo não envelopado com aproximadamente 60nm de diâmetro, composto por 360 monômeros da proteína L1 arranjados em 72 capsômeros pentaméricos que formam uma estrutura de simetria icosaédrica ($T = 7$) (Figura 3) (HAGENSEE; YAEHASHI; GALLOWAY, 1993; MODIS; TRUS; HARRISON, 2002; STANLEY, 1994). Alguns autores afirmam que uma porção da L1, próxima à região C-terminal, se estende para invadir capsômeros pentaméricos vizinhos (BUCK; TRUS, 2012). A estrutura do capsídeo é estabilizada por pontes dissulfeto intra e intercapsoméricas

e o HPV também possui moléculas da proteína L2, localizadas provavelmente no centro dos capsômeros de L1 (BUCK et al., 2008; TRUS et al., 1997).

Figura 3 - O capsídeo do HPV. Representação esquemática dos monômeros de L1 formando capsômeros pentaméricos (A) e do capsídeo viral icosaédrico (B).
Fonte: Adaptado de Modis, Trus e Harrison, 2002.

A proteína L1, principal proteína do capsídeo viral, é composta por 531 aminoácidos. Quando produzida em diferentes sistemas de expressão de proteínas heterólogas, a L1 é capaz de se autoestruturar espontaneamente formando VLPs, partículas desprovidas de material genético, porém altamente imunogênicas (KIRNBAUER et al., 1992). A proteína L1 compõe a maior parte do capsídeo viral e é capaz de se autoestruturar em VLPs, enquanto que a L2 está presente em menor quantidade e não é capaz de formar VLPs. A L2 só é capaz de formar VLPs na presença da L1, formando as VLPs de L1L2 que podem conter material genético (WANG; RODEN, 2013). A proteína L2 é composta por 473 aminoácidos e apesar de ser dispensável na formação de VLPs, está envolvida na entrada do vírus na célula hospedeira e na inclusão do DNA viral no capsídeo em formação. Ambas as proteínas L1 e L2 possuem mobilidade eletroforética de aproximadamente 55 kDa, porém alguns estudos da L2 isolada de verrugas ou expressa em diferentes sistemas de expressão proteica afirmam que a L2 migra com massa molecular de aproximadamente 72 kDa (HAGENSEE; YAEHASHI;

GALLOWAY, 1993). Diferentes análises por SDS-PAGE mostram a L2 com peso molecular de 64 a 78 kDa (WANG; RODEN, 2013).

Como o HPV utiliza a DNA polimerase do hospedeiro para replicar seu genoma, a sequência de nucleotídeos do DNA viral tem permanecido estável, porém, acredita-se que os diferentes genótipos de HPV tenham surgido ao longo do tempo de acordo com diferentes tropismos teciduais e para que pudessem se evadir do sistema imune (KWAK; YEMELYANOVA; RODEN, 2011; YAMADA et al., 1997). Nos diversos tipos de HPV, as sequências nucleotídicas que correspondem às regiões da proteína L1 localizadas internamente são altamente conservadas, porém os *loops* que se projetam da superfície dos pentâmeros são hipervariáveis e correspondem aos epítomos tipo-específicos imunodominantes (CHEN et al., 2000). A acumulação preferencial dessas mudanças nos *loops* hipervariáveis demonstra tanto uma seleção daqueles que não foram reconhecidos por anticorpos protetores quanto uma ausência de interferência desses *loops* na estrutura do capsídeo viral. Os anticorpos neutralizantes anti-VLPs de L1 reconhecem predominantemente somente o tipo de HPV contra o qual foram gerados (CHEN et al., 2000; RODEN et al., 1996).

O anticorpo monoclonal H16.V5, o anticorpo melhor caracterizado e com a maior capacidade de neutralização já descrito, reconhece um epítomo composto por dois peptídeos projetados de moléculas de L1, o FG de uma L1 e o *loop* HI da molécula de L1 adjacente do mesmo pentâmero (CHRISTENSEN et al., 2001; ZHAO et al., 2012). Ao contrário do anticorpo monoclonal comercial Camvir-1, que é gerado contra um epítomo linear de L1 do HPV16, os anticorpos H16.U4, H16.E70 e H16.V5 são anticorpos gerados contra epítomos conformacionais da proteína L1 (SADEYEN et al., 2003; WHITE et al., 1999).

Estudos utilizando anticorpos monoclonais demonstraram que epítomos compostos pelos *loops* FG e HI são importantes para a neutralização do HPV16, enquanto que os *loops* BC, DE e HI são importantes para a neutralização dos HPVs 6 e 11. Na partícula viral, a L2 faz contato com o genoma viral e com pentâmeros de L1 (Figura 4), exercendo a importante função de incluir o genoma viral no capsídeo em formação. Estudos comparando a L2 do HPV com as proteínas do capsídeo viral de polyomavírus sugerem que a L2 interage com resíduos localizados na cavidade central do pentâmero de L1. A região C-terminal de 44 aminoácidos da L2 parece facilitar a interação com a L1 e já foi demonstrado que regiões da

L2 envolvidas na interação com a L1 são evolutivamente conservadas entre os alfa papilomavírus (LOWE et al., 2008).

Figura 4 - Modelo 3D predito da interação L1L2. Estrutura da L2 e sua associação com um monômero de L1 (A). Orientação da L2 em associação com o pentâmero de L1, dois monômeros de L1 foram removidos para melhor visualização da L2 na estrutura (B).

Fonte: Lowe et al., 2008.

Parece haver pelo menos dois domínios de interação entre as proteínas L1 e L2. A abundância e localização da proteína L2 no capsídeo permaneceram incertas por anos, mas estudos com pseudovírus (capsídeos infecciosos de HPV compostos pelas proteínas L1 e L2 produzidas *in vitro*, capazes de englobar material genético) demonstraram que podem ser incorporadas de 12 a 72 moléculas de L2 por capsídeo viral (Figura 5) (BUCK et al., 2008).

Figura 5 - Reconstrução 3D computadorizada do capsídeo do HPV. Visão interna do capsídeo composto pelas proteínas L1 e L2. L1 em azul e L2 em vermelho (A). Proteína L2 em vermelho (B).

Fonte: Buck et al., 2008.

Apesar das chaperonas facilitarem o processo de estruturação do vírion no núcleo celular, as proteínas L1 e L2 são capazes de se autoestruturar espontaneamente, englobando material genético sem o auxílio de outras proteínas. Em células cotransfectadas com vetores para expressão das proteínas L1 e L2, essas partículas parecem ser altamente promíscuas ao englobarem diferentes tipos de DNA na forma de cromatina, incluindo plasmídeos repórter, genomas de HPV recombinantes transfectados e até fragmentos de DNA celular, ou seja, praticamente qualquer DNA heterólogo não viral menor do que 8 kb. Esta função de englobar material genético está atribuída à L2, já que as VLPs de L1 produzidas na ausência de L2 não contêm material genético, independente do tipo de HPV da qual foram derivadas (BUCK; TRUS, 2012).

A alta promiscuidade de encapsidação das partículas de L1L2 permitiu a produção de vetores de PVs capazes de entregar o plasmídeo encapsidado a diversas linhagens celulares. Essas partículas de L1L2 contendo material genético são chamadas de pseudovírus e foram usadas inicialmente em estudos de neutralização e das vias de entrada de PVs na célula hospedeira (BUCK; THOMPSON, 2007). Como o HPV não podia ser propagado em culturas celulares, era necessário gerar vírions infecciosos para o estudo das etapas da infecção viral, tais como o empacotamento do DNA viral no capsídeo, ligação do vírion à célula hospedeira, desempacotamento do DNA viral e seu transporte para o núcleo celular. A expressão das proteínas L1 e L2 e a geração de VLPs em células eucarióticas auxiliou esses estudos, e para avançar na compreensão da infecção por HPV, primeiramente foram geradas partículas infecciosas de BPV-1 em linhagens de células murinas, demonstrando que a L2 é essencial para a obtenção de vírions infecciosos *in vitro* (RODEN et al., 1996; ZHOU et al., 1993). Posteriormente foram utilizadas células de primatas, da linhagem COS-7, para a expressão das proteínas L1 e L2 e geração de pseudovírus do HPV33, capazes de encapsidar material genético e infectar diferentes linhagens (UNCKELL; STREECK; SAPP, 1997; VOLPERS et al., 1995). Além de serem utilizados para estudos da infecção por HPV, esses pseudovírus também são empregados como ferramenta de transferência de genes tanto para superexpressão de genes de interesse em células em cultura quanto como um sistema de *gene delivery* (entrega gênica) *in vivo* que já foi inclusive utilizado no desenvolvimento de um modelo murino de infecção cervicovaginal pelo HPV16 (BUCK; THOMPSON, 2007; ROBERTS et al., 2007).

A porção N-terminal da L2 contém sequências altamente conservadas entre diferentes tipos de papilomavírus. Ao contrário da natureza tipo-específica dos epítomos neutralizantes de L1, os imunógenos compostos pela proteína L2 completa ou por peptídeos principalmente da porção N-terminal induzem a geração de anticorpos com ampla neutralização cruzada contra PVs humanos e animais (BUCK et al., 2008; PASTRANA et al., 2005; SEITZ et al., 2013).

Diferentes estudos tentaram definir quais são os epítomos importantes da L2 utilizando vacinas contendo peptídeos sintéticos ou através da produção de anticorpos monoclonais neutralizantes. Vacinas contendo a porção N-terminal da L2, principalmente os resíduos 11-200 e 1-88 demonstraram ser protetoras em diferentes modelos animais. A vacinação de coelhos com os resíduos 1-88 e 45-173 induz a geração de anticorpos neutralizantes capazes de neutralização cruzada; os resíduos 94-122 demonstraram relativa proteção tipo-específica em coelhos; os resíduos 101-120, 131-151 e 151-170 demonstraram proteção de vacas contra o BPV4; enquanto que os resíduos 108-120 parecem ser um epítomo capaz de neutralização cruzada. Outros estudos demonstram que os resíduos de L2 17-36, 36-49, 69-81 e 108-120 são epítomos neutralizantes importantes (CHANDRACHUD et al., 1995; EMBERS et al., 2002; KARANAM et al., 2009). O resíduo 69-81 foi identificado há 15 anos como um epítomo importante presente na superfície de capsídeos de L1L2, sendo que esta é uma região altamente conservada entre diferentes tipos de HPV (KAWANA et al., 1998).

A capacidade dos anticorpos anti-L2 oferecerem proteção cruzada contra diferentes tipos de PVs faz da L2 um antígeno candidato para o desenvolvimento de vacinas profiláticas de amplo espectro contra o HPV (BUCK et al., 2008). Uma estratégia possível é a utilização do epítomo 17-36 da L2, visto que o anticorpo monoclonal RG-1, gerado contra esse epítomo, demonstrou ser capaz de neutralizar praticamente todas as infecções por papilomavírus (GAMBHIRA et al., 2007a; PALMER et al., 2009).

A proteína L1 compõe a maior parte da superfície do vírion do HPV e é altamente imunodominante em relação à L2. Apesar da capacidade da L2 induzir anticorpos capazes de neutralizar a infecção viral em modelos animais, os níveis de anticorpos são menores do que os gerados pela vacinação com VLPs de L1, sendo assim o desenvolvimento de vacinas contra o HPV teve seu foco inicial na proteína L1. É interessante notar que a L2 exerce um papel crucial na infecção viral, e uma das principais funções dos *loops* variáveis de L1 pode

ser esconder do sistema imune os domínios altamente conservados da L2 que permitem a entrada do vírus na célula hospedeira (DAY et al., 2008; PALMER et al., 2009).

Os anticorpos neutralizantes antiproteínas estruturais virais exercem um papel importante no controle da maioria das infecções por vírus, pois limitam a susceptibilidade a reinfecções e são o principal mecanismo efetor das vacinas antivirais. A evolução de diferentes tipos do mesmo vírus é uma característica viral daqueles que podem ser controlados por anticorpos neutralizantes. Porém, essa evolução é limitada pela necessidade de conservar os domínios importantes, por exemplo, os necessários para a ligação à célula hospedeira, e que podem conter epítomos neutralizantes. Esses epítomos podem ser utilizados em uma vacina de amplo espectro, mas em alguns casos esses epítomos são expostos somente por um curto período após a ligação do vírion à célula hospedeira ou podem ser inacessíveis aos anticorpos na interface vírus-célula hospedeira. Um estudo utilizando pseudovírus de HPV16 afirma que os representantes da aparente classe dominante de anticorpos neutralizantes específicos anti-L1 induzidos pela vacinação com VLPs previnem a infecção não por prevenir a ligação do vírus com a superfície celular, mas por prevenir a mudança conformacional envolvida na exposição do epítomo neutralizante da L2 (DAY et al., 2008).

1.3 A infecção viral e o ciclo de vida do HPV

Os HPVs representam a doença sexualmente transmissível mais comum em todo o mundo (UPILE et al., 2012). Do ponto de vista evolutivo o HPV é um agente infeccioso de sucesso, pois provoca infecção crônica sem sequelas sistêmicas e raramente mata o hospedeiro, porém lança periodicamente grandes quantidades de vírus para serem transmitidos a outros indivíduos. Para que isso ocorra, o HPV precisa ser capaz de enganar os sistemas de defesa do hospedeiro, e a chave desse mecanismo está no ciclo de replicação viral que já é, em si, uma estratégia para se evadir do sistema imune, inibindo a detecção do vírus pelo hospedeiro. O HPV é capaz de se evadir da resposta imune inata e atrasar a ativação da resposta imune adaptativa (DOORBAR, 2005; STANLEY, 2006, 2008). A resposta imune do hospedeiro à infecção por HPV (imunidade humoral, principalmente IgG) é geralmente lenta, fraca e varia consideravelmente entre as mulheres. A invasão do HPV deveria ser detectada pelas células dendríticas intraepiteliais, que pertencem à imunidade

inata, a primeira linha de defesa contra qualquer patógeno, porém há evidências de que essas células não são ativadas pelo HPV (MARIANI; VENUTI, 2010). Mais detalhes a respeito dos mecanismos de evasão do sistema imune pelo HPV podem ser encontrados em (STANLEY, 2006).

Os HPVs infectam células epiteliais e seu ciclo de vida é totalmente dependente da diferenciação epitelial (Figura 6), sendo a expressão das proteínas virais regulada durante a migração das células basais infectadas em direção à superfície epitelial. O vírus infecta queratinócitos primitivos basais, as células menos diferenciadas do epitélio escamoso e que ainda têm atividade mitótica, porém os altos níveis de expressão de proteínas virais e a montagem dos vírus só ocorrem nas camadas superiores do tecido epitelial (DOORBAR, 2005; STANLEY, 2008).

Figura 6 – Ciclo de vida do HPV. Diferentes proteínas virais são expressas em cada etapa do ciclo, em diferentes camadas do tecido epitelial.

Fonte: Adaptado de Stanley, 2008.

A infecção inicial ocorre quando a partícula infecciosa tem acesso às células da camada basal. O vírus penetra na célula através da interação de proteínas do capsídeo com receptores de superfície da célula hospedeira. Existem controvérsias a respeito do receptor de superfície celular que permite a ligação inicial vírus-célula (DOORBAR, 2005). Os primeiros estudos demonstraram que a alfa-6 integrina é um receptor celular para os PVs (EVANDER et al., 1997), porém a maioria dos estudos aponta uma dependência de receptores de heparan sulfato para a entrada do HPV (DOORBAR, 2005; JOHNSON et al., 2009). Também já foi demonstrado que VLPs do HPV16 podem ser internalizadas por leucócitos via receptor de transferrina (SZULCZEWSKI et al., 2009; SZULCZEWSKI, 2009). As etapas que levam à

internalização do vírion ainda não são completamente compreendidas, mas sugere-se que a ligação ao receptor primário de superfície celular (provavelmente o heparan sulfato) resulte em uma mudança conformacional no capsídeo, que expõe o sítio de clivagem da furina, localizado na porção N-terminal da L2. Esta clivagem expõe os epítomos de L2 capazes de induzir ampla neutralização cruzada e parece ser crítica para a ligação do vírion a um receptor específico para L2 (DAY et al., 2008).

Atualmente acredita-se que todos os HPVs tenham acesso às células basais através de uma microabrasão que rompe o epitélio estratificado. Após a entrada do vírion na célula hospedeira, a desmontagem do capsídeo viral parece ser facilitada pela quebra das pontes dissulfeto intracapsoméricas, que ocorre no ambiente redutor intracelular, permitindo que o DNA viral seja transportado para o núcleo. Após a entrada e desmontagem do vírus, cerca de 50 a 100 cópias do genoma viral são mantidos por célula, de forma extracromossômica, e não há produção de proteínas do capsídeo viral, nesta que é chamada de fase não reprodutiva do ciclo viral. O baixo nível de expressão gênica e de cópias genômicas se deve, pelo menos em parte, à presença de proteínas celulares que regulam negativamente a expressão do genoma viral. A fase produtiva, que compreende a amplificação do DNA viral e a produção dos vírions, ocorre nas camadas celulares mais diferenciadas. O HPV não codifica suas próprias enzimas de replicação, ele utiliza as enzimas da célula hospedeira, queratinócitos diferenciados cujas proteínas de replicação estariam reguladas negativamente, porém, o vírus força essas células a manterem seu ciclo celular ativo, garantindo um ambiente compatível com a amplificação do DNA viral (BODILY; LAIMINS, 2011; KLINGELHUTZ; ROMAN, 2012; LI et al., 1998; STANLEY, 2008).

Após a infecção das células epiteliais não diferenciadas, as proteínas E1 e E2 são expressas e regulam a replicação viral e a expressão das outras proteínas E (de expressão precoce). Conforme as células infectadas migram para as camadas mais superficiais, os oncogenes E6 e E7 são expressos e modificam o ciclo celular para manter os queratinócitos em um estado favorável à amplificação do genoma viral, formando complexos com produtos de genes supressores tumorais. A E6 ubiquitina a p53, isto é, marca a p53 para que seja degradada pela via da ubiquitina-proteassoma, que termina por inibir a apoptose. A E7 se liga à pRb (proteína de retinoblastoma), impedindo que esta se ligue a fatores de transcrição E2F, assim o E2F pode se ligar e ativar seus alvos para facilitar a progressão do ciclo celular. A

afinidade de ligação da E6 e E7 com a p53 e pRb, respectivamente, é diferente nos tipos de HPV de alto e baixo risco (BEST; NIPARKO; PAI, 2012).

A ativação dos genes que codificam as proteínas do capsídeo viral ocorre em resposta à diferenciação celular, nas camadas mais superficiais. Nas células mais diferenciadas, a transcrição dos genes E1, E2, E1^{E4} e E5 aumenta e o número de cópias virais chega a alguns milhares por célula. As proteínas do capsídeo viral são então produzidas e os vírions são montados nos queratinócitos. Os vírions são liberados no meio ambiente com as células que descamam, não havendo lise nem necrose, evitando um processo inflamatório e contribuindo para a perseverança viral (BODILY; LAIMINS, 2011).

Visto que nem todas as pessoas infectadas por HPVs de alto risco desenvolvem câncer, alterações genéticas adicionais são necessárias para a transformação maligna (DUENSING; MÜNGER, 2004; MOODY; LAIMINS, 2010). As principais etapas do desenvolvimento do câncer de colo do útero são: infecção do epitélio do colo uterino em uma região chamada zona de transformação, persistência viral, progressão do epitélio com infecção persistente para uma lesão pré-cancerosa e invasão através da membrana basal do epitélio (SCHIFFMAN et al., 2007). As proteínas virais E5, E6 e E7 são as principais responsáveis pelo início e progressão do câncer, ao vencerem a regulação negativa do crescimento celular feita pelas proteínas do hospedeiro e ao induzirem instabilidade cromossômica (MOODY; LAIMINS, 2010). As oncoproteínas E6 e E7 do HPV permitem a evasão ativa do sistema imune por meio de mecanismos moleculares como alterações na via de sinalização do interferon, redução da expressão de moléculas MHC de classe 1 e interferindo na expressão de receptores Toll-like 9. Neste último caso, é interessante notar que as oncoproteínas E6 e E7 do HPV16, responsável pela metade dos casos de câncer cervical invasivo, são muito mais eficientes na regulação negativa da expressão desses receptores do que as oncoproteínas do HPV18, o segundo tipo de HPV mais comum nessas lesões (HASAN et al., 2007; PALMER et al., 2009).

Um evento importante na carcinogênese induzida por HPV é a integração do genoma viral ao cromossomo do hospedeiro, o que ocorre geralmente em regiões de instabilidade genômica. A habilidade das oncoproteínas E6 e E7 agirem de maneira cooperativa, atingindo importantes reguladores de proliferação celular, apoptose, imortalização e estabilidade genômica promove o surgimento de uma população de células com vantagens de crescimento e aumentada propensão para a transformação e progressão maligna. Revisões detalhadas destes mecanismos podem ser encontradas em (MOODY; LAIMINS, 2010; ZUR

HAUSEN, 2002). Sabe-se que as oncoproteínas E6 e E7 dos HPVs de alto risco são expressas em um RNA mensageiro bicistrônico, possuem funções de estímulo da progressão do ciclo celular e se associam a reguladores desse ciclo. Alguns mecanismos de ação das oncoproteínas virais já estão bem estabelecidos, como a associação com supressores de tumor e outras proteínas envolvidas na proliferação celular (DOORBAR, 2005). Um estudo recente demonstrou a presença da E6 intramitocondrial, tanto em células naturalmente transformadas por HPV quanto em células transfectadas (KAVATI, 2012).

Apesar da habilidade do HPV para impedir as defesas do hospedeiro, na maioria dos casos é estabelecida uma resposta imune de sucesso, que leva à regressão da lesão e geração de anticorpos neutralizantes. A maioria dos indivíduos infectados gera anticorpos específicos contra epítomos conformacionais da proteína L1, localizados na superfície externa da partícula viral intacta. Os níveis de anticorpos neutralizantes gerados após a infecção natural por HPV são baixos, porém, animais infectados que geram anticorpos ficam protegidos contra novas infecções virais e essa proteção pode ser transmitida a animais naive (não previamente infectados) ao transferir para eles o soro contendo anticorpos. Isso sugere que uma vacina que gere anticorpos neutralizantes contra a proteína L1 do HPV pode ser capaz de prevenir a infecção (STANLEY, 2006; STANLEY, 2008; SUZICH et al., 1995).

1.4 Vacinas contra o HPV

Durante muitos anos o desenvolvimento de uma vacina contra o HPV foi dificultado devido ao fato desses vírus não se multiplicarem suficientemente em culturas celulares e, mesmo se o fizessem, as vacinas utilizando vírus atenuados conteriam oncogenes virais, o que seria proibitivo para uso profilático. Este obstáculo foi vencido utilizando a proteína L1 do capsídeo viral para produzir VLPs, que não contêm DNA viral mas são capazes de ativar uma forte resposta imunológica (SCHILLER; LOWY, 2000; SZAREWSKI, 2012). As primeiras tentativas de produção de VLPs em bactérias não obtiveram sucesso, pois as proteínas purificadas eram predominantemente malformadas e incapazes de induzir boa formação de anticorpos em modelos animais (SCHILLER; LOWY, 2000).

A proteína L1 precisa estar na conformação de estrutura terciária ou nativa e estruturada com outras proteínas formando, por exemplo, pentâmeros, para que sejam gerados anticorpos neutralizantes, aqueles capazes de se ligar ao vírus, sinalizar ao sistema

imune e impedir o vírus de completar a infecção (DILLNER, 1999; STANLEY, 2006). Porém, produzir estas proteínas na conformação adequada era um objetivo tecnicamente difícil. Para superar esta dificuldade o gene da proteína L1 foi inserido em vetores de expressão, como os baculovírus recombinantes para expressão em células de inseto ou plasmídeos para expressão em leveduras. O sucesso das vacinas contra o HPV veio com a descoberta de que a L1 poderia se dobrar corretamente e se autoestruturar em VLPs quando expressa em células eucarióticas. Essas VLPs possuem a conformação correta, são um capsídeo vazio (sem DNA viral) morfologicamente idêntico ao vírus, contém os principais epítomos neutralizantes e induzem alta produção de anticorpos capazes de prevenir a infecção por vírions autênticos em modelos animais. Isto fez das VLPs de L1 um imunógeno candidato para a vacinação profilática de humanos (AIRES et al., 2006; BAZAN et al., 2009; SCHILLER; LOWY, 2000; SCHILLER; LOWY, 2012; STANLEY, 2006, 2010).

Como os HPVs não infectam animais, os estudos pré-clínicos foram conduzidos utilizando PVs animais e suas VLPs correspondentes. Três modelos animais foram utilizados: coelhos, cães e vacas, que foram desafiados com VLPs de L1 dos vírus CRPV (*Cottontail Rabbit PapillomaVirus*), COPV (*Canine Oral PapillomaVirus*) e BPV4 (*Bovine PapillomaVirus type 4*), respectivamente. Nesses animais a vacinação induziu a formação de anticorpos e protegeu contra o desafio experimental com tipos homólogos de VLPs. Os resultados positivos dos estudos com animais levaram a indústria farmacêutica a iniciar os testes clínicos das vacinas de VLPs contra o HPV (SCHILLER; LOWY, 2000; SCHILLER; LOWY, 2012).

Em testes clínicos, as vacinas recombinantes produzidas com VLPs de L1 do HPV16 mostraram ser bem toleradas e altamente imunogênicas, mesmo quando aplicadas sem adjuvantes. Os indivíduos que receberam esta vacina mostraram níveis de anticorpos 40 vezes maiores do que aqueles alcançados em infecções naturais (HARRO et al., 2001).

As vacinas profiláticas contendo VLPs de HPV são capazes de contornar as estratégias de evasão viral que ocorrem na infecção natural, por serem injetadas intramuscularmente. As VLPs são altamente imunogênicas, capazes de induzir resposta imunológica mesmo na ausência de adjuvantes, por ativarem tanto a resposta imune inata quanto a adaptativa. As VLPs se ligam às células dendríticas do estroma muscular que migram com seu conteúdo até o linfonodo, iniciando uma cascata imunológica que gera altos níveis de anticorpos neutralizantes específicos contra L1 e induz memória imunológica (STANLEY, 2008).

Atualmente existem duas vacinas profiláticas comerciais contra o HPV, a quadrivalente Gardasil® da Merck (Merck and Co., Whitehouse Station, NJ, Estados Unidos) e a bivalente Cervarix® da GSK (GlaxoSmithKline, Londres, Inglaterra). A Gardasil® foi licenciada nos Estados Unidos em 2006 pelo FDA (*Food and Drug Administration*, órgão governamental responsável por alimentos e medicamentos) para mulheres entre 9 e 26 anos, para prevenção do câncer de colo do útero, lesões pré-cancerosas e verrugas anogenitais causados pelos HPVs 6, 11, 16 e 18. Esta vacina mostrou ser eficaz por cinco anos contra os HPVs 16, 18 e 31, os três tipos mais comuns causadores de câncer de colo do útero, além de ser também eficaz contra os HPVs 6 e 11, causadores de verrugas anogenitais e papilomas respiratórios. Em 2009 o FDA aprovou a Cervarix®, para a prevenção do câncer de colo do útero e lesões pré-cancerosas causadas pelos HPVs 16 e 18, para o uso em mulheres entre 10 e 25 anos. Esta vacina mostrou ser eficaz por cerca de seis anos contra os HPVs 16, 18, 31, 33 e 45, os cinco tipos causadores de câncer mais comuns (GERSCH; GISSMANN; GARCEA, 2012; HARPER, 2009; LEPIQUE; RABACHINI; VILLA, 2009; POLJAK, 2012). Ambas as vacinas citadas são compostas por VLPs de L1, porém apresentam algumas diferenças entre si (Tabela 1).

Tabela 1 - Atuais vacinas profiláticas comerciais contra o HPV

	Gardasil®	Cervarix®
Tipos de HPV	6, 11, 16 e 18	16 e 18
Dose de proteína L1	20, 40, 40 e 20 µg	20 e 20 µg
Célula produtora	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (levedura) com plasmídeo recombinante	<i>Trichoplusiani</i> (linhagem celular de inseto infectada com baculovírus recombinante)
Adjuvante	225 µg de sulfato de hidroxifosfato de alumínio	AS04: 500 µg de hidróxido de alumínio, 50 µg de 3-O-desacil-4'-monofosforil lipídio A (MPL)
Escala de imunização	0, 2, 6 meses	0, 1, 6 meses
Indicação	Homens e mulheres entre 9 e 26 anos (FDA)	Mulheres entre 9 e 15 anos (FDA)

Fonte: Adaptado de Lepique, Rabachini e Villa, 2009; Poljak, 2012).

Diversos estudos mostram que quando são administradas três doses de uma dessas vacinas em pacientes não infectados por HPV, ambas são seguras e altamente eficazes (valores próximos a 100%) na prevenção das doenças alvo em estudos clínicos internacionais

de fase III (GARLAND et al., 2007; JOURA et al., 2007; PAAVONEN et al., 2009; WHEELER et al., 2012).

Desde 2006 essas vacinas já foram licenciadas em mais de 110 países, e mais de 120 milhões de doses já foram distribuídas. Em março de 2012 a vacinação contra o HPV já havia sido incluída em programas nacionais de vacinação de mais de 40 países em todos os continentes. Os Estados Unidos, a Austrália e o Canadá foram os primeiros a introduzirem a vacina contra o HPV em seus calendários, seguidos por diversos países europeus. Infelizmente, poucos países em desenvolvimento implementaram essa vacinação até o momento (POLJAK, 2012). As vacinas licenciadas têm custo muito elevado para serem estabelecidas de maneira global e atingirem as populações que mais se beneficiariam destas vacinas (RODEN; WU, 2006).

Uma das primeiras evidências do impacto da vacinação de uma população contra o HPV é da Austrália, que vacinou mulheres entre 12 e 26 anos, com uma cobertura vacinal de 80% para uma dose e 70% para as três doses da vacina quadrivalente (BROTHERTON et al. 2008 apud HAUPT; SINGS, 2011). Alguns estudos demonstraram uma queda importante na incidência de verrugas genitais em homens e mulheres (DONOVAN et al., 2011; READ et al., 2011) e também um declínio modesto, porém significativo, das lesões cervicais de alto grau, desde o estabelecimento da vacinação contra o HPV (HAUPT; SINGS, 2011).

No Brasil a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) aprovou a aplicação da vacina quadrivalente Gardasil® em mulheres em 2008 e em homens em 2011, ambos na faixa entre 9 e 26 anos. A bivalente Cervarix® teve seu registro publicado em 2008 e é indicada para mulheres entre 10 e 25 anos. A vacina quadrivalente pode ser comercializada ao preço máximo de R\$ 373,88 a dose, e a bivalente a R\$ 286,00 a dose (FERNANDES, 2011). Apesar de terem sido aprovadas no Brasil e de um estudo recente demonstrar que a vacina quadrivalente pode ter boa relação custo-benefício para a saúde pública, a vacinação contra o HPV ainda não foi introduzida no programa nacional de vacinação (KAWAI et al., 2012).

Apesar do elevado valor da vacina, algumas cidades dos estados de São Paulo, Bahia e Rio Grande do Sul já realizam campanhas de vacinação pública contra o HPV. O Rio de Janeiro também já sancionou lei determinando o fornecimento gratuito das vacinas e outras cidades e estados brasileiros estão empenhados em incluir a vacinação contra o HPV no calendário nacional de vacinação pública, demonstrando uma grande oportunidade para o

desenvolvimento de uma vacina nacional que já teria comprador certo, o Ministério da Saúde (SIL, 2012; TOMAZELA, 2011).

O desempenho das atuais vacinas comerciais contra o HPV ainda não está completamente esclarecido. As principais dúvidas são quanto à duração da proteção e se reforços vacinais são necessários e se são, quando devem ser realizados. Também não está claro se altos níveis de anticorpos circulantes tem relação com a duração da proteção, porque ainda não foi estabelecido o nível mínimo de anticorpos necessários para proteção contra a infecção. A importância clínica da proteção cruzada e a eficácia dessas vacinas contra outros tipos de HPV além dos tipos alvo também não estão claramente elucidados. A proteção cruzada é um fator importante, visto que tipos de HPV não presentes nas vacinas são responsáveis por cerca de 30% dos cânceres de colo do útero no mundo (LOWY; SCHILLER, 2012; POLJAK, 2012).

A imunização com VLPs de L1 gera altos níveis de anticorpos neutralizantes (KIRNBAUER et al., 1992) específicos contra os tipos de HPV cujas proteínas L1 estão contidas nas vacinas, apesar de algumas reações cruzadas terem sido relatadas. A eficácia das vacinas atuais contra outros tipos de HPV é variável, e depende, em parte, da similaridade filogenética entre os vírus (SMITH et al., 2007). A vacinação com VLPs de L1 dos HPVs 16 e 18 juntamente com o adjuvante AS04 (composto pelo imunomodulador MPL, um estimulante do sistema imune e hidróxido de alumínio) demonstrou ser capaz de proteger também contra os HPVs 31, 33, 45 e 51, cujas proteínas L1 se assemelham às dos HPVs contidos na vacina (WHEELER et al., 2012). Porém, os níveis de neutralização na reação cruzada são sabidamente menores e a duração da proteção-cruzada ainda é incerta (POLJAK, 2012).

Uma proteção completa contra o câncer de colo do útero causado pelo papilomavírus humano requer programas de rastreamento das lesões precursoras e programas de vacinação simultâneos. Para ampliar o espectro de proteção podem ser desenvolvidas vacinas polivalentes, mas para isso algumas dificuldades técnicas devem ser superadas. Apesar da provável redução do preço da vacina ao longo do tempo, espera-se que uma nova geração de vacinas de amplo espectro de proteção possa ter uma produção mais barata, em larga escala, que chegue mais rápido às populações alvo e com ampla cobertura vacinal (GARLAND; SMITH, 2010).

1.5 Novas alternativas vacinais contra o HPV

Além da proteção restrita a alguns poucos tipos de HPV, as limitações das vacinas atuais incluem alto custo, necessidade de refrigeração, injeções intramusculares e múltiplas doses. Sendo assim, diversas vacinas de segunda geração estão sendo desenvolvidas para superar essas limitações. As vacinas de segunda geração em desenvolvimento incluem vacinas de capsômeros de L1, sistemas alternativos de expressão de VLPs de L1, vetores recombinantes para entrega da L1, vacinas de L1 multivalentes, vacinas de L2, vacinas de proteínas L2 fusionadas, vacinas contendo epítomos de L2, vacinas de DNA de HPV e modelos alternativos de entrega da vacina. Todas essas novas abordagens apresentam vantagens e desvantagens. Uma revisão dessas estratégias foi bem realizada por Gersch e colaboradores (GERSCH; GISSMANN; GARCEA, 2012).

O espectro de proteção das vacinas de VLPs de L1 pode ser aumentado pela inclusão de proteínas L1 derivadas de outros tipos de HPV, assim alguns grupos de pesquisa se dedicam à produção de vacinas multivalentes, contendo oito ou nove tipos de L1. Entretanto a proteção gerada ainda não será total e esta abordagem aumenta a complexidade da produção e dos testes, aumentando consequentemente o custo da vacina (GERSCH; GISSMANN; GARCEA, 2012). O custo é um ponto importante para que a vacinação contra o HPV ocorra mundialmente, enquanto que a amplitude de proteção é particularmente significativa nos países onde os programas de rastreamento do câncer cervical são inexistentes ou ineficientes (RODEN; GRAVITT; WU, 2008).

Diferentes abordagens utilizam a proteína L2 para a geração de vacinas candidatas. As vacinas baseadas na proteína L2 do capsídeo viral são capazes de induzir a geração de anticorpos neutralizantes em animais, porém em nível menor quando comparada à indução pela L1. Essas vacinas são capazes de induzir uma ampla proteção cruzada em modelos animais devido à porção N-terminal da L2 ser altamente conservada entre diferentes tipos de HPV. A sequência de aminoácidos dessa região parece ser conservada devido à sua importância para a entrada dos vírions na célula hospedeira, interagindo com um receptor da superfície celular crucial para a infecção viral, ainda não identificado (CIANCIARULLO et al., 2010; GAMBHIRA et al., 2007a,b; GERSCH; GISSMANN; GARCEA, 2012; MARIGLIANI et al., 2012).

O anticorpo monoclonal RG-1, que reconhece um peptídeo altamente conservado da L2 do HPV16 (aminoácidos 17 ao 36) demonstrou ser capaz de neutralizar a infecção pelos HPVs 16 e 18. Outro anticorpo, o policlonal 17/36, gerado contra o mesmo peptídeo, demonstrou ter um perfil de neutralização cruzada mais amplo, prevenindo também contra a infecção pelos HPVs 5, 6, 11, 31, 45, 52 e 58 e pelo BPV1 (GAMBHIRA et al., 2007a). Anticorpos induzidos pela imunização de coelhos com o peptídeo sintético P56/75, que contém a sequência de aminoácidos 56 ao 75 da L2 do HPV16, é capaz de neutralizar vírus e pseudovírus de diversos tipos de HPV de alto risco, indicando que existem pelo menos dois epítomos capazes de neutralização cruzada nesta região da L2 (NAKAO et al., 2012). O soro de coelhos imunizados com pequenos peptídeos sintéticos correspondentes a segmentos entre os aminoácidos 18 e 144, da região superficial da L2 do HPV16, foi capaz de neutralizar pseudovírus dos HPVs 16, 18, 31 e 58. Isto demonstra que a imunização de animais com a L2 é capaz de induzir a produção de anticorpos capazes de neutralização cruzada, que protegem contra a infecção por PVs inclusive de outras espécies. A vacinação de coelhos com o peptídeo 11-200 da L2 do HPV16 gerou anticorpos séricos capazes de ampla neutralização cruzada, sugerindo o potencial da L2 como um antígeno candidato para vacinas de segunda geração (GAMBHIRA et al., 2007b; KONDO et al., 2007).

A proteína L2 parece ser menos imunogênica do que as VLPs de L1 e a imunogenicidade adquirida pode diminuir ao longo do tempo, pois ela não produz os mesmos níveis de anticorpos neutralizantes, embora os testes de neutralização *in vitro* utilizando pseudovírus possam não ser apropriados para avaliar as respostas comparativamente (GERSCH; GISSMANN; GARCEA, 2012). Coelhos vacinados com a porção N-terminal do CRPV (*Cottontail Rabbit PapillomaVirus*) (EMBERS et al., 2002) e vacas imunizadas com peptídeos de L2 do BPV (*Bovine PapillomaVirus*) geraram baixos títulos de anticorpos neutralizantes, porém ficaram protegidos contra a infecção por PVs (CHANDRACHUD et al., 1995).

Já foram propostas vacinas de DNA contendo o gene da L2, que seriam provavelmente seguras, estáveis, facilmente administradas e de baixo custo, apesar de serem menos potentes do que as vacinas virais. Estudo utilizando camundongos demonstrou que o DNA de L2 gerou baixos níveis de anticorpos e que estes não eram neutralizantes (GERSCH; GISSMANN; GARCEA, 2012; HITZEROTH et al., 2009). Outro estudo utilizou uma vacina de

DNA contendo os genes para as proteínas L2, E6, E7 e calreticulina humana, capaz de produzir efeitos preventivos e terapêuticos em camundongos (KIM et al., 2008).

Outra abordagem é a adição de epítomos de L2 a proteínas recombinantes, a fim de aumentar a imunogenicidade da L2. Um dos estudos demonstrou que a tioredoxina fusionada a múltiplas cópias do epítomo correspondente aos resíduos 20 a 38 da L2 do HPV16 é capaz de induzir a formação de anticorpos que neutralizam o HPV16 e a neutralização cruzada dos HPVs 18, 45, 31 e 58 (RUBIO et al., 2009). Uma vacina de lipopeptídeo contendo os resíduos 17 a 36 da L2 do HPV16 acoplados a epítomos T-helper (auxiliares) e a um ligante do receptor Toll-like foi capaz de gerar anticorpos neutralizantes contra os HPVs 5, 16, 18 e 45 e BPV1 em camundongos (ALPHS et al., 2008). Epítomos de L2 derivados de diferentes tipos de HPV foram fusionados uns aos outros em peptídeos de L2 encadeados multítipos. Um peptídeo que demonstrou atividade de neutralização cruzada contém os aminoácidos 11 a 88 da L2 dos HPVs 1, 5, 6, 16 e 18, expresso em *E. coli* e adicionado a capsômeros de L1 (JAGU et al., 2009, 2010). Outra abordagem que utiliza a L2 é a construção de AAVLPs, VLPs compostas pela proteína VP3 do adenovírus-associado contendo epítomos da L2 dos HPVs 16 e 31, que demonstraram a capacidade de neutralização cruzada contra diferentes tipos de HPV (NIETO et al., 2012).

A proteína L2 também já foi utilizada em pseudovírus compostos pelas proteínas L1 e L2 do HPV58 contendo um plasmídeo para a expressão da L2 do HPV31 com o objetivo de induzir altos níveis de anticorpos neutralizantes anti-L1 e simultaneamente aumentar a imunogenicidade da L2 ao expressá-la em níveis maiores do que os possíveis nas VLPs de L1L2. Esse sistema se mostrou ser eficaz em animais, visto que os camundongos imunizados com os pseudovírus capazes de codificar a L2 produziram níveis significativamente mais altos de anticorpos capazes de neutralização cruzada do que aqueles que receberam VLPs de L1L2, isentas de plasmídeo para expressão da L2. Sendo assim esses pseudovírus utilizados juntamente com adjuvantes podem ser candidatos para uma vacina com maior espectro de proteção contra o HPV (COMBELAS et al., 2010).

Outra estratégia para aumentar a imunogenicidade da L2 é expor o antígeno em alta densidade. As próprias VLPs podem ser utilizadas como plataforma para a exposição de epítomos de L2, aproveitando as características imunogênicas dos vírions, com sua superfície repetitiva, para gerar uma resposta imune forte e duradoura contra os epítomos expostos. Para isso foram produzidas as chamadas VLPs quiméricas de L1L2. Diferentes fragmentos da

porção N-terminal da L2 do HPV16 foram inseridos nos loops DE de VLPs de L1 do BPV1 e do HPV16. A imunização de coelhos e camundongos com VLPs contendo epítomos de L2 (resíduos de aminoácidos do 17 ao 36) gerou anticorpos neutralizantes contra HPVs de alto e baixo risco, incluindo os tipos 5, 6, 11, 16, 18, 31, 45, 52 e 58 (SCHELLENBACHER; RODEN; KIRNBAUER, 2009). Em 2003, partículas de L1 quiméricas, contendo um epítopo da L2 comum entre os HPVs 6 e 16 capaz de induzir a geração de altos níveis de anticorpos neutralizantes, já demonstravam o potencial dessas partículas para vacinas multivalentes (VARSANI et al., 2003).

As VLPs compostas por ambas as proteínas completas do capsídeo viral, L1 e L2, são mais semelhantes ao vírion nativo e teoricamente mais estáveis, o que levou alguns grupos de pesquisa a avaliar o potencial das VLPs de L1L2 como antígeno vacinal de amplo espectro contra o HPV. Porém, as VLPs de L1L2 não demonstraram ser capazes de gerar anticorpos neutralizantes anti-L2 detectáveis (GERSCH; GISSMANN; GARCEA, 2012). Alguns estudos demonstraram que VLPs de L1L2 não são melhores do que as VLPs de L1, visto que a resposta imune gerada após a vacinação com VLPs de L1L2 é predominantemente anti-L1 (KIRNBAUER et al., 1996; RODEN et al., 2000; WANG; RODEN, 2013). A necessidade da clivagem da L2 na superfície celular para expor epítomos de L2 capazes de neutralização cruzada fornece uma explicação para o fato da vacinação com VLPs de L1L2 não induzirem resposta com maior neutralização cruzada do que a vacinação com VLPs compostas somente por L1 (RODEN et al., 2000). A mesma explicação para este fenômeno foi proposta por Day e colaboradores (DAY et al., 2008), que sugerem que os epítomos de L1 podem ser dominantes em relação aos de L2 e que a L2 não está exposta na superfície do capsídeo até que o vírion se ligue à célula hospedeira e ocorra uma mudança conformacional que permita a exposição e clivagem da L2 (GERSCH; GISSMANN; GARCEA, 2012). As razões para a baixa geração de anticorpos anti-L2 em resposta à vacinação com VLPs de L1L2 ainda não foram completamente esclarecidas, mas podem ser atribuídas também à maior quantidade de L1 em relação à L2 nas VLPs de L1L2. Sendo assim, é necessário encontrar maneiras de expor a L2 ao sistema imune para que sejam gerados anticorpos anti-L2 em quantidade suficiente para oferecer proteção, e diferentes grupos estão trabalhando neste sentido (CIANCIARULLO et al., 2010; KARANAM et al., 2009; SCHILLER; LOWY, 2000; WANG; RODEN, 2013).

Vacinas de L2 são capazes de induzir a geração de anticorpos capazes de neutralização cruzada de amplo espectro. Porém, sabe-se que a proteína L2 e os peptídeos derivados da L2

são menos imunogênicos do que as VLPs de L1. Além disso, já foi demonstrado que a incorporação da proteína L2 às VLPs de L1 não geram resposta anti-L2 devido à imunodominância da L1 (COMBELAS et al., 2010; RODEN et al., 2000). Sabe-se que a L2 que compõe VLPs é menos imunogênica do que a L1, porém as VLPs de L1L2 são mais capazes de induzir anticorpos com neutralização cruzada do que VLPs compostas somente pela L1. Sendo assim, os pseudovírus que codificam a L2, VLPs quiméricas de L1L2 e formulações que contenham peptídeos de L2 parecem ser as estratégias mais promissoras para o desenvolvimento de vacinas de amplo espectro contra o HPV (COMBELAS et al., 2010). A proteína L2 é bastante promissora no desenvolvimento de vacinas de amplo espectro de proteção contra o HPV16, e diferentes estratégias têm sido apresentadas por diferentes grupos de estudo. Entre elas, as VLPs quiméricas de L1 do HPV contendo epítomos de L2 capazes de neutralização cruzada parecem ser um antígeno vacinal interessante, por serem altamente imunogênicas e capazes de exibir corretamente os epítomos de L2, sem afetar a habilidade da L1 induzir a geração de altos níveis de anticorpos tipo específicos. Os epítomos de L2 podem ser inseridos nas regiões de imunodominância da proteína L1, visto que tanto os epítomos neutralizantes de amplo espectro da L2 quanto as regiões ideais de inserção na L1 já foram identificados. Algumas VLPs quiméricas já demonstraram ser capazes de gerar anticorpos neutralizantes (GAMBHIRA et al., 2007b; NIETO et al., 2012; SEITZ et al., 2013).

A maioria dos cânceres associados ao HPV ocorre em países em desenvolvimento, em áreas onde as mulheres têm pouco ou nenhum acesso a cuidados ginecológicos incluindo programas de rastreamento de lesões precursoras. Sendo assim, há uma necessidade urgente de uma vacina profilática de amplo espectro de ação contra os diversos tipos de HPVs e que seja economicamente viável para os países em desenvolvimento, seja através de políticas públicas para distribuição de vacinas licenciadas ou do desenvolvimento e distribuição de vacinas de nova geração (CIANCIARULLO et al., 2010; MARIGLIANI et al., 2012; PALMER et al., 2009).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Produzir e caracterizar VLPs compostas pelas proteínas L1 e L2 do HPV16, visando contribuir com o desenvolvimento de uma vacina profilática de amplo espectro de proteção contra os diversos tipos de HPVs.

2.2 Objetivos específicos

- Expressar as proteínas heterólogas L1 e L2 do HPV16 em culturas de células humanas da linhagem HEK293T;
- Analisar a expressão e a localização intracelular das proteínas L1 e L2 de HPV16;
- Verificar a formação de VLPs compostas pelas proteínas L1 e L2 do HPV16;
- Extrair as VLPs compostas pelas proteínas L1 e L2 do HPV16;
- Analisar a estrutura e composição das VLPs extraídas;
- Avaliar as possíveis contribuições das VLPs de L1L2 no desenvolvimento de uma vacina profilática de amplo espectro contra o HPV.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Vetores plasmideais para expressão das proteínas do HPV16

Para a expressão heteróloga dos genes L1 e L2 do capsídeo do HPV16, os vetores plasmideais de DNA pUF3L1h e pUF3L2h foram generosamente fornecidos pelo Prof. Dr. Martin Müller (Forschungsschwerpunkt Angewandte Tumorstudiologie, DKFZ-Heidelberg, Alemanha). Ambos os vetores (Figura 7) foram construídos sob regulação do promotor constitutivo do citomegalovírus humano (pCMV), contêm o gene de resistência a ampicilina e o gene repórter GFP (*Green Fluorescent Protein*) que permite a monitoração da expressão proteica transiente, além dos respectivos genes humanizados para expressão das proteínas L1 e L2 do capsídeo do HPV16.

Figura 7 - Vetores plasmideais. Vetor pUF3L1h para expressão da proteína L1 do HPV16 (A) e vetor pUF3L2h para expressão da proteína L2 do HPV16 (B).

Fonte: Prof. Dr. Martin Müller.

Para a amplificação dos vetores foram utilizadas bactérias *Escherichia coli* da linhagem DH5 α , gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Itamar Romano Garcia Ruiz, do Instituto Butantan (SP, Brasil). Esta linhagem permite manipulações genéticas como propagação e amplificação de DNAs plasmideais. A indução da quimiocompetência das DH5 α foi realizada segundo o método de Hanahan, baseado na permeabilização da membrana plasmática utilizando solução de cloreto de cálcio, descrito em (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Este

método consiste em cultivar as bactérias em meio LB (Luria-Bertani, composto por triptona a 1%, extrato de levedura a 0,5% e cloreto de sódio a 0,5%) a 37 °C sob agitação de 250 rpm até a metade da fase exponencial de crescimento ($D.O_{600nm} = 0,6$), em seguida incubar as bactérias em solução de 0,1 M de $CaCl_2$ por 1 h em gelo, centrifugar a 5.000 x g por 10 min, ressusender em meio LB contendo 20% de glicerol. Alíquotas de 200 µl de bactérias quimiocompetentes foram armazenadas a -80 °C até o momento de sua utilização.

A transformação das bactérias quimiocompetentes foi realizada também segundo o método de Hanahan descrito em (SAMBROOK; RUSSEL, 2001), que consiste em adicionar uma alíquota de 10 µl de DNA plasmideal à alíquota de bactérias quimiocompetentes previamente preparada, incubar por 30 min em gelo, submeter a um choque térmico por 2 min a 42 °C e novamente incubar em gelo por 5 min. Em seguida foram adicionados 350 µl de meio LB incubando por 90 min a 37 °C. As bactérias transformadas foram então semeadas em placas contendo meio LB com ágar a 1,5% e ampicilina a 100 µg/ml, incubadas a 37 °C por 18 h. Após a incubação, os clones positivos (resistentes à ampicilina) foram inoculados em 3 ml de meio LB com ampicilina e cultivados a 37 °C por 18 h sob agitação de 250 rpm. Após o cultivo para amplificação dos plasmídeos, cada cultura foi centrifugada a 12.000 x g por 1min para separar as bactérias do meio de cultura. Para extração dos plasmídeos o precipitado bacteriano foi tratado com os reagentes do kit AxyPrep™ Plasmid Miniprep Kit (Axygen, Union City, Califórnia, Estados Unidos) de acordo com as orientações do fabricante. A presença do plasmídeo de interesse foi verificada por eletroforese em gel de agarose. A cada 5 µl da amostra a ser analisada foram acrescentados 5 µl de TE (tampão Tris-EDTA) e 1,5 µl de azul de bromofenol, sendo em seguida aplicada em gel de agarose a 1% em tampão TBE (Tampão Tris-borato-EDTA) e brometo de etídio, em cuba de eletroforese operada a 75 v e 220 mA. A concentração de DNA plasmideal de cada extração foi verificada utilizando espectrofotômetro NanoDrop™ 100 (ThermoScientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) e os plasmídeos purificados foram armazenados a -20 °C até o momento de utilização.

3.2 Cultivo de células humanas HEK293T

As células epiteliais humanas da linhagem HEK293T (Human Embryonic Kidney) são muito utilizadas para a expressão de proteínas recombinantes devido à sua facilidade de

transfecção e capacidade de realizar a maioria das modificações e processamentos pós-traducionais. Essas células, obtidas da ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, Estados Unidos) são provenientes de rim humano embrionário, foram transformadas pelo adenovírus humano tipo 5 (Ad5) e carregam uma cópia do gene que codifica o antígeno "large T" do SV40 (Simian vírus 40) integrado ao genoma.

As HEK293T foram plaqueadas na proporção de $1,1 \times 10^4$ células/ml e cultivadas em garrafas plásticas descartáveis de 75 cm² (TPP®, Techno Plastic Products, Zollstrasse, Trasadingen, Suíça) incubadas a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. O meio de cultura utilizado foi o D10, composto pelo meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Minimal Essential Medium*, Cultilab, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 10% de SBF (Soro Bovino Fetal, Cultilab). O meio de cultura foi trocado a cada três ou quatro dias e as células foram cultivadas nessas condições até atingirem de 50 a 80% de confluência, quando eram então subcultivadas, armazenadas ou utilizadas para a transfecção com os plasmídeos de interesse.

Para o subcultivo as células foram lavadas três vezes utilizando 3 ml de PBS (*Phosphate Buffered Saline*, solução salina tamponada com fosfato, composta por 137 mM de NaCl, 12 mM de Fosfato e 2,7 mM de KCl, pH 7,4), destacadas utilizando 1 ml de tripsina (Trypsin/EDTA Solution 2,5g/L, Cultilab) por cerca de 10 min. Após se mostrarem isoladas ao serem observadas em microscópio invertido, as células foram ressuspensas em 2 ml de meio D10, contadas em câmara de Neubauer, acrescentado meio D10 na proporção adequada e as alíquotas foram plaqueadas em novas garrafas e cultivadas nas mesmas condições anteriores ao subcultivo.

Para o armazenamento as células foram colocadas em criotubos contendo meio D10 acrescido de 10% DMSO (dimetilsulfóxido) na concentração de 2×10^4 células/ml, congeladas gradativamente e mantidas em tanque de nitrogênio líquido a -192 °C.

3.3 Transfecção e produção das proteínas recombinantes

Para a transfecção e expressão heteróloga das proteínas L1 e L2 do capsídeo do HPV16, células HEK293T foram cultivadas nas mesmas condições descritas anteriormente até atingirem 50 a 80% de confluência, quando eram transfectadas com os vetores para expressão da L1 ou L2 ou cotransfectadas com ambos os vetores para expressão das

proteínas L1 e L2, utilizando kit de transfecção transiente por lipofecção (GeneJuice® Transfection Reagent Kit, EMD Biosciences/Merk, Darmstadt, Alemanha) de acordo com as orientações do fabricante. Para cada garrafa de cultura a ser transfectada, foram adicionados em um tubo tipo Falcon estéril 550 µl de meio DMEM sem soro, sem antibiótico e sem antimicótico e 16,5 µl do reagente de transfecção, misturados em vórtex por 10 seg e incubados por 5 min a temperatura ambiente. Em seguida foram adicionados 5,5 µg do DNA plasmideal previamente extraído e purificado, este meio de transfecção foi homogeneizado e incubado por 15 min a temperatura ambiente. Em seguida o meio de transfecção foi adicionado às células, completando cada garrafa com 10 ml de meio de cultura DMEM sem soro, sem antibiótico e sem antimicótico, incubando por 4 h para que ocorresse a transfecção das células em cultura. Após esse período o meio de transfecção foi trocado por meio D10 e as células continuaram a ser cultivadas nas mesmas condições, para que ocorresse a expressão das proteínas de interesse.

Para monitorar a expressão da proteína L1 e estabelecer o melhor momento pós-transfecção para a coleta das células e posterior purificação das proteínas, realizamos uma cinética das células transfectadas por citometria de fluxo e microscopia confocal, analisando a expressão da proteína de interesse nos tempos 0, 3, 12, 24, 36 e 48 h pós-transfecção em ambos os métodos.

Para confirmação da expressão das proteínas L1 e L2, observação de suas localizações intracelulares e formação de VLPs, foram utilizadas microscopia confocal a laser e microscopia eletrônica de transmissão. O Western blotting foi outro método utilizado para confirmação da expressão proteica.

Para os ensaios de citometria de fluxo, microscopia confocal, microscopia eletrônica e Western blotting foram utilizados os mesmos anticorpos primários. Para detecção da proteína L1 foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-HPV16 L1 (BD Pharmingen®, San Diego, Califórnia, Estados Unidos), produzido em camundongos. Para detectar a L2 foi utilizado o anticorpo policlonal anti-HPV16 L2 produzido em coelhos (gentilmente cedido pelo Prof. Dr. R. B. S. Roden, da Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland, Estados Unidos).

3.4 Citometria de fluxo

Para as análises por citometria de fluxo, as células transfectadas com o vetor para expressão da L1 foram lavadas com PBS, destacadas com tripsina, ressuspensas em 2 ml de meio D10, centrifugadas a 200 x g, lavadas com PBS, incubadas por 30 min em Triton X-100 0,1% a temperatura ambiente e lavadas novamente com PBS. Em seguida, as células foram incubadas em PBS contendo 3% de BSA (albumina sérica bovina, Sigma-Aldrich®, Saint Louis, Missouri, Estados Unidos) e 0,05% de Tween 20 (Polyoxyethylenesorbitan monolaurate, Sigma-Aldrich®) por 30 min, lavadas com PBS e incubadas com o anticorpo primário anti-HPV16 L1 na concentração de 1:250 diluído em PBS contendo 3% de BSA por 1h. Após a incubação para ligação do anticorpo primário, as células foram lavadas com PBS, incubadas com o anticorpo secundário goat anti-mouse AlexaFluor® 488 (Molecular Probes®, Invitrogen™, Carlsbad, Califórnia, Estados Unidos) na concentração de 1:250 diluído em PBS contendo 3% de BSA por 1 h. As células foram lavadas novamente em PBS contendo 3% de BSA e analisadas utilizando o citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II e o software BD FACS Diva (BD Biosciences, San Jose, California, Estados Unidos).

Para a confirmação dos dados obtidos por citometria de fluxo, monitoramos a cinética da expressão proteica da proteína L1 utilizando microscopia confocal a laser, nos tempos 0, 3, 12, 24, 36 e 48 h pós-transfecção, conforme descrito no próximo item.

3.5 Microscopia confocal a laser

A microscopia confocal a laser (MCL) foi utilizada para a cinética da expressão da proteína L1; para confirmação da expressão e observação da localização intracelular das proteínas L1 e L2 em células transfectadas após 48 h; e para confirmação da expressão, observação da localização intracelular das proteínas L1 e L2 e formação de VLPs em células cotransfectadas após 12 h, 24 h e 48 h. O método descrito a seguir foi estabelecido em trabalhos anteriores (CIANCIARULLO et al., 2007, 2009, 2010; MARIGLIANI et al., 2012).

As células foram cultivadas sobre lamínulas de vidro redondas de 13 mm de diâmetro pré-tratadas com poli-L-lisina (Poly-L-lysine solution, Sigma-Aldrich®) em placas de cultura de 12 poços sob as mesmas condições de cultivo citadas anteriormente, até atingirem de 50 a 80% de confluência, quando foram transfectadas. Nos tempos pré-determinados, as células

foram lavadas com PBS, fixadas com paraformaldeído a 2% em PBS a 4 °C por 1 h, lavadas novamente com PBS e armazenadas por no máximo uma semana a 4 °C até o momento da imunomarcação. Os procedimentos a seguir foram realizados em câmara úmida a temperatura ambiente. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com PBS contendo 5% de BSA por 1 h, em seguida as lamínulas foram lavadas três vezes com PBS contendo BSA a 1% por 10 min cada e incubadas com o anticorpo primário específico anti-HPV16 L1 e/ou anti-HPV16 L2 diluídos na concentração de 1:250 (anti-L1) e 1:50 (anti-L2) em PBS contendo 0,5% BSA e 0,05% Tween 20 por 1 h. Após serem lavadas com PBS contendo 1% de BSA, as células foram incubadas por 1 h com o anticorpo secundário AlexaFluor® 488 goat anti-mouse IgG para detecção da L1 e/ou AlexaFluor® 633 goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes®) para detecção da L2, ambos na concentração de 1:250, diluídos em PBS contendo 1,5% de BSA e 0,01% de Tween 20. Após a incubação as células foram lavadas com PBS e a lamínula de vidro foi colocada sobre uma gota de 3 µl do meio de montagem anti-fading Mowiol, em alguns casos contendo PI (iodeto de propídio) na proporção de 1:100 para marcação dos ácidos nucleicos. O material foi mantido protegido da luz a 4 °C até o momento da análise em microscópio confocal a laser Zeiss LSM 510 Meta laser scanning microscope (Zeiss, Alemanha), utilizando o software LSM 5 Image. Todas as imagens de microscopia confocal foram realizadas em aumento utilizando objetiva C-Apocromática 63x/1.4 óleo.

Para os ensaios que incluíram a marcação de mitocôndrias, primeiramente as lamínulas foram incubadas com o marcador mitocondrial Mito Tracker® Deep Red (Molecular Probes®) na concentração de 40 nM/ml de PBS por 15 min. Após três lavagens com PBS foram seguidos os passos de bloqueio e imunomarcação conforme descrito anteriormente.

3.6 Microscopia eletrônica de transmissão

Utilizando a microscopia eletrônica de transmissão (MET), as células HEK293T não transfectadas foram analisadas para observação de sua morfologia celular normal e também serviram como controle negativo da expressão das proteínas L1 e L2. Para imunocitoquímica ultraestrutural, isto é, confirmação da expressão das proteínas L1 e L2, observação da localização intracelular dessas proteínas e formação de VLPs, foram observadas células HEK293T cotransfectadas. Também foram observadas as VLPs após serem extraídas das

células cotransfectadas. Os métodos utilizados para microscopia eletrônica já foram descritos em trabalhos anteriores (CIANCIARULLO et al., 2007, 2009, 2010; MARIGLIANI et al., 2012).

As células HEK293T não transfectadas foram cultivadas sob as mesmas condições descritas anteriormente até atingir 50 a 80% de confluência, quando foram então lavadas com PBS, tripsinizadas, coletadas em tubos tipo Falcon de 15 ml e centrifugadas a 200 x g por 5 min. O precipitado celular foi lavado três vezes com PBS para remoção de resíduos de meio de cultura e debris celulares. As células foram fixadas em solução contendo tampão fosfato de sódio a 0,1 M em pH 7,2 contendo 3,5% de sacarose e 2,5% de glutaraldeído, incubadas por 1 h a temperatura ambiente. Em seguida as células foram lavadas três vezes com solução tampão fosfato de sódio a 0,1 M em pH 7,2 contendo 3,5% de sacarose e centrifugadas a 200 x g por 5 min. As células foram pós-fixadas com 1% de tetróxido de ósmio no mesmo tampão fosfato de sódio, incubadas por 1 h a temperatura ambiente em local protegido da luz e com agitação ocasional. As células foram então lavadas com tampão fosfato contendo sacarose, lavadas duas vezes em solução salina a 0,85% e uma vez em água destilada, por 10 min em cada lavagem.

Para a contrastação dos ácidos nucleicos as células foram incubadas com acetato de uranila aquoso a 2% por 2 h a temperatura ambiente. A seguir foram lavadas três vezes com água bidestilada por 5 min cada e desidratadas em uma série de etanol em concentrações de 30%, 50%, 70%, 95% por 15 min cada, etanol 100% por 30 min, etanol-acetona (1:1) e acetona a 100%. A seguir, as células foram infiltradas com a resina hidrofóbica Epon (Kit Polybed, Poly Sciences Inc., Warrington, Pensilvânia, Estados Unidos) utilizando uma série de acetona-Epon nas proporções 2:1 e 1:1 por 30 min cada, solução acetona-Epon 1:2 por 18 h a 4 °C. Após a última incubação foi realizada a embebição em resina Epon pura por 24 h e centrifugação por 30 min a 1250 x g para substituição da resina Epon pura, mantendo por 4 h a temperatura ambiente. Em seguida as células foram colocadas em cápsulas de gelatina preenchidas com nova resina Epon pura e polimerizadas em estufa a 60 °C por 72 h. Os blocos foram cortados utilizando um ultramicrotomo e os cortes ultrafinos foram montados sobre grades metálicas de cobre de 300 mesh pré-revestidas com parlódio a 2% em acetato de amila e carbono, contrastados com acetato de uranila a 2% em solução aquosa.

Para a imunocitoquímica ultraestrutural em MET, as células HEK293T cotransfectadas foram lavadas com PBS, tripsinizadas e coletadas em tubo tipo Falcon de 15 ml,

centrifugadas a 200 x g por 5 min, lavadas três vezes em PBS para remoção de resíduos de meio de cultura e debris celulares e uma vez em tampão fosfato de sódio 0,1 M em pH 7,3. As células foram então fixadas em solução contendo tampão fosfato de sódio 0,1 M em pH 7,3 acrescidos de 3,5% de sacarose, 4% de paraformaldeído e 1% de glutaraldeído, incubadas por 2 h a temperatura ambiente. Em seguida as células foram lavadas duas vezes de 30 min cada com solução tampão fosfato de sódio 0,1 M em pH 7,3 acrescida de 3,5% de sacarose e lavadas duas vezes com PBS por 10 min. As células foram desidratadas utilizando uma série de etanol a 50%, 70%, 80% e 100% por 15 min cada. A pré-embebição foi feita em resina acrílica LR White (LR White resin, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, Pensilvânia, Estados Unidos) e álcool 70% na proporção de 2:1, a embebição foi feita em resina LR White a 100% por 1 h, a resina foi trocada por resina pura e incubada por 18 h a 4 °C. Em seguida as amostras foram emblocadas em cápsulas de gelatina preenchidas com nova resina e polimerizadas a 60 °C por 48 h. As centrifugações para troca de resina foram realizadas a 500 x g por 10min. Os blocos foram cortados utilizando um ultramicrotomo e os cortes ultrafinos foram montados sobre grades metálicas de níquel de 300 mesh pré-revestidas com parlódio a 2% em acetato de amila e carbono.

Para a imunomarcação os cortes ultrafinos foram incubados com os mesmos anticorpos primários anti-L1 e anti-L2 citados anteriormente, agora diluídos na proporção de 1:100 (anti-L1) e 1:50 (anti-L2) em PBS contendo 0,01% de Tween 20 e 0,5% de BSA por 3 h em câmara úmida a temperatura ambiente, em seguida foram lavados quatro vezes com PBS contendo 1% de BSA por 10 min cada. Os cortes foram incubados com os anticorpos secundários conjugados com partículas de ouro coloidal (Sigma-Aldrich®) de 10 nm para L1 e de 5 nm para L2, na proporção de 1:100, diluídos em PBS contendo 0,01% de Tween 20 e 1,5% de BA por 1 h em câmara úmida a temperatura ambiente. Os cortes foram lavados uma vez em PBS contendo BSA a 1%, três vezes em solução salina a 0,85% por 10 min cada e receberam um jato de água bidestilada.

Para a imunomarcação das VLPs extraídas (descrito no item 3.8), 10 µl da amostra foram depositados sobre grades de níquel de 300 mesh pré-revestidas com parlódio a 2% em acetato de amila e carbono por 10 min, em seguida o excesso foi absorvido cuidadosamente utilizando papel filtro. As amostras foram incubadas com os anticorpos primários anti-L1 e anti-L2 citados anteriormente, diluídos na proporção de 1:100 (anti-L1) e 1:50 (anti-L2) em PBS contendo 0,01% de Tween 20 e 0,5% de BSA por 2 h em câmara úmida

a temperatura ambiente, em seguida foram lavadas quatro vezes com PBS contendo 1% de BSA por 10 min cada. As amostras foram então incubadas com os anticorpos secundários conjugados com partículas de ouro coloidal (Sigma-Aldrich®) de 5 nm para L1 e de 10 nm para L2, na proporção de 1:100, diluídos em PBS contendo 0,01% de Tween 20 e 1,5% de BSA por 1 h em câmara úmida a temperatura ambiente. Após a incubação as amostras foram lavadas uma vez em PBS contendo BSA a 1% por 10 min, três vezes em solução salina a 0,85% por 10 min cada e receberam um jato de água bidestilada. Por fim, as amostras foram contrastadas com acetato de urania a 2% por 1 min, foram secas naturalmente e armazenadas até o momento da análise.

Todos os ensaios de MET foram realizados utilizando o microscópio MET Zeiss EM 109 operado a 80 kV. As imagens foram obtidas em filmes fotográficos PSD (IBF – Indústria Brasileira de Filmes, Rio de Janeiro, Brasil) revelados quimicamente (Figuras 19 a 22) ou utilizando sistema digital (Figuras 23 e 24). A revelação química foi feita em câmara escura sob luz de segurança vermelha. O filme fotografado foi retirado do recipiente metálico, enrolado em espiral, colocado em tanque de revelação, adicionado o revelador D-19 diluído na proporção 1:1 em água destilada e incubado por 2 min sob suave agitação. O negativo foi lavado em água corrente e em seguida foi adicionada a solução fixadora F-5, incubando por 15 min sob suave agitação. O filme foi removido da espiral e mergulhado em cuba com água corrente por 30 min. Após secagem a temperatura ambiente, os negativos foram cortados e armazenados em envelopes identificados para posterior digitalização utilizando scanner HP Scanjet G4050 e o software HP Photosmart Premier. O sistema digital utilizado na obtenção de algumas imagens de MET é composto por TEM CCD câmera Mega View III, Olympus Soft Imaging Solutions GMBH e software ITEM, todos da Olympus (Hamburg, Alemanha).

3.7 SDS-PAGE e Western blotting

Para a SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis* – eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio) as amostras (células não transfectadas, transfectadas e cotransfectadas, VLPs extraídas) tiveram suas proteínas separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% utilizando dodecil sulfato de sódio sob condições desnaturantes. As amostras foram diluídas em tampão SDS-PAGE (10:1), fervidas por 5 min e centrifugadas antes de serem depositadas nos poços do

gel. Os géis foram corados com *coomassie blue* ou tiveram as amostras eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose (Trans-Blot Transfer Membrane 0,45 µm, BioRad, Benicia, Califórnia, Estados Unidos) em cuba de transferência (Trans-Blot SD, Semi-DryTransferCell, BioRad) com tampão de transferência (glicina 250 mM, SDS 1% e metanol 20% em tampão Tris-HCL 25mM, pH 8,3) sob amperagem constante de 400 mA por 40 minutos.

A fim de confirmar a transferência das proteínas para a membrana e marcar o padrão de peso molecular foi utilizado o marcador molecular (BenchMark™ ProteinLader, Invitrogen™) e as membranas foram coradas com solução Ponceau (0,5% de Ponceau e 1% de ácido acético).

Para o Western blotting (WB) as membranas contendo as proteínas foram bloqueadas por 16 h a 4 °C utilizando PBS-T (PBS contendo Tween 20 a 0,05%) acrescido de 5% de leite desnatado, lavadas duas vezes com PBS contendo Tween 20 a 0,1% por 10 min cada, incubadas com os anticorpos primários anti-L1 e anti-L2 previamente citados por 1 h a temperatura ambiente, diluídos nas proporções de 1:500 (L1) e 1:100 (L2) em PBS-T contendo 5% de leite desnatado. Em seguida as membranas foram lavadas três vezes com PBS-T por 10 min cada sob agitação e incubadas por 1 h com os anticorpos secundários anti-mouse ou anti-rabbit IgG conjugados com peroxidase, diluídos na proporção de 1:500 em PBS-T contendo 5% de leite desnatado. As membranas foram novamente lavadas três vezes por 10 min cada e as proteínas L1 e L2 foram detectadas por quimioluminescência utilizando o kit Novex® ECL HRP Chemiluminescent Substrate Reagent Kit (Invitrogen™). As membranas foram expostas ao filme Amersham Hyperfilm™ ECL (GE Healthcare, Hatfield, Hertfordshire, Reino Unido), que foi revelado e fixado (Revelador e Fixador Dental Kodak). Após a fixação o filme foi lavado, seco e digitalizado utilizando o scanner HP Scanjet G4050 e o software HP Photosmart Premier.

Para os primeiros ensaios de SDS-PAGE e WB foram utilizadas células HEK293T não transfectadas, transfectadas e cotransfectadas coletadas 48 h após a transfecção. As culturas foram lavadas três vezes com PBS, tripsinizadas e centrifugadas a 200 x g por 10 min. As células precipitadas foram ressuspensas em PBS, lisadas mecanicamente utilizando 5 ciclos de agitação em vórtex e incubação em gelo por 1 min cada (lise mecânica). Ao lisado celular foi adicionado um coquetel inibidor de protease Sigma FAST™ Protease Inhibitor Tablets (Sigma-Aldrich®) na concentração indicada pelo fabricante, seguido de clarificação por

centrifugação a 500 x g por 10 min e armazenamento a -20 °C para posterior análise e purificação.

3.8 Coleta, maturação e extração das VLPs

As etapas de coleta, maturação e extração das VLPs seguiram os protocolos descritos para a produção de pseudovírus (BUCK; THOMPSON, 2007), com alguns ajustes. Para cada garrafa de cultura as células transfectadas (L1) ou cotransfectadas (L1 e L2) foram tripsinizadas 48 h após a transfecção, colocadas em tubo tipo Falcon de 15 ml e centrifugadas por 10 min a 200 x g a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em 0,5 ml de DPBS-Mg (100 ml de DPBS, 475 µl de 2M MgCl₂, 100 µl de ampicilina e 250 µl de anfotericina B, esterilizados por filtração), transferidas para microtubos siliconizados de 0,6 ml e centrifugadas por 10 min a 200 x g a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado, o volume ocupado pelo pellet foi estimado e foram adicionados DPBS-Mg em quantidade 1,5 x o volume do pellet (por exemplo, a um pellet de 80 µl foram adicionados 120 µl de DPBS-Mg) e o detergente Brij-58 a 10% dissolvido em DPBS para atingir uma concentração final de cerca de 0,35% de Brij-58 (por exemplo, adicionando 7 µl de Brij-58 a 10% a um volume de células em DPBS-Mg de 200 µl).

O lisado celular foi incubado por 24 h a 37 °C para permitir a maturação das VLPs (formação de pontes dissulfeto entre as moléculas de L1), tornando-as teoricamente mais estáveis e solúveis, permitindo a clarificação. Após a maturação o lisado foi incubado em gelo por 10 min e clarificado centrifugando por 10 min a 5.000 x g a 4 °C. O sobrenadante clarificado resultante contendo as VLPs extraídas foi armazenado a -20 °C em alíquotas de 50 µl por até dois dias para a realização das análises morfológicas ou a -80 °C para outros estudos.

4 RESULTADOS

4.1 Cinética da expressão proteica

O estudo cinético da expressão da proteína heteróloga L1 do HPV16 utilizando citometria de fluxo demonstrou que o momento onde mais células estão expressando esta proteína ocorre por volta de 12 h após a transfecção, quando aproximadamente 77% das células estão expressando a proteína L1, conforme os dados da Tabela 2.

Tabela 2 – Cinética da expressão da proteína L1 do HPV16 por citometria de fluxo

Tempo (horas)	Células expressando L1 (% de eventos)
0	0
3	61,6
12	77,3
24	67,9
36	66,9
48	37,6

O resultado da cinética da expressão da proteína L1 do HPV16 por citometria de fluxo pode ser confirmado por microscopia confocal a laser (MCL). Por este método observamos que 12 h após a transfecção também temos o maior número de células expressando a proteína L1, conforme a Figura 8.

Figura 8 - Cinética da expressão da proteína L1 por MCL, em células HEK293T transfectadas. Tempos: 0 (A), 3 h (B), 12 h (C), 24 h (D), 36 h (E) e 48 h (F) pós-transfecção. Proteína L1 em verde (AlexaFluor 488) e núcleo celular em vermelho (PI). Proteína L1 e núcleo (coluna 1), proteína L1 (coluna 2), núcleo (coluna 3), sobreposição das imagens de L1, núcleo e luz transmitida - DIC (coluna 4). Barras: 10μm. Aumento: objetiva C-apocromática 63x/1.4 óleo.

No momento 12 h após a transfecção, além do maior número de células expressando a proteína L1, também foi possível observar uma maior quantidade da proteína L1 sendo expressa por célula, conforme a Figura 9.

Figura 9 – MCL das células HEK293T 12 h após a transfecção. Proteína L1 em verde (AlexaFluor 488) e núcleo celular em vermelho (PI). Barra: 10 μ m. Aumento: objetiva C-apocromática 63x/1.4 óleo.

4.2 Análise da expressão das proteínas L1 e L2 por microscopia confocal a laser

Primeiramente, analisamos a conformação celular e nuclear das células HEK293T não transfectadas utilizando iodeto de propídio (PI), um marcador de ácidos nucleicos (Figura 10).

Figura 10 – MCL das células HEK293T não transfectadas. Núcleo em vermelho (PI) (A), canal de luz transmitida - DIC (B), sobreposição das imagens A e B (C). Barra: 10 μ m. Aumento: objetiva C-apocromática 63x/1.4 óleo.

Utilizando imunofluorescência indireta, anticorpos primários anti-L1 produzidos em camundongo e anticorpos secundários anti-IgG de camundongo conjugados com AlexaFluor 488, analisamos a expressão da proteína L1 por células HEK293T transfectadas com o vetor para expressão da proteína L1, após 48 h. Analisando diferentes planos e cortes, a proteína L1 se mostrou dispersa por toda a célula. Foi possível observar aglomerados de marcação que sugerem a formação de VLPs compostas pela proteína L1 (Figura 11).

Figura 11 – MCL das células HEK293T transfectadas com o plasmídeo para expressão da proteína L1. Proteína L1 em verde (AlexaFluor 488) (A), canal de luz transmitida - DIC (B), sobreposição das imagens A e B (C). Diâmetro celular: 17 μ m. Barra: 10 μ m. Aumento: objetiva C-apocromática 63x/1.4 óleo.

Utilizando imunofluorescência indireta, anticorpos primários anti-L2 produzidos em coelho e anticorpos secundários anti-IgG de coelho conjugados com AlexaFluor 633, observamos a expressão da proteína L2 por células HEK293T transfectadas com o vetor para expressão da proteína L2, após 48 h. A proteína L2 se mostrou dispersa por toda a célula, em sua maioria no citoplasma celular. Não foi possível observar a formação de VLPs pela proteína L2 (Figura 12).

Figura 12 – MCL das células HEK293T transfectadas com o plasmídeo para expressão da proteína L2. Proteína L2 em vermelho (AlexaFluor 633) (A), canal de luz transmitida - DIC (B), sobreposição das imagens A e B (C). Diâmetro celular: 11 μ m. Barra: 5 μ m. Aumento: objetiva C-apocromática 63x/1.4 óleo.

Para a análise da expressão das proteínas L1 e L2 por células HEK293T cotransfectadas com os vetores para expressão das proteínas L1 e L2, após 48 h (Figuras 13 e 14), utilizamos imunofluorescência indireta, anticorpos primários anti-L1 produzidos em camundongos, anti-L2 produzidos em coelho e anticorpos secundários anti-IgG de camundongo conjugados com AlexaFluor 488 e anti-IgG de coelho conjugados com AlexaFluor 633. Tanto em células isoladas (Figura 13) quanto em agrupamentos celulares (Figura 14) foi possível observar a expressão de ambas as proteínas, L1 e L2, além de regiões de acúmulo de proteínas, que sugerem a formação de VLPs de L1L2.

Figura 13 – MCL da célula HEK293T cotransfectada com os plasmídeos para expressão das proteínas L1 e L2. Proteína L1 em verde (AlexaFluor 488) e proteína L2 em vermelho (AlexaFluor 633) (A), proteína L1 em verde (B), proteína L2 em vermelho (C), sobreposição da imagem A e canal de luz transmitida - DIC (D). Barra: 5 µm. Aumento: objetiva C-apocromática 63x/1.4 óleo.

Figura 14 – MCL das células HEK293T cotransfectadas com os plasmídeos para expressão das proteínas L1 e L2. Proteína L1 em verde (AlexaFluor 488) e proteína L2 em vermelho (AlexaFluor 633) (A), proteína L1 em verde (B), proteína L2 em vermelho (C), canal de luz transmitida (D). Barra: 10 µm. Aumento: objetiva C-apocromática 63x/1.4 óleo.

Também utilizando imunofluorescência indireta, anticorpos primários anti-L1 produzidos em camundongos, anti-L2 produzidos em coelho, anticorpos secundários anti-IgG de camundongo conjugados com AlexaFluor 488 e anti-IgG de coelho conjugados com AlexaFluor 633 e o marcador de ácidos nucleicos (PI) observamos a expressão das proteínas L1 e L2 por células HEK293T cotransfectadas com os vetores para expressão das proteínas L1 e L2, após 12 h (Figura 15), 24 h (Figura 16) e 48 h (Figura 17). Foi possível observar a expressão de ambas as proteínas L1 e L2 tanto no núcleo quanto no citoplasma celular, sendo que a maior quantidade dessas proteínas foi observada 12 h após a transfecção. Também foram observadas regiões de acúmulo de proteínas L1 e L2, que sugerem a formação de VLPs contendo ambas as proteínas nos três momentos, porém a maior quantidade de VLPs foi observada 12 h após a transfecção.

Figura 15 – MCL das células HEK293T cotransfectadas após 12 h. Proteína L1 em verde (AlexaFluor 488), proteína L2 em azul (AlexaFluor 633), núcleo em vermelho (PI) (A). Proteína L1 em verde (B). Proteína L2 em azul (C). Núcleo em vermelho (D). Sobreposição das imagens B e C mostrando regiões que sugerem a formação de VLPs contendo as proteínas L1 e L2 (E). Barra: 10 µm. Aumento: objetiva C-apocromática 63x/1.4 óleo.

Figura 16 – MCL das células HEK293T cotransfectadas após 24 h. Proteína L1 em verde (AlexaFluor 488), proteína L2 em azul (AlexaFluor 633), núcleo em vermelho (PI) (A). Proteína L1 em verde (B). Proteína L2 em azul (C). Núcleo em vermelho (D). Canal de luz transmitida - DIC (E). Sobreposição das imagens A e E (F). Barra: 10 µm. Aumento: objetiva C-apocromática 63x/1.4 óleo.

Figura 17 – MCL das células HEK293T cotransfectadas após 48 h. Proteína L1 em verde (AlexaFluor 488), proteína L2 em azul (AlexaFluor 633), núcleo em vermelho (PI) (A). Proteína L1 em verde (B). Proteína L2 em azul (C). Núcleo em vermelho (D). Canal de luz transmitida - DIC (E). Sobreposição das imagens A e E (F). Barra: 10 µm. Aumento: objetiva C-apocromática 63x/1.4 óleo.

Utilizando imunofluorescência indireta, anticorpos primários anti-L1 produzidos em camundongos, anti-L2 produzidos em coelho, anticorpos secundários anti-IgG de camundongo conjugados com AlexaFluor 488 e anti-IgG de coelho conjugados com AlexaFluor 633 e o marcador de mitocôndrias, observamos a localização das mitocôndrias e das proteínas L1 e L2 expressas por células HEK293T cotransfectadas com os vetores para expressão das proteínas L1 e L2. Foi possível observar a expressão de ambas as proteínas L1 e L2 em regiões que sugerem a colocalização dessas proteínas com as mitocôndrias das células cotransfectadas (Figura 18).

Figura 18 – MCL das células HEK293T transfectadas e mitocôndrias. Células transfectadas com o vetor para expressão da proteína L1 (linha 1), L1 em verde (1B), mitocôndrias em vermelho (1C), sobreposição das imagens 1A e luz transmitida – DIC (1D). Células HEK293T transfectadas com o vetor para expressão da proteína L2 (linha 2), L2 em verde (2B), mitocôndrias em vermelho (2C), sobreposição das imagens 2A e luz transmitida – DIC (2D). Células HEK293T cotransfectadas (linha 3), L1 em verde (3B), L2 em vermelho (3C), sobreposição das imagens 3A e luz transmitida – DIC, mitocôndrias em azul (3D). Barras: 5 µm (linha 1), 10 µm (linhas 2 e 3). Aumento: objetiva C-apocromática 63x/1.4 óleo.

4.3 Célula HEK293T não transfectada por microscopia eletrônica de transmissão

A MET foi utilizada para a observação da morfologia normal da célula HEK293T não transfectada, utilizando protocolo convencional. As células da linhagem HEK293T possuem diâmetro aproximado de 10-18 μm . O corte celular apresentado possui aproximadamente 11 μm de diâmetro. No núcleo celular foi possível observar uma região mais eletrondensa de DNA genômico, a heterocromatina, o nucléolo com morfologia bem definida e uma região menos eletrondensa de DNA genômico, a eucromatina, onde o DNA está menos condensado e os genes podem ser transcritos. O citoplasma celular mostrou-se altamente organizado, contendo organelas em abundância, incluindo um grande número de mitocôndrias e ribossomos, além de todas as membranas adequadamente preservadas (Figura 19).

Figura 19 - Micrografia eletrônica de corte ultrafino de célula HEK293T não transfectada. Processamento convencional para MET, contrastação com acetato de uranila. Núcleo (N), nucléolo (nu), mitocôndria (m), retículo endoplasmático (re). Aumento original: 4.000x. Diâmetro celular: 11 μm . Barra: 1 μm .

4.4 Expressão e localização das proteínas L1 e L2 por MET

A MET também foi utilizada para imunocitoquímica ultraestrutural a fim de confirmar a expressão e verificar a localização das proteínas L1 e L2 do HPV16 em células HEK293T cotransfectadas com os vetores para expressão das proteínas L1 e L2 do HPV16. As proteínas L1 e L2 foram detectadas tanto no núcleo quanto no citoplasma das células cotransfectadas. Foi possível a observação de agregados de marcação para ambas as proteínas, o que sugere a formação de VLPs. Também foram observadas marcações tanto para L1 quanto para L2 nas mitocôndrias (Figura 20).

Figura 20 – MET em imunocitoquímica ultraestrutural das células HEK293T cotransfectadas. Imunomarcacão das proteínas L1 (10nm) e L2 (5nm) no núcleo (N) e no citoplasma formando agregados (setas). As mitocôndrias foram intensamente marcadas (m). Aumento original: 12.000x. Barras: 0,2 μ m (A) e 0,5 μ m (B).

Utilizando imunocitoquímica ultraestrutural também foi possível observar aglomerados de proteínas imunomarcadas dentro e fora do núcleo de células HEK293T cotransfectadas. A observação de marcação para ambas as proteínas na mesma região sugere que estejam sendo formadas VLPs contendo ambas as proteínas do capsídeo viral. Essas VLPs foram observadas no núcleo e citoplasma das células cotransfectadas, com diâmetros que variam de 40 a 80 nm (Figura 21).

Figura 21 - MET em imunocitoquímica ultraestrutural da célula HEK293T cotransfectada. Proteínas L1 (10nm) e L2 (5nm) em VLPs imunomarcadas (seta) no núcleo (N) e no citoplasma. Poro nuclear (pn). Aumento original: 20.000 x. Diâmetro da VLP (seta): 80 nm. Barra: 0,1 μ m.

4.5 Microscopia eletrônica de transmissão das VLPs extraídas

Utilizando imunomarcção em MET analisamos a composição e conformação das VLPs extraídas após a maturação. Foi possível observar aglomerados de marcação (Figura 22) das proteínas L1 (5 nm) e L2 (10 nm), partículas com tamanho heterogêneo que demonstram as VLPs em estágios distintos de formação (Figura 23) e outras com aproximadamente 50 nm de diâmetro (Figura 24). Em ambas as imagens (Figuras 23 e 24) obtidas por sistema digital, é possível visualizar os estágios iniciais de autoestruturação das proteínas em VLPs (setas).

Figura 22 - MET em imunomarcção de partículas extraídas de células HEK293T cotransfectadas. Cabeças de seta indicando as proteínas L1 (5nm) e setas indicando as proteínas L2 (10nm). Aumento original: 30.000 x.

Figura 23 - MET em imunomarcção das VLPs extraídas. Proteínas L1 (5 nm) e L2 (10 nm). Aumento original: 30.000 x.

Figura 24 – MET em imunomarcção das VLPs extraídas. Proteínas L1 (5 nm) e L2 (10 nm). VLP com 50 nm de diâmetro. Aumento original: 30.000 x.

4.6 SDS-PAGE e Western blotting

Nos primeiros ensaios de SDS-PAGE e WB utilizamos as células lisadas mecanicamente (sem maturação das VLPs). Foi possível confirmar a expressão da proteína L1, com cerca de 60 kDa, tanto no lisado de células HEK293T transfectadas com o vetor para expressão da proteína L1 quanto no lisado de células HEK293T cotransfectadas com os vetores para expressão das proteínas L1 e L2, porém esta proteína não foi detectada no lisado de células HEK293T não transfectadas (Figura 25-A). Utilizando anticorpos anti-L2 foi possível confirmar a expressão da proteína L2, com cerca de 100 kDa, em lisado de células HEK293T cotransfectadas com os vetores para

expressão das proteínas L1 e L2, mas não no lisado de células HEK293T não transfectadas (Figura 25-B).

Figura 25 - WB do lisado de células HEK293T. (A) WB do lisado de células HEK293T utilizando anti-L1. Células cotransfectadas (L1L2). Células transfectadas com o vetor para L1 (L1). Células não transfectadas (NT). Marcador de peso molecular (MM). Proteínas L1 com cerca de 60 kDa. (B) WB do lisado de células HEK293T utilizando anti-L2. Marcador de peso molecular (MM). Células não transfectadas (NT). Células cotransfectadas (L1L2). Proteínas L2 com cerca de 100 kDa (B).

Também utilizamos o WB para avaliar as amostras transfectadas e cotransfectadas após serem submetidas ao processo de maturação e extração descritos no item 3.8. Utilizando anticorpos anti-L1, na amostra de células transfectadas com o vetor para expressão da proteína L1, foi possível confirmar a presença da proteína L1, com cerca de 60 kDa. Na amostra de células cotransfectadas com os vetores para expressão das proteínas L1 e L2 observamos a presença de duas bandas da proteína L1, com cerca de 60 e 70 kDa (Figura 26-A). Utilizando anticorpos anti-L2 foi possível confirmar a presença da proteína L2, com cerca de 70 kDa, na amostra de células cotransfectadas com os vetores para expressão das proteínas L1 e L2, porém, outras bandas também foram evidenciadas (Figura 26-B).

Figura 26 - WB após extração. (A) WB utilizando anti-L1. Marcador de peso molecular (MM). Células transfectadas com o vetor para L1 (L1). Células cotransfectadas (L1L2). Proteínas L1 com cerca de 60 e 70 kDa. (B) WB utilizando anti-L2. Células cotransfectadas (L1L2). Marcador de peso molecular (MM). Proteínas L2 com cerca de 70 kDa e outras bandas.

5 DISCUSSÃO

Os vetores pUF3L1h e pUF3L2h utilizados nesta pesquisa para expressão heteróloga dos genes L1 e L2 do capsídeo viral do HPV16 foram construídos sob regulação do promotor do citomegalovírus (pCMV) e são humanizados, isto é, tiveram suas sequências nucleotídicas alteradas para conter códons mais frequentes em humanos, o que permite maior expressão heteróloga dessas proteínas em linhagens de células humanas. A alteração na sequência gênica foi realizada de forma a não modificar os aminoácidos codificados e, portando, não altera a proteína traduzida (LEDER et al., 2001; MOSSADEGH et al., 2004).

Para a expressão heteróloga das proteínas L1 e L2, a linhagem celular humana HEK293T foi escolhida por ser de fácil cultivo e transfecção, além de ser capaz de realizar a maioria das modificações e processamentos pós-traducionais necessários para a produção de proteínas funcionais. A linhagem HEK293 foi originalmente transformada pelo adenovírus, dela foi derivada a HEK293T, que carrega em seu DNA uma cópia integrada do genoma do SV40 (*Simian vacuolating virus 40*) para expressão do antígeno *large T*, uma proteína envolvida na replicação do genoma viral. Por isso as HEK293T são capazes de replicar em altos níveis os plasmídeos que contêm a origem de replicação do SV40, o que facilita a produção de pseudovírus e proteínas recombinantes. Esta alta capacidade de replicação dos plasmídeos é melhor alcançada quando o gene de interesse está sob controle do promotor EF1 α , mas também ocorre com o pCMV, presente nos vetores utilizados nesta pesquisa. As HEK293 e suas derivadas são utilizadas atualmente na biotecnologia industrial para a produção de proteínas terapêuticas e vírus para terapia gênica (BALDI et al., 2007; VAN CRAENENBROECK; VANHOENACKER; HAEGEMAN, 2000).

O objetivo geral deste estudo foi produzir e caracterizar VLPs de L1L2 visando contribuir com o desenvolvimento de uma vacina profilática com maior espectro de proteção, visto que os anticorpos gerados contra a proteína L2 de um tipo de HPV são capazes de neutralizar outros tipos, na chamada neutralização cruzada. A fim de atingirmos este objetivo, primeiramente investigamos a expressão heteróloga, a localização intracelular das proteínas L1 e L2 do HPV16 e a formação de VLPs em células transfectadas e cotransfectadas com seus respectivos vetores plasmídeos.

Utilizando imunofluorescência em microscopia confocal a laser para avaliar a expressão heteróloga das proteínas em células HEK293T, foi possível confirmar a expressão

da L1 nas células transfectadas com o vetor pUF3L1h (Figura 11), da L2 nas células transfectadas com o vetor pUF3L2h (Figura 12) e de ambas as proteínas nas células cotransfectadas com os dois vetores (Figuras 13 e 14). Tanto a L1 quanto a L2 foram observadas no núcleo e no citoplasma das células transfectadas com os respectivos vetores, sendo que a maioria das proteínas foi observada no citoplasma celular. A observação de aglomerados de marcações nas células transfectadas com pUF3L1h (Figura 11) e nas células cotransfectadas (Figuras 13 e 14) sugere a formação intracelular de VLPs de L1 e de L1L2, respectivamente. Estes achados estão de acordo com estudos anteriores que atestam a capacidade de células de mamífero produzirem VLPs de L1 e de L1L2 quando transfectadas com os respectivos vetores. Conforme esperado, os aglomerados indicativos da formação de VLPs não foram observados nas células transfectadas somente com pUF3L2h (Figura 12), visto que a L2 não é capaz de formar VLPs na ausência da L1 (WANG; RODEN, 2013).

Utilizando a imunocitoquímica ultraestrutural em MET foi possível confirmar a expressão das proteínas L1 e L2 em células HEK293T cotransfectadas (Figura 20). Observamos a imunomarcagem dessas proteínas dispersas no núcleo e no citoplasma celular e também formando agregados que sugerem a formação de VLPs contendo ambas as proteínas. Foi possível observar VLPs imunomarcadas (Figura 21) contendo as proteínas L1 e L2, tanto no núcleo quanto no citoplasma, o que confirma os resultados obtidos por MCL. O aumento do volume das VLPs intracelulares (Figura 21) pode ter sido causado pelo extenso protocolo para processamento celular para MET e pelo uso de resinas. Além disso, devemos atentar para o fato dessas amostras estarem sendo analisadas em cortes ultrafinos, obtidos em diferentes planos de corte, e não isoladas ou purificadas, o que pode justificar os diferentes diâmetros observados nas VLPs intracelulares.

Curiosamente, ao analisar a MET das células cotransfectadas, foi possível observar a presença de ambas as proteínas, L1 e L2, imunomarcadas nas mitocôndrias (Figura 20). As análises utilizando marcador mitocondrial em MCL (Figura 18) sugerem a colocalização dessas proteínas com as mitocôndrias nas células transfectadas somente com um dos vetores L1 ou L2 e também nas células cotransfectadas. A colocalização destas proteínas com as mitocôndrias não foi descrita até o momento na literatura. Sendo assim, essa colocalização e suas implicações na infecção por HPV e na oncogênese deverão ser melhor investigadas em estudos futuros.

As análises por Western blotting também confirmaram a expressão da proteína L1 pelas células transfectadas com o vetor pUF3L1h e das proteínas L1 e L2 pelas células cotransfectadas com ambos os vetores. A mobilidade eletroforética da proteína L1 expressa (Figura 25-A) está de acordo com estudos anteriores, isso é, aproximadamente 60 kDa (CIANCIARULLO et al., 2010; ZHAO et al., 2005). Porém, a L2 mostrou mobilidade eletroforética de cerca de 100 kDa (Figura 25-B), diferente de estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa, que demonstraram a L2 com cerca de 72 kDa, expressa também em HEK293T (CIANCIARULLO et al., 2010). Outros grupos de estudo afirmam que a L2 heteróloga é uma proteína que migra com massa molecular de aproximadamente 72 kDa (HAGENSEE; YAEHASHI; GALLOWAY, 1993), 76 kDa (KOMLY et al., 1986) ou 78 kDa (DOORBAR; GALLIMORE, 1987), enquanto que a proteína L2 nativa migra a 80 kDa. Porém, há relatos desta proteína migrando a 100 kDa na presença de diferentes formas de SUMO (*small ubiquitin-related modifier*), proteínas semelhantes a ubiquitinas que causam modificações pós-traducionais. Em humanos as modificações SUMO exercem diferentes efeitos, alterando a localização celular da proteína alvo, sua atividade, estabilidade e habilidade de interagir com outras proteínas (MARUSIC et al., 2010). Para verificar a presença de proteínas SUMO em células HEK293T, será necessário utilizar um marcador específico para esta proteína. Também é possível que as proteínas L2 do lisado das HEK293T tenham 100 kDa devido à sua associação com a L1 ou então com a GFP, proteína com aproximadamente 27 kDa cujo gene está inserido no vetor utilizado. Serão necessários experimentos adicionais para investigar essas diferenças encontradas e suas possíveis consequências.

A fim de estabelecer o melhor momento pós-transfecção para coleta das células e extração das proteínas, optamos por realizar uma cinética da expressão da proteína L1 do HPV16, visto que diferentes artigos relatam a coleta de diferentes linhagens celulares para a produção de pseudovírus, purificação e outros estudos das proteínas heterólogas L1 e/ou L2 em diferentes momentos após a transfecção, como 44 h (BUCK et al., 2005a), 48 h (BUCK et al., 2005b; BUCK; THOMPSON, 2007) e 72 h (KIRNBAUER et al., 1992; SCHELLENBACHER; RODEN; KIRNBAUER, 2009). Utilizando a citometria de fluxo como método quantitativo, observamos que 12 h após a transfecção, cerca de 77% das células estavam expressando a proteína L1 (Tabela 2). Utilizando a MCL observamos que também no momento 12 h após a

transfecção (Figura 8) ocorre a máxima expressão de L1 intracelular, no maior número de células da amostra, e essas proteínas parecem estar formando VLPs (Figura 9).

Segundo esses resultados, para obter a maior quantidade possível da proteína L1, as células HEK293T devem ser coletadas 12 h após a transfecção para extração da L1. Porém, para obter capsômeros, VLPs de L1 ou de L1L2, é necessário avaliar em qual momento pós-transfecção é possível obter a maior quantidade dessas partículas na conformação ideal. No caso das VLPs de L1L2, alguns artigos sugerem coletar as células 48 h após a transfecção, pois neste momento as VLPs de L1L2 estariam na conformação adequada. Os produtores de pseudovírus, capsídeos formados pelas proteínas L1L2 que carregam plasmídeos, afirmam que as partículas formadas por L1L2 necessitam de incubação a 37 °C por 24 h após a lise celular, para que ocorra um processo de maturação, gerando um capsídeo mais estável, o que também facilitaria a purificação (BUCK et al., 2005b; BUCK; THOMPSON, 2007).

Para estabelecermos o momento pós-transfecção ideal para a coleta das células para extração das VLPs de L1L2, utilizamos também a MCL para avaliar a cinética de expressão nas células cotransfectadas. Os agregados de marcação de ambas as proteínas sugerem a formação de VLPs de L1L2 em todos os momentos pós-transfecção analisados (Figuras 15, 16 e 17), porém, no momento 12 h após a transfecção (Figura 15) foi possível observar mais proteínas L1 e L2, além de mais regiões de agregados proteicos. Sugere-se então, que o melhor momento para extração das VLPs de L1L2 é 12 h após a transfecção, porém ainda deve-se avaliar se neste momento as VLPs estão na conformação ideal, se são estáveis e se é necessária alguma etapa de maturação das VLPs.

Outro ponto importante para o estudo das VLPs de L1L2 é selecionar um método de extração e purificação das partículas. Como os vetores utilizados nesta pesquisa não previam uma estratégia de purificação das proteínas e ensaios anteriores do grupo utilizando colunas cromatográficas demonstraram baixo rendimento, optamos por adaptar um protocolo simples e bem estabelecido, utilizado na produção de pseudovírus compostos por L1 e L2 do HPV (BUCK; THOMPSON, 2007). Esse método consiste em lise celular 48 h após a transfecção utilizando detergente não iônico, maturação por 24 h e clarificação por centrifugação. Ao analisar as amostras extraídas por este método, observamos que as proteínas L1 e L2 estavam presentes em grande quantidade (Figura 22). Na amostra analisada foram observadas algumas VLPs de tamanho heterogêneo, em diferentes estágios de autoestruturação (Figura 23), incluindo VLPs com o tamanho e conformação ideais, isto é,

cerca de 50 nm de diâmetro (Figura 24), o que pode ser justificado pelos fatores descritos a seguir.

Apesar dos nossos estudos demonstrarem que a maior quantidade de proteínas L1 e L2 é observada 12 h após a transfecção, para a extração das VLPs seguimos o protocolo de produção de pseudovírus, que usa uma outra linhagem, a 293TT, e coleta as células 48 h após a transfecção. Como as linhagens celulares são diferentes, é possível que nas células HEK293T as VLPs tenham sido formadas durante as 12 h após a transfecção e tenham sido posteriormente degradadas, visto que foram coletadas 48 h após a transfecção. O tempo de maturação das VLPs também pode ser diferente para as duas linhagens, então será necessário avaliar a conformação e estabilidade das VLPs após diferentes tempos de maturação após a lise das HEK293T. Outra hipótese é que tenha ocorrido uma degradação das VLPs pelas proteases celulares após a lise, visto que o protocolo utilizado não prevê a utilização de inibidores de proteases. Deve-se ainda considerar que não foram realizadas etapas de desestruturação e reestruturação das VLPs, o que justifica a presença de VLPs heterogêneas. Sendo assim, serão necessários ajustes no protocolo de extração a fim de garantir a obtenção de VLPs estáveis, na conformação ideal e em quantidade suficiente para os próximos estudos.

Os ensaios de WB das proteínas extraídas após a lise e maturação (Figura 26 A e B) mostram que tanto a proteína L1 quanto a proteína L2 estão presentes nas amostras de células cotransfectadas. A proteína L1 apresenta a mesma mobilidade eletroforética da L1 proveniente da amostra que não sofreu maturação, isto é, cerca de 60 kDa (Figura 26-A). Como a proteína L2 da amostra que sofreu maturação (Figura 26-B) apresentou diversas bandas e a amostra que não sofreu maturação apresentou a proteína L2 com mobilidade eletroforética diferente dos resultados obtidos anteriormente pelo grupo e já discutidos anteriormente, serão necessários novos ensaios de WB, de preferência utilizando um anticorpo monoclonal anti-L2, para confirmar o peso molecular dessas proteínas tanto no lisado quanto nas amostras submetidas a maturação.

Em resumo, quanto à caracterização das partículas semelhantes ao vírus HPV16 produzidas em células HEK293T cotransfectadas, temos que estas VLPs são compostas por ambas as proteínas do capsídeo viral do HPV16, sendo que a L1 apresenta mobilidade eletroforética de cerca de 60 kDa, enquanto que a L2 tem aparentemente cerca de 100 kDa. As VLPs de L1L2 intracelulares apresentam conformação heterogênea e diâmetros que

variam de 40 a 80 nm e podem ser encontradas em maior quantidade 12 horas após a transfecção, tanto no núcleo quanto no citoplasma celular. As VLPs de L1L2 extraídas após a lise celular e maturação estavam em diferentes estágios de autoestruturação, incluindo VLPs com tamanho e conformação ideais.

Visando o desenvolvimento de uma vacina de amplo espectro de proteção contra o HPV16, as VLPs de L1L2 poderão ser testadas em animais, a fim de avaliar a capacidade destas partículas induzirem a proteção cruzada. Porém, alguns detalhes deverão ser levados em consideração para a utilização direta dessas partículas como antígeno vacinal.

Em relação à segurança das VLPs de L1L2, é necessário certificar-se que essas VLPs não contêm material genético, seja o próprio vetor utilizado para a expressão heteróloga ou fragmentos de DNA da célula utilizada para a produção das VLPs, que podem inclusive conter sequências oncogênicas das linhagens transformadas. Este risco existe porque, ao contrário das VLPs formadas somente pela proteína L1, as VLPs de L1L2 são capazes de encapsidar praticamente qualquer DNA heterólogo não viral menor do que 8 kb (BUCK et al., 2005b; BUCK; THOMPSON, 2007).

Estudos anteriores demonstraram que, apesar da L2 recombinante e de peptídeos derivados de L2 serem capazes de gerar anticorpos neutralizantes em modelos animais, quando a L2 está formando VLPs juntamente com a L1 ou na forma de vírus nativos, ela é pouco imunogênica, incapaz de gerar anticorpos neutralizantes anti-L2 detectáveis. Algumas teorias propostas para este resultado indicam que a L2 não fica exposta na superfície do capsídeo do HPV até que o vírion se ligue à célula hospedeira para infectá-la. Na infecção viral os pentâmeros de L1 sofrem uma mudança conformacional que permite a exposição e clivagem da L2. Sendo assim, os epítomos relevantes da L2 não estariam expostos para a indução da geração de anticorpos anti-L2 até este momento. Diz-se que a L1 é imunodominante em relação à L2 quando estas estão formando VLPs ou vírus nativos, visto que além da L2 não estar exposta na superfície do vírus, está presente em quantidade cinco vezes menor do que a L1 é menos facilmente detectada pelo sistema imune em comparação com a estrutura altamente repetitiva da L1 no capsídeo viral (DAY et al., 2008; GERSCH; GISSMANN; GARCEA, 2012; KARANAM et al., 2009; KIRNBAUER et al., 1996; PALMER et al., 2009; RODEN et al., 2000; TUMBAN et al., 2011; WANG; RODEN, 2013).

Salvo estas considerações, as vacinas derivadas da L2 são bastante promissoras no desenvolvimento de uma segunda geração de vacinas, que poderão promover um espectro

de proteção mais amplo contra o câncer de colo do útero e outras doenças causadas por HPVs (PALMER et al., 2009).

Além da possibilidade de utilização das VLPs de L1L2 em testes pré-clínicos, essas VLPs são importantes ferramentas que poderão contribuir com a pesquisa básica do HPV e auxiliar no desenvolvimento de vacinas. As VLPs de L1L2 podem ser utilizadas diretamente em estudos da morfologia do capsídeo do HPV, já que o vírion nativo é de difícil produção *in vitro*. Outra possibilidade é a produção de pseudovírus de L1L2, que poderão ser utilizados em estudos de infecção por HPV, como por exemplo nos estudos da interação do vírus com células hospedeiras, como aqueles já realizados por nosso grupo de pesquisa (KAVATI et al., 2012; PALUMBO et al., 2009; SZULCZEWSKI, 2009; SZULCZEWSKI et al., 2009). Os pseudovírus também são úteis na transferência de plasmídeos para amplificação de vetores de expressão em alta escala, para a superexpressão de genes de interesse em células em cultura, para estratégias de *gene delivery* (entrega gênica) *in vivo*, como aquela utilizada no desenvolvimento de modelo murino de infecção cervicovaginal pelo HPV16 (BUCK; THOMPSON, 2007; ROBERTS et al., 2007), entre outras aplicações.

Para a geração de VLPs e/ou pseudovírus para estudos de interação celular, de comparação da morfologia ou ensaios pré-clínicos, sugere-se que o protocolo de extração das partículas descrito neste trabalho seja ajustado, a fim de garantir que essas proteínas sejam estáveis e estejam na conformação adequada. Também é indicado estabelecer um método de purificação, utilizando, por exemplo, a ultracentrifugação em gradiente de densidade de sacarose, cloreto de cério ou iodixanol (OptiPrep™) para produção em escala laboratorial ou então processos escalonáveis como a filtração tangencial ou cromatografia (VICENTE et al., 2011). O processo de purificação das VLPs da vacina comercial Gardasil®, por exemplo, inclui entre outras etapas, filtração tangencial, cromatografia e ultrafiltração. Outro ponto importante a ser considerado é a desestruturação e reestruturação das partículas após a purificação, etapas utilizadas na produção da Gardasil® para obtenção de VLPs mais homogêneas, com epítomos neutralizantes, a estrutura e estabilidade melhoradas. Sem esta etapa há uma heterogeneidade das VLPs purificadas, polimorfismos no arranjo das VLPs, agregados proteicos e capsídeos incompletos, comuns nas VLPs sem material genético (ZHAO et al., 2012).

6 CONCLUSÃO

Neste estudo foi possível estabelecer um sistema eficaz de produção das proteínas L1 e L2 do HPV16, que permitiu analisar a expressão e a localização intracelular dessas proteínas, verificar a formação das VLPs de L1L2, extrair VLPs e analisar sua estrutura e conformação. As células HEK293T cotransfectadas são capazes de expressar as proteínas L1 e L2 que se autoestruturam em VLPs de L1L2, isto é, contendo ambas as proteínas do capsídeo viral do HPV16. Essas VLPs de L1L2, após alguns ajustes nos protocolos empregados, poderão ser utilizadas em testes pré-clínicos, contribuir com a pesquisa básica do HPV e auxiliar no desenvolvimento de uma vacina profilática de amplo espectro de proteção contra os diversos tipos deste vírus de grande importância para a saúde pública.

REFERÊNCIAS*

- AIRES, K. A.; CIANCIARULLO, A. M.; CARNEIRO, S. M.; VILLA, L. L.; BOCCARDO, E.; PÉREZ-MARTINEZ, G.; PEREZ-ARELLANO, I.; OLIVEIRA, M. L. S.; HO, P. L. Production of human papillomavirus type 16 L1 virus-like particles by recombinant *Lactobacillus casei* cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 1, p. 745–752, 2006.
- ALPHS, H. H.; GAMBHIRA, R.; KARANAM, B.; ROBERTS, J. N.; JAGU, S.; SCHILLER, J. T.; ZENG, W.; JACKSON, D. C.; RODEN, R. B. Protection against heterologous human papillomavirus challenge by a synthetic lipopeptide vaccine containing a broadly cross-neutralizing epitope of L2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 15, p. 5850–5855, 2008.
- ARMBRUSTER-MORAES, E.; IOSHIMOTO, L. M.; LEÃO, E.; ZUGAIB, M. Presence of human papillomavirus DNA in amniotic fluids of pregnant women with cervical lesions. **Gynecologic Oncology**, v. 54, n. 2, p. 152–158, 1994.
- BALDI, L.; HACKER, D.; ADAM, M.; WURM, F. M. Recombinant protein production by large-scale transient gene expression in mammalian cells: state of the art and future perspectives. **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 5, p. 677–684, 2007.
- BASEMAN, J. G.; KOUTSKY, L. A. The epidemiology of human papillomavirus infections. **Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 32, p. S16–S24, 2005. Suppl. 1.
- BAZAN, S. B.; de ALENCAR, A. M. C.; AIRES, K. A.; CIANCIARULLO, A. M.; GARCEA, R. L.; HO, P. L. Expression and characterization of HPV-16 L1 capsid protein in *Pichia pastoris*. **Archives of Virology**, v. 154, n. 10, p. 1609–1617, 2009.
- BERNARD, H. U.; BURK, R. D.; CHEN, Z.; van DOORSLAER, K.; zur HAUSEN, H.; de VILLIERS, E. M. Classification of Papillomaviruses (PVs) Based on 189 PV Types and Proposal of Taxonomic Amendments. **Virology**, v. 401, n. 1, p. 70–79, 2010.
- BERRINGTON de GONZÁLEZ, A.; SWEETLAND, S.; GREEN, J. Comparison of risk factors for squamous cell and adenocarcinomas of the cervix: a meta-analysis. **British Journal of Cancer**, v. 90, n. 9, p. 1787–1791, 2004.
- BEST, S. R.; NIPARKO, K. J.; PAI, S. I. Biology of human papillomavirus infection and immune therapy for HPV-related head and neck cancers. **Otolaryngologic Clinics of North America**, v. 45, n. 4, p. 807–822, 2012.

* De acordo com:

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

BODILY, J.; LAIMINS, L. A. Persistence of human papillomavirus infection: keys to malignant progression. **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 33–39, 2011.

BROTHERTON, J. M.; DEEKS, S. L.; CAMPBELL-LLOYD, S.; MIRSRACHI, A.; PASSARIS, I.; PETERSON, K.; PITCHER, H.; SCULLY, M.; WATSON, M.; WEBBY, R. Interim estimates of human papillomavirus vaccination coverage in the school-based program in Australia. **Communicable Diseases Intelligence**, v. 32, n. 4, p. 457–461, 2008.

BUCK, C. B.; PASTRANA, D. V.; LOWY, D. R. SCHILLER, J. T. Generation of HPV pseudovirions using transfection and their use in neutralization assays. **Methods in Molecular Medicine**, v. 119, p. 445–462, 2005a.

BUCK, C. B.; THOMPSON, C. D.; PANG, Y. Y.; LOWY, D. R.; SCHILLER, J. T. Maturation of papillomavirus capsids. **Journal of Virology**, v. 79, n. 5, p. 2839–2846, 2005b.

BUCK, C. B.; CHENG, N.; THOMPSON, C. D.; LOWY, D. R.; STEVEN, A. C.; SCHILLER, J. T.; TRUS, B. L. Arrangement of L2 within the papillomavirus capsid. **Journal of Virology**, v. 82, n. 11, p. 5190–5197, 2008.

BUCK, C. B.; THOMPSON, C. D. Production of papillomavirus-based gene transfer vectors. **Current protocols in cell biology**. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc., 2007. Chapter 26, unit 26.1.

BUCK, C. B.; TRUS, B. L. The papillomavirus virion: a machine built to hide molecular Achilles' heels. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 726, p. 403–422, 2012.

BURCHELL, A. N.; WINER, R. L.; de SANJOSÉ, S.; FRANCO, E. L. Chapter 6: Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. **Vaccine**, v. 24, p. S3/52–S3/61, 2006. Suppl. 3.

CHANDRACHUD, L. M.; GRINDLAY, G. J.; MCGARVIE, G. M.; O'NEIL, B. M.; WAGNER, E. R.; JARRETO, W. F.; CAMPO, M. S. Vaccination of cattle with the N-terminus of L2 is necessary and sufficient for preventing infection by bovine papillomavirus-4. **Virology**, v. 211, n. 1, p. 204–208, 1995.

CHEN, X. S.; GARCEA, R. L.; GOLDBERG, I.; CASINI, G.; HARRISON, S. C. Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. **Molecular Cell**, v. 5, n. 3, p. 557–567, 2000.

CHRISTENSEN, N. D.; CLADEL, N. M.; REED, C. A.; BUDGEON, L. R.; EMBERS, M. E.; SKULSKY, D. M.; McCLEMENTS, W. L.; LUDMERER, S. W.; JANSEN, K. U. Hybrid papillomavirus L1 molecules assemble into virus-like particles that reconstitute conformational epitopes and induce neutralizing antibodies to distinct HPV types. **Virology**, v. 291, n. 2, p. 324–334, 2001.

CIANCIARULLO, A. M.; SZULCZEWSKI, V.; AIRES, K. A.; BAZAN, S. B.; HO, P. L.; BOCCARDO, E.; VILLA, L. L.; MÜLLER, M.; ARMBRUSTER-MORAES, E. Production of HPV 16 L1 VLP in human

cell culture for basic studies in anogenital cancer. **Applied Cancer Research**, v. 27, n. 2, p. PT098, 2007.

CIANCIARULLO, A. M.; SZULCZEWSKI, V.; CHAVES, A. A. M.; HO, P. L.; MÜLLER, M.; ARMBRUSTER-MORAES, E. HPV16 L1L2 gene expression, protein synthesis and interaction in human cell culture. **Acta Microscopica**, v. 18, p. 661–662, 2009. Suppl. C.

CIANCIARULLO, A. M.; SZULCZEWSKI, V.; CHAVES, A. A. M.; BAZAN, S. B.; AIRES, K. A.; MÜLLER, M.; ARMBRUSTER-MORAES, E. Production of HPV16 L1L2 VLPs in cultures of human epithelial cells. In: MÉNDEZ-VILAS, A.; DÍAZ, J. (Ed.). **Microscopy: science, technology, application and education**. Badajóz, Spain: Formatex Research Center, 2010. v. 2. p. 1073–1082.

COMBELAS, N.; SAUSSEREAU, E.; FLEURY, M. J.; RIBEIRO, T.; GAITAN, J.; DUARTE-FORERO, D. F.; COURSAGET, P.; TOUZÉ, A. Papillomavirus pseudovirions packaged with the L2 gene induce cross-neutralizing antibodies. **Journal of Translational Medicine**, v. 8, p. 28, 2010.

DAY, P. M.; GAMBHIRA, R.; RODEN, R. B.; LOWY, D. R.; SCHILLER, J. T. Mechanisms of human papillomavirus type 16 neutralization by L2 cross-neutralizing and L1 type-specific antibodies. **Journal of Virology**, v. 82, n. 9, p. 4638–4646, 2008.

De VUYST, H.; CLIFFORD, G. M.; NASCIMENTO, M. C.; MADELEINE, M. M.; FRANCESCHI, S. Prevalence and type distribution of human papillomavirus in carcinoma and intraepithelial neoplasia of the vulva, vagina and anus: a meta-analysis. **International Journal of Cancer**, v. 124, n. 7, p. 1626–1636, 2009.

DILLNER, J. The serological response to papillomaviruses. **Seminars in Cancer Biology**, v. 9, n. 6, p. 423–430, 1999.

DONOVAN, B.; FRANKLIN, N.; GUY, R.; GRULICH, A. E.; REGAN, D. G.; ALI, H.; WAND, H.; FAIRLEY, C. K. Quadrivalent human papillomavirus vaccination and trends in genital warts in Australia: analysis of national sentinel surveillance data. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, n. 1, p. 39–44, 2011.

DOORBAR, J. The papillomavirus life cycle. **Journal of Clinical Virology: the Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 32, p. S7–S15, 2005. Suppl. 1.

DOORBAR, J.; GALLIMORE, P. H. Identification of proteins encoded by the L1 and L2 open reading frames of human papillomavirus 1a. **Journal of Virology**, v. 61, n. 9, p. 2793–2799, 1987.

DUENSING, S.; MÜNGER, K. Mechanisms of genomic instability in human cancer: insights from studies with human papillomavirus oncoproteins. **International Journal of Cancer**, v. 109, n. 2, p. 157–162, 2004.

EMBERS, M. E.; BUDGEON, L. R.; PICKEL, M.; CHRISTENSEN, N. D. Protective Immunity to Rabbit Oral and Cutaneous Papillomaviruses by Immunization with Short Peptides of L2, the Minor Capsid Protein. **Journal of Virology**, v. 76, n. 19, p. 9798–9805, 2002.

EVANDER, M.; FRAZER, I. H.; PAYNE, E.; QI, Y. M.; HENGST, K.; McMILLAN, N. A. Identification of the $\alpha 6$ integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. **Journal of Virology**, v. 71, n. 3, p. 2449–2456, 1997.

FERNANDES, M. O. Câncer de colo de útero: a vacina para prevenção do HPV e o desafio para a melhoria da qualidade do rastreamento no Brasil. **BRATS - Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologias em Saúde**, v. 6, n. 17, 2011. ISSN: 1983-7003.

GAMBHIRA, R.; KARANAM, B.; JAGU, S.; ROBERTS, J. N.; BUCK, C. B.; BOSSIS, I.; ALPHS, H.; CULP, T.; CHRISTENSEN, N. D.; RODEN, R. B. A protective and broadly cross-neutralizing epitope of human papillomavirus L2. **Journal of Virology**, v. 81, n. 24, p. 13927–13931, 2007a.

GAMBHIRA, R.; JAGU, S.; KARANAM, B.; GRAVITT, P. E.; CULP, T. D.; CHRISTENSEN, N. D.; RODEN, R. B. Protection of rabbits against challenge with rabbit papillomaviruses by immunization with the N terminus of human papillomavirus type 16 minor capsid antigen L2. **Journal of Virology**, v. 81, n. 21, p. 11585–11592, 2007b.

GARLAND, S. M.; HERNANDEZ-AVILA, M.; WHEELER, C. M.; PEREZ, G.; HARPER, D. M.; LEODOLTER, S.; TANG, G. W.; FERRIS, D. G.; STEBEN, M.; BRYAN, J.; TADDEO, F. J.; RAILKAR, R.; ESSER, M. T.; SINGS, H. L.; NELSON, M.; BOSLEGO, J.; SATTER, C.; BARR, E.; KOUTSKY, L. A.; FEMALES UNITED TO UNILATERALLY REDUCE ENDO/ECTOCERVICAL DISEASE (FUTURE) I INVESTIGATORS. Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent anogenital diseases. **The New England Journal of Medicine**, v. 356, n. 19, p. 1928–1943, 2007.

GARLAND, S. M.; SMITH, J. S. Human papillomavirus vaccines: current status and future prospects. **Drugs**, v. 70, n. 9, p. 1079–1098, 2010.

GERSCH, E. D.; GISSMANN, L.; GARCEA, R. L. New approaches to prophylactic human papillomavirus vaccines for cervical cancer prevention. **Antiviral Therapy**, v. 17, n. 3, p. 425–434, 2012.

GHITTONI, R.; ACCARDI, R.; HASAN, U.; GHEIT, T.; SYLLA, B.; TOMMASINO, M. The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. **Virus Genes**, v. 40, n. 1, p. 1–13, 2010.

GREER, C. E.; WHEELER, C. M.; LADNER, M. B.; BEUTNER, K.; COYNE, M. Y.; LIANG, H.; LANDGENBERG, A.; YEN, T. S.; RALSTON, R. Human papillomavirus (HPV) type distribution and serological response to HPV type 6 virus-like particles in patients with genital warts. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 8, p. 2058–2063, 1995.

HAGENSEE, M. E.; YATEGASHI, N.; GALLOWAY, D. A. Self-assembly of human papillomavirus type 1 capsids by expression of the L1 protein alone or by coexpression of the L1 and L2 capsid proteins. **Journal of Virology**, v. 67, n. 1, p. 315–322, 1993.

HARPER, D. M. Currently approved prophylactic HPV vaccines. **Expert Review of Vaccines**, v. 8, n. 12, p. 1663–1679, 2009.

HARRO, C. D.; PANG, Y. Y.; RODEN, R. B.; HILDESHEIM, A.; WANG, Z.; REYNOLDS, M. J.; MAST, T. C.; ROBINSON, R.; MURPHY, B. R.; KARRON, R. A.; DILLNER, J.; SCHILLER, J. T.; LOWY, D. R. Safety and immunogenicity trial in adult volunteers of a human papillomavirus 16 L1 virus-like particle vaccine. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 93, n. 4, p. 284–292, 2001.

HASAN, U. A.; BATES, E.; TAKESHITA, F.; BILIATO, A.; ACCARDI, R.; BOUVARD, V.; MANSOUR, M.; VINCENT, I.; GISSMANN, L.; IFTNER, T.; SIDERI, M.; STUBENRAUCH, F.; TOMMASINO, M. TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16. **Journal of Immunology**, v. 178, n. 5, p. 3186–3197, 2007.

HAUPT, R. M.; SINGS, H. L. The efficacy and safety of the quadrivalent human papillomavirus 6/11/16/18 vaccine gardasil. **The Journal of Adolescent Health: Official Publication of the Society for Adolescent Medicine**, v. 49, n. 5, p. 467–475, 2011.

HEPBURN, H. M.; KAUFMANN, A. M. Nobel price for vaccination against cervical cancer: current data and guidelines. **Internist (Berlin)**, v. 50, n. 5, p. 617–626, 2009.

HITZEROTH, I. I.; PASSMORE, J. A.; SHEPARD, E.; STEWART, D.; MÜLLER, M.; WILLIAMSON, A. L.; RYBICKI, E. P.; KAST, W. M. Immunogenicity of an HPV-16 L2 DNA vaccine. **Vaccine**, v. 27, n. 46, p. 6432–6434, 2009.

JAGU, S.; KARANAM, B.; GAMBHIRA, R.; CHIVUKULA, S. V.; CHAGANTI, R. J.; LOWY, D. R.; SCHILLER, J. T.; RODEN, R. B. Concatenated multitype L2 fusion proteins as candidate prophylactic pan-human papillomavirus vaccines. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 101, n. 11, p. 782–792, 2009.

JAGU, S.; KWAK, K.; GARCEA, R. L.; RODEN, R. B. Vaccination with multimeric L2 fusion protein and L1 VLP or capsomeres to broaden protection against HPV infection. **Vaccine**, v. 28, n. 28, p. 4478–4486, 2010.

JEMAL, A.; BRAY, F.; CENTER, M. M.; FERLAY, J.; WARD, E.; FORMAN, D. Global cancer statistics. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 61, n. 2, p. 69–90, 2011.

JOHNSON, K. M.; KINES, R. C.; ROBERTS, J. N.; LOWY, D. R.; SCHILLER, J. T.; DAY, P. M. Role of heparan sulfate in attachment to and infection of the murine female genital tract by human papillomavirus. **Journal of Virology**, v. 83, n. 5, p. 2067–2074, 2009.

JOURA, E. A.; LEODOLTER, S.; HERNANDEZ-AVILA, M.; WHEELER, C. M.; PEREZ, G.; KOUTSKY, L. A.; GARLAND, S. M.; HARPER, D. M.; TANG, G. W.; FERRIS, D. G.; STEBEN, M.; JONES, R. W.; BRYAN, J.; TADDEO, F. J.; BAUTISTA, O. M.; ESSER, M. T.; SINGS, H. L.; NELSON, M.; BOSLEGO,

J. W.; SATTler, C.; BARR, E.; PAAVONEN, J. Efficacy of a quadrivalent prophylactic human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like-particle vaccine against high-grade vulval and vaginal lesions: a combined analysis of three randomised clinical trials. **Lancet**, v. 369, n. 9574, p. 1693–1702, 2007.

KARANAM, B.; JAGU, S.; HUH, W. K.; RODEN R. B. Developing vaccines against minor capsid antigen L2 to prevent papillomavirus infection. **Immunology and Cell Biology**, v. 87, n. 4, p. 287–299, 2009.

KAVATI, E. A.; PALUMBO, A. C. M.; ANDRADE, F. B.; MARIGLIANI, B.; SAKAUCHI, D.; LEÃO, E.; ARMBRUSTER-MORAES, E.; MÜLLER, M.; CIANCIARULLO, A. M. Interaction of HPV16L1L2 VLP with stem cells CD34+/CD117+ of the human amniotic fluid. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.). **Current microscopy contributions to advances in science and technology**. 5th ed. Badajóz, Spain: Formatex Research Center, 2012. v. 1, p. 617–624.

KAVATI, E. A. **Interação de oncoproteínas virais E6 e E7 de HPV16/18 com alvos celulares potenciais para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas**. 2012. 108 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

KAWAI, K.; de ARAÚJO, G. T.; FONSECA, M.; PILLSBURY, M.; SINGHAL, P. K. Estimated health and economic impact of quadrivalent HPV (types 6/11/16/18) vaccination in Brazil using a transmission dynamic model. **BMC Infectious Diseases**, v. 12, p. 250, 2012.

KAWANA, K.; MATSUMOTO, K.; YOSHIKAWA, H.; TAKETANI, Y.; KAWANA, T.; YOSHIIKE, K.; KANDA, T. A surface immunodeterminant of human papillomavirus type 16 minor capsid protein L2. **Virology**, v. 245, n. 2, p. 353–359, 1998.

KIM, D.; GAMBHIRA, R.; KARANAM, B.; MONIE, A.; HUNG, C. F.; RODEN, R.; WU, T. C. Generation and characterization of a preventive and therapeutic HPV DNA vaccine. **Vaccine**, v. 26, n. 3, p. 351–360, 2008.

KIRNBAUER, R.; BOOY, F.; CHENG, N.; LOWY, D. R.; SCHILLER, J. T. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 24, p. 12180–12184, 1992.

KIRNBAUER, R.; CHANDRACHUD, L. M.; O'NEILL, B. M.; WAGNER, E. R.; GRINDLAY, G. J.; ARMSTRONG, A.; McGARVIE, G. M.; SCHILLER, J. T.; LOWY, D. R.; CAMPO, M. S. Virus-like particles of bovine papillomavirus type 4 in prophylactic and therapeutic immunization. **Virology**, v. 219, n. 1, p. 37–44, 1996.

KLINGELHUTZ, A. J.; ROMAN, A. Cellular transformation by human papillomaviruses: lessons learned by comparing high- and low-risk viruses. **Virology**, v. 424, n. 2, p. 77–98, 2012.

KOMLY, C. A.; BREITBURD, F.; CROISSANT, O.; STEECK, R. E. The L2 open reading frame of human papillomavirus type 1a encodes a minor structural protein carrying type-specific antigens. **Journal of Virology**, v. 60, n. 2, p. 813–816, 1986.

KONDO, K.; ISHII, Y.; OCHI, H.; MATSUMOTO, T.; YOSHIKAWA, H.; KANDA, T. Neutralization of HPV16, 18, 31, and 58 pseudovirions with antisera induced by immunizing rabbits with synthetic peptides representing segments of the HPV16 minor capsid protein L2 surface region. **Virology**, v. 358, n. 2, p. 266–272, 2007.

KOSHIOL, J.; LINDSAY, L.; PIMENTA, J. M.; POOLE, C.; JENKINS, D.; SMITH, J. S. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia: a systematic review and meta-analysis. **American Journal of Epidemiology**, v. 168, n. 2, p. 123–137, 2008.

KREIMER, A. R.; CLIFFORD, G. M.; BOYLE, P.; FRANCESCHI, S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 14, n. 2, p. 467–475, 2005.

KWAK, K.; YEMELYANOVA, A.; RODEN, R. B. S. Prevention of cancer by prophylactic human papillomavirus vaccines. **Current Opinion in Immunology**, v. 23, n. 2, p. 244–251, 2011.

LACEY, C. J. N.; LOWNDES, C. M.; SHAH, K. V. Chapter 4: Burden and management of non-cancerous HPV-related conditions: HPV-6/11 disease. **Vaccine**, v. 24, p. S3/35–S3/41, 2006. Suppl. 3.

LEDER, C.; KLEINSCHMIDT, J. A.; WIETHE, C.; MÜLLER, M. Enhancement of capsid gene expression: preparing the human papillomavirus type 16 major structural gene L1 for DNA vaccination purposes. **Journal of Virology**, v. 75, n. 19, p. 9201–9209, 2001.

LEPIQUE, A. P.; RABACHINI, T.; VILLA, L. L. HPV vaccination: the beginning of the end of cervical cancer? - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 1, p. 1–10, 2009.

LI, M.; BEARD, P.; ESTES, P. A.; LYON, M. K.; GARCEA, R. L. Intercapsomeric Disulfide Bonds in Papillomavirus Assembly and Disassembly. **Journal of Virology**, v. 72, n. 3, p. 2160–2167, 1998.

LOWE, J.; PANDA, D.; ROSE, S.; JENSEN, T.; HUGHES, W. A.; TSO, F. Y.; ANGELETTI, P. C. Evolutionary and structural analyses of alpha-papillomavirus capsid proteins yields novel insights into L2 structure and interaction with L1. **Virology Journal**, v. 5, p. 150, 2008.

LOWY, D. R.; SCHILLER, J. T. Reducing HPV-associated cancer globally. **Cancer Prevention Research**, v. 5, n. 1, p. 18–23, 2012.

MANDIC, A. Primary prevention of cervical cancer: prophylactic human papillomavirus vaccines. **Journal of B.U.ON.: Official Journal of the Balkan Union of Oncology**, v. 17, n. 3, p. 422–427, 2012.

MARIANI, L.; VENUTI, A. HPV vaccine: an overview of immune response, clinical protection, and new approaches for the future. **Journal of Translational Medicine**, v. 8, p. 105, 2010.

MARIGLIANI, B.; KAVATI, E. A.; SAKAUCHI, D.; OLIVEIRA, H. B.; CANALI, R. A.; SASAKI, A. A.; FERREIRA Jr, J. M. C.; ARMBRUSTER-MORAES, E.; MÜLLER, M.; CIANCIARULLO, A. M. Intracellular distribution of recombinant Human Papillomavirus capsid proteins. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.). **Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology**. Badajóz, Spain: Formatex Research Center, 2012. v. 1, p. 678–684.

MARUSIC, M. B.; MENCIN, N.; LICEN, M.; BANKS, L.; GRM, H. S. Modification of human papillomavirus minor capsid protein L2 by sumoylation. **Journal of Virology**, v. 84, n. 21, p. 11585–11589, 2010.

MEYERS, C.; FRATTINI, M. G.; HUDSON, J. B.; LAIMINS, L. A. Biosynthesis of human papillomavirus from a continuous cell line upon epithelial differentiation. **Science**, v. 257, n. 5072, p. 971–973, 1992.

MODIS, Y.; TRUS, B. L.; HARRISON, S. C. Atomic model of the papillomavirus capsid. **The EMBO Journal**, v. 21, n. 18, p. 4754–4762, 2002.

MOODY, C. A.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. **Nature Reviews. Cancer**, v. 10, n. 8, p. 550–560, 2010.

MOSCICKI, A-B.; SCHIFFMAN, M.; KJAER, S.; VILLA, L. L. Chapter 5: updating the natural history of HPV and anogenital cancer. **Vaccine**, v. 24, p. S42-S51, 2006. Suppl. 3.

MOSSADEGH, N.; GISSMANN, L.; MÜLLER, M.; ZENTGRAF, H.; ALONSO, A.; TOMAKIDI, P. Codon optimization of the human papillomavirus 11 (HPV 11) L1 gene leads to increased gene expression and formation of virus-like particles in mammalian epithelial cells. **Virology**, v. 326, n. 1, p. 57–66, 2004.

MUÑOZ, N.; CASTELLSAGUÉ, X.; de GONZÁLEZ, A. B.; GISSMANN, L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine**, v. 24, p. S3/1–S3/10, 2006. Suppl. 3.

NAKAO, S.; MORI, S.; KONDO, K.; MATSUMOTO, K.; YOSHIKAWA, H.; KANDA, T. Monoclonal antibodies recognizing cross-neutralization epitopes in human papillomavirus 16 minor capsid protein L2. **Virology**, v. 434, n. 1, p. 110–117, 2012.

NIETO, K.; WEGHOFFER, M.; SEHR, P.; RITTER, M.; SEDLMEIER, S.; KARANAM, B.; SEITZ, H.; MÜLLER, M.; KELLNER, M.; HÖRER, M.; MICHAELIS, U.; RODEN, R. B.; GISSMANN, L.; KLEINSCHMIDT, J. A. Development of AAVLP(HPV16/31L2) Particles as Broadly Protective HPV Vaccine Candidate. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, e39741, 2012.

PAAVONEN, J.; NAUD, P.; SALMERÓN, J.; WHEELER, C. M.; CHOW, S. N.; APTER, D.; KITCHENER, H.; CASTELLSAGUE, X.; TEIXEIRA, J. C.; SKINNER, S. R.; HEDRICK, J.; JAISAMRAN, U.; LIMSON, G.; GARLAND, S.; SZAREWSKI, A.; ROMANOWSKI, B.; AOKI, F. Y.; SCHWARZ, T. F.; POPPE, W. A.; BOSCH, F. X.; JENKINS, D.; HARDT, K.; ZAHAF, T.; DESCAMPS, D.; STRUYF, F.;

LEHTINEN, M.; DUBIN, G.; HPV PATRICIA STUDY GROUP. Efficacy of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by oncogenic HPV types (PATRICIA): final analysis of a double-blind, randomised study in young women. **Lancet**, v. 374, n. 9686, p. 301–314, 2009.

PALMER, K. E.; JENSON, A. B.; KOUOKAM, J. C.; LASNIK, A. B.; GHIM, S. J. Recombinant vaccines for the prevention of human papillomavirus infection and cervical cancer. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 86, n. 3, p. 224–233, 2009.

PALUMBO, A. C. M.; LEÃO, E.; SZULCZEWSKI, V.; ANDRADE, F. B.; VALADÃO, T. M.; KAVATI, E. A.; ARMBRUSTER-MORAES, E.; CIANCIARULLO, A. M. HPV16 L1L2 VLP interaction with human amniotic fluid cells. **Acta Microscopica**, v. 18, p. 659–660, 2009. Suppl. C.

PARKIN, D. M.; BRAY, F. Chapter 2: the burden of HPV-related cancers. **Vaccine**, v. 24, p. S3/11–S3/25, 2006. Suppl. 3.

PASTRANA, D. V.; GAMBHIRA, R.; BUCK, C. B.; PANG, Y. Y.; THOMPSON, C. D.; CULP, T. D.; CHRISTENSEN, N. D.; LOWY, D. R.; SCHILLER, J. T.; RODEN, R. B. Cross-neutralization of cutaneous and mucosal Papillomavirus types with anti-sera to the amino terminus of L2. **Virology**, v. 337, n. 2, p. 365–372, 2005.

POLJAK, M. Prophylactic human papillomavirus vaccination and primary prevention of cervical cancer: issues and challenges. **Clinical Microbiology and Infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 18, p. 64-69, 2012. Suppl. s5.

READ, T. R.; HOCKING, J. S.; CHEN, M. Y.; DONOVAN, B.; BRADSHAW, C. S.; FAIRLEY, C. K. The near disappearance of genital warts in young women 4 years after commencing a national human papillomavirus (HPV) vaccination programme. **Sexually Transmitted Infections**, v. 87, n. 7, p. 544–547, 2011.

ROBERTS, J. N.; BUCK, C. B.; THOMPSON, C. D.; KINES, R.; BERNARDO, M.; CHOYKE, P. L.; LOWY, D. R.; SCHILLER, J. T. Genital transmission of HPV in a mouse model is potentiated by nonoxynol-9 and inhibited by carrageenan. **Nature Medicine**, v. 13, n. 7, p. 857–861, 2007.

RODEN, R. B.; GREENSTONE, H. L.; KIRNBAUER, R.; BOOY, F. P.; JESSIE, J.; LOWY, D. R.; SCHILLER, J. T. In vitro generation and type-specific neutralization of a human papillomavirus type 16 virion pseudotype. **Journal of Virology**, v. 70, n. 9, p. 5875–5883, 1996.

RODEN, R. B.; YUTZKY, W. H. 4th, FALLON, R.; INGLIS, S.; LOWY, D. R.; SCHILLER, J. T. Minor capsid protein of human genital papillomaviruses contains subdominant, cross-neutralizing epitopes. **Virology**, v. 270, n. 2, p. 254–257, 2000.

RODEN, R. B.; GRAVITT, P.; WU, T. C. Towards global prevention of human papillomavirus-induced cancer. **European Journal of Immunology**, v. 38, n. 2, p. 323–326, 2008.

RODEN, R.; WU, T. C. How will HPV vaccines affect cervical cancer? **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 10, p. 753–763, 2006.

ROMBALDI, R. L.; SERAFINI, E. P.; MANDELLI, J.; ZIMMERMANN, E.; LOSQUIAVO, K. P. Transplacental transmission of Human Papillomavirus. **Virology Journal**, v. 5, p. 106, 2008.

RUBIO, I.; BOLCHI, A.; MORETTO, N.; CANALI, E.; GISSMANN, L.; TOMMASINO, M.; MÜLLER, M.; OTTONELLO, S. Potent anti-HPV immune responses induced by tandem repeats of the HPV16 L2 (20 -- 38) peptide displayed on bacterial thioredoxin. **Vaccine**, v. 27, n. 13, p. 1949–1956, 2009.

SADEYEN, J. R.; TOURNE, S.; SHKRELI, M.; SIZARET, P. Y.; COURSAGET, P. Insertion of a foreign sequence on capsid surface loops of human papillomavirus type 16 virus-like particles reduces their capacity to induce neutralizing antibodies and delineates a conformational neutralizing epitope. **Virology**, v. 309, n. 1, p. 32–40, 2003.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SCELLENBACHER, C.; RODEN, R.; KIRNBAUER, R. Chimeric L1-L2 virus-like particles as potential broad-spectrum human papillomavirus vaccines. **Journal of Virology**, v. 83, n. 19, p. 10085–10095, 2009.

SCHIFFMAN, M. et al. Human papillomavirus and cervical cancer. **Lancet**, v. 370, n. 9590, p. 890–907, 2007.

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

SCHILLER, J. T.; LOWY, D. R. Understanding and learning from the success of prophylactic human papillomavirus vaccines. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 10, n. 10, p. 681–692, 2012.

SEITZ, H.; SCHMITT, M.; BÖHMER, G.; KOPP-SCHNEIDER, A.; MÜLLER, M. Natural variants in the major neutralizing epitope of human papillomavirus minor capsid protein L2. **International Journal of Cancer**, v. 132, n. 3, p. E139-E148, 2013.

SIL, F. **Vacina contra HPV deve começar a ser distribuída em 2013**. 2012. Disponível em: <<http://oglobo.globo.com/saude/vacina-contr-hpv-deve-comecar-ser-distribuida-em-2013-6973848>>. Acesso em: 5 abr. 2013.

SMITH, J. F.; BROWNLOW, M.; BROWN, M.; KOWALSKI, R.; ESSER, M. T.; RUIZ, W.; BARR, E.; BROWN, D. R.; BRYAN, J. T. Antibodies from women immunized with Gardasil cross-neutralize HPV 45 pseudovirions. **Human Vaccines**, v. 3, n. 4, p. 109–115, 2007.

SOLOMON, D.; DAVEY, D.; KURMAN, R.; MORIARTY, A.; O'CONNOR, D.; PREY, M.; RAAB, R.; SHERMAN, M.; WILBUR, D.; WRIGHT, T. Jr; YOUNG, N.; Forum Group Members; Bethesda

2001 Workshop. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. **JAMA: the Journal of the American Medical Association**, v. 287, n. 16, p. 2114–2119, 2002.

STANLEY, M. Immune responses to human papillomavirus. **Vaccine**, v. 24 Suppl 1, p. S16–S22, 2006.

STANLEY, M. Immunobiology of HPV and HPV vaccines. **Gynecologic Oncology**, v. 109, n. 2, p. S15–S21, 2008.

STANLEY, M. Prospects for new human papillomavirus vaccines. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 23, n. 1, p. 70–75, 2010.

STANLEY, M. A. Replication of human papillomaviruses in cell culture. **Antiviral Research**, v. 24, n. 1, p. 1–15, 1994.

SUZICH, J. A.; GHIM, S. J.; PALMER-HILL, F. J.; WHITE, W. I.; TAMURA, J. K.; BELL, J. A.; NEWSOME, J. A.; JENSON, A. B.; SCHLEGEL, R. Systemic immunization with papillomavirus L1 protein completely prevents the development of viral mucosal papillomas. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 25, p. 11553–11557, 1995.

SZAREWSKI, A. HPV Vaccination and Cervical Cancer. **Current Oncology Reports**, v. 14, n. 6, p. 559–567, 2012.

SZULCZEWSKI, V.; LEÃO, E.; BORELLI, P.; BEÇAK, W.; MÜLLER, M.; ARMBRUSTER-MORAES, E.; CIANCARULLO, A. M. HPV16 L1L2 VLP interaction with human leucocytes. **Acta Microscopica**, v. 18, p. 657–658, 2009. Suppl. C.

SZULCZEWSKI, V. **Estudo *in vitro* sobre a interação celular e vias endocíticas de papilomavírus humano (HPV) em leucócitos do sangue periférico**. 2009. 137 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

TOMAZELA, J. M. **Cidade Paulista vai propor vacinação nacional contra o HPV**. 2011. Disponível em: <<http://www.estadao.com.br/noticias/geral,cidade-paulista-vai-propor-vacinacao-nacional-contr-hpv,773061,0.htm>>. Acesso em: 5 abr. 2013.

TOTA, J. E.; CHEVARIE-DAVIS, M.; RICHARDSON, L. A.; DEVRIES, M.; FRANCO, E. L. Epidemiology and burden of HPV infection and related diseases: implications for prevention strategies. **Preventive Medicine**, v. 53, p. S12–S21, 2011. Suppl. 1.

TRUS, B. L.; RODEN, R. B.; GREENSTONE, H. L.; VRHEL, M.; SCHILLER, J. T.; BOOY, F. P. Novel structural features of bovine papillomavirus capsid revealed by a three-dimensional reconstruction to 9 Å resolution. **Nature Structural Biology**, v. 4, n. 5, p. 413–420, 1997.

TUMBAN, E.; PEABODY, J.; PEABODY, D. S.; CHACKERIAN, B. A pan-HPV vaccine based on bacteriophage PP7 VLPs displaying broadly cross-neutralizing epitopes from the HPV minor capsid protein, L2. **PloS ONE**, v. 6, n. 8, p. e23310, 2011.

UNCKELL, F.; STREECK, R. E.; SAPP, M. Generation and neutralization of pseudovirions of human papillomavirus type 33. **Journal of Virology**, v. 71, n. 4, p. 2934–2939, 1997.

UPILE, T.; JERJES, W.; AL-KHAWALDE, M.; RADHI, H.; SUDHOFF, H. Oral sex, cancer and death: sexually transmitted cancers. **Head & Neck Oncology**, v. 4, p. 31, 2012.

VAN CRAENENBROECK, K.; VANHOENACKER, P.; HAEGEMAN, G. Episomal vectors for gene expression in mammalian cells. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 18, p. 5665–5678, 2000.

VARSANI, A.; WILLIAMSON, A. L.; de VILLIERS, D.; BECKER, I.; CHRISTENSEN, N. D.; RYBICKI, E. P. Chimeric human papillomavirus type 16 (HPV-16) L1 particles presenting the common neutralizing epitope for the L2 minor capsid protein of HPV-6 and HPV-16. **Journal of Virology**, v. 77, n. 15, p. 8386–8393, 2003.

VICENTE, T.; ROLDÃO, A.; PEIXOTO, C.; CARRONDO, M. J.; ALVES, P. M. Large-scale production and purification of VLP-based vaccines. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 107, p. S42–S48, 2011.

VOLPERS, C.; UNCKELL, F.; SCHIRMACHER, P.; STREECK, R. E.; SAPP, M. Binding and internalization of human papillomavirus type 33 virus-like particles by eukaryotic cells. **Journal of Virology**, v. 69, n. 6, p. 3258–3264, 1995.

WALBOOMERS, J. M.; JACOBS, M. V.; MANOS, M. M.; BOSCH, F. X.; KUMMER, J. A.; SHAH, K. V.; SNIJDERS, P. J.; PETO, J.; MEIJER, C. J.; MUÑOZ, N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **The Journal of Pathology**, v. 189, n. 1, p. 12–19, 1999.

WANG, J. W.; RODEN, R. B. L2, the minor capsid protein of papillomavirus. **Virology**, 2013. In press.

WHEELER, C. M.; CASTELLSAGUÉ, X.; GARLAND, S. M.; SZAREWSKI, A.; PAAVONEN, J.; NAUD, P.; SALMERÓN, J.; CHOW, S. N.; APTER, D.; KITCHENER, H.; TEIXEIRA, J. C.; SKINNER, S. R.; JAISAMRAM, U.; LIMSON, G.; ROMANOWSKI, B.; AOKI, F. Y.; SCHWARZ, T. F.; POPPE, W. A.; BOSCH, F. X.; HARPER, D. M.; HUH, W.; HARDT, K.; ZAHAF, T.; DESCAMPS, D.; STRUYF, F.; DUBIN, G.; LEHTINEN, M.; HPV PATRICIA Study Group. Cross-protective efficacy of HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by non-vaccine oncogenic HPV types: 4-year end-of-study analysis of the randomised, double-blind PATRICIA trial. **The Lancet Oncology**, v. 13, n. 1, p. 100–110, 2012.

WHITE, W. I.; WILSON, S. D.; PALMER-HILL, F. J.; WOODS, R. M.; GHIM, S. J.; HEWITT, L. A.; GOLDMAN, D. M.; BURKE, S. J.; JENSON, A. B.; KOENIG, S.; SUZICK, J. A. Characterization of a

major neutralizing epitope on human papillomavirus type 16 L1. **Journal of Virology**, v. 73, n. 6, p. 4882–4889, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION/ICO INFORMATION CENTRE ON HPV AND CERVICAL CANCER. **Brazil - human papillomavirus and related cancers, fact sheet 2010**, 2010. Disponível em: <http://apps.who.int/hpvcentre/statistics/dynamic/ico/SummaryReportsSelect.cfm>. Acesso em: 06 fev. 2013.

YAMADA, T.; MANOS, M. M.; PETO, J.; GREER, C. E.; MUNOZ, N.; BOSCH, F. X.; WHEELER, C. M. Human Papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. **Journal of Virology**, v. 71, n. 3, p. 2463–2472, 1997.

ZHAO, Q.; GUO, H. H.; WANG, Y. WASHABAUGH, M. W.; SITRIN, R. D. Visualization of discrete L1 oligomers in human papillomavirus 16 virus-like particles by gel electrophoresis with Coomassie staining. **Journal of Virological Methods**, v. 127, n. 2, p. 133–140, 2005.

ZHAO, Q.; MODIS, Y.; HIGH, K.; TOWNE, V.; MENG, Y.; WANG, Y.; ALEXANDROFF, J.; BROWN, M.; CARRAGHER, B.; POTTER, C. S.; ABRAHAM, D.; WOHLPART, D.; KOSINSKI, M.; WASHABAUGH, M. W.; SITRIN, R. D. Disassembly and reassembly of human papillomavirus virus-like particles produces more virion-like antibody reactivity. **Virology Journal**, v. 9, p. 52, 2012.

ZHENG, Z. M.; BAKER, C. C. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. **Frontiers in Bioscience: a Journal and Virtual Library**, v. 11, p. 2286–2302, 2006.

ZHOU, J.; STENZEL, D. J.; SUN, X. Y.; FRAZER, I. H. Synthesis and assembly of infectious bovine papillomavirus particles in vitro. **The Journal of General Virology**, v. 74, pt. 4, p. 763–768, 1993.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nature Reviews. Cancer**, v. 2, n. 5, p. 342–350, 2002.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. **Virology**, v. 384, n. 2, p. 260–265, 2009.