## **Dirce Sakauchi**

# POTENCIAL VACINAL DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DO CAPSÍDEO DE PAPILOMAVÍRUS HUMANO

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

São Paulo 2015

### **Dirce Sakauchi**

## POTENCIAL VACINAL DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DO CAPSÍDEO DE PAPILOMAVÍRUS HUMANO

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

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Profa. Dra. Aurora M. Cianciarullo

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

São Paulo 2015 DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Sakauchi, Dirce.

Potencial vacinal de proteínas recombinantes do capsideo de papilomavírus humano / Dirce Sakauchi. - São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Aurora Marques Cianciarullo.

Tese (Doutorado) – 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.

Versão do título para o inglês: Vaccine potential of recombinant proteins of human papillomavirus capsid.

1. Papilomavirus humano 2. Vacina profilática 3. Câncer 4. HPV 16 5. VLP 6. Capsídeo viral 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/SBIB0166/2015

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

Candidato(a):	Dirce Sakauchi.
Título da Tese:	Potencial vacinal de proteínas recombinantes do capsídeo de papilomavírus humano.
Orientador(a):	Profa. Dra. Aurora Marques Cianciarullo.
A Comissão pút	Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão plica realizada a///, considerou ( ) Aprovado(a) ( ) Reprovado(a)
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Presidente:	Assinatura:

Instituição:



#### SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE INSTITUTO BUTANTAN



São Paulo, 26 de abril de 2012.

llma. 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,

Arvene Góes Trezena

Presidente Interina ClBio-Instituto Butantan



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS INSTITUTO BUTANTAN Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505 cecaib@butantan.gov.br

### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Desenvolvimento de vacinas recombinantes profiláticas e terapêuticas contra o HPV e os cânceres associados ao vírus", protocolo nº **923/12**, sob a responsabilidade de Aurora Marques Cianciarullo – que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 8/8/12.

N° de animals/espécie	Vigência do Projeto: 07/2012 - 12/2017
180 camundongos Balb/c 50 dias (M); 180 camundongos C57Bl/6 50 dias (M	Laboratório de Genética
São Paulo, 9 de agosto de 2	
1 1 11/23	
Affrance	

Dedico este trabalho

Aos meus pais, Shigeteru (*in memorium*) e Kinu

> Aos meus irmãos, Cida, Ruth e Hélio

À toda a minha família,

Por todo carinho, apoio e incentivo.

#### AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela proteção em todos os momentos e força nas horas mais difíceis.

À Profa. Dra. Aurora Marques Cianciarullo por todos esses anos de amizade, pela receptividade, pelos ensinamentos, incentivo e por proporcionar a oportunidade de desenvolver esta tese.

À Dra. Irina Kerkis, diretora do Laboratório de Genética por permitir a participação no grupo de pesquisa e pela possibilidade de usar os equipamentos de seu laboratório.

À minha irmã Maria Aparecida Sakauchi Takano por todo apoio, colaboração e constante incentivo para a continuidade nos estudos.

À Carolina Yumi Takano pela contribuição para a realização desta pesquisa.

À doutoranda Érica Akemi Kavati pela amizade, colaboração e sugestões durante o desenvolvimento deste estudo.

À Fernanda de Oliveira Bou Anni do Programa de Aprimoramento Profissional pela sua amizade e ajuda na realização dos experimentos.

Aos funcionários do laboratório Tadeu da Cruz e Fernanda Marceli pelo apoio técnico no laboratório, amizade e pelos momentos de descontração.

Ao Dener M. De Souza por ser sempre prestativo e pela colaboração na análise do Microscópio de imunofluorescência Nikon Eclipse Ni.

Ao Dr. Henrique K. Rofatto do Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan, pela assistência técnica na análise do microscópio confocal LSM 510 Meta Zeiss.

Ao Dr. Jorge Mário da Costa Ferreira Junior pelo suporte técnico na realização da citometria de fluxo.

Aos membros da banca de qualificação, Dra. Soraia Attié Calil Jorge, Dra. Denise S. P. Q. Horton e Prof. Dr. Edécio Armbruster de Moraes pelas sugestões para a finalização deste trabalho.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, que contribuíram no aperfeiçoamento profissional e auxiliaram nas documentações e informações sobre o programa.

Aos órgãos de fomento CAPES, FAPESP, Instituto Butantan e Fundação Butantan, pelo auxílio financeiro que possibilitaram a realização desta pesquisa.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento desta tese.

### RESUMO

SAKAUCHI, D. **Potencial vacinal de proteínas recombinantes do capsídeo de papilomavírus humano.** 2015. 90 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O câncer cervical é a consequência mais séria da infecção por Papilomavírus humano (HPV), constituindo uma das principais causas de morte entre mulheres no mundo, fato que remete a um importante desafio para a saúde pública mundial. A vacinação profilática em grande escala seria uma alternativa para a redução das taxas de câncer cervical, tornando-se essencial a busca de novas estratégias vacinais. As vacinas atuais são baseadas em partículas semelhantes a vírus (VLPs) da proteína principal L1 do capsídeo viral, com efetiva proteção contra tipos específicos, mas com limitada proteção cruzada contra outros tipos virais. Uma estratégia vacinal é a utilização da proteína L2, que contém sequências altamente conservadas para uma proteção mais ampla contra os diversos tipos de HPVs. Neste estudo, desenvolvemos a produção de VLPs contendo as proteínas L1 e L2 do HPV16, utilizando células epiteliais humanas (293-F) em suspensão e em meio isento de soro fetal bovino. Desde o seu desenvolvimento, tornou-se uma das mais frequentemente utilizadas na produção de proteínas recombinantes. Trata-se de uma célula com metabolismo bastante intenso, compatível com o observado durante o cultivo celular, adequada para a finalidade de expressão de proteínas heterólogas. Além disso, apresenta vantagens como a facilidade de cultivo, transfecção e ocorrência de processos como a glicosilação de proteínas, fosforilação, formação de pontes de dissulfetos e outras modificações pós- traducionais, essenciais para a função das proteínas, facilitando a produção de proteínas similares às condições in vivo. A cinética de expressão das proteínas HPV16 L1L2 mostrou que a máxima expressão ocorre ao redor de 48h pós- transfecção, por microscopia confocal e citometria de fluxo. Ambas as proteínas foram localizadas no núcleo e citoplasma celular das células. As análises por microscopia eletrônica de transmissão mostraram a formação de VLPs e a presença de proteínas L1 e L2 no lisado celular, através de imunomarcações com ouro coloidal. A purificação por cromatografia de afinidade permitiu a obtenção de VLPs mais corretas estruturalmente. Os ensaios imunoenzimáticos por Western-blotting e ELISA confirmaram a indução de resposta imunológica para ambas as proteínas, pelo sistema imune de camundongos. Os anticorpos séricos anti-HPV16 L1 e anti-HPV16 L2 de animais imunizados com VLP L1L2, reconheceram a proteína principal L1 de massa molecular ao redor de 55 kDa e a secundária L2 de aproximadamente 72 kDa, respectivamente. Os ensaios de ELISA demostraram que os anticorpos séricos apresentaram títulos de anti-HPV16 L1 superiores em relação à anti-HPV16 L2, no grupo imunizado com adjuvante. Novas estratégias devem ser experimentadas, visando otimizar a imunogenicidade de VLP L1L2 do HPV16. Entretanto, o sistema de produção de VLP L1L2 do HPV16 foi estabelecido de maneira eficiente, em células epiteliais humanas em suspensão e com resultados promissores, podendo contribuir para o desenvolvimento de uma vacina profilática de amplo espectro de proteção.

Palavras-chave: Papilomavírus humano. Câncer. HPV16. VLP. L1L2. Vacina profilática.

### ABSTRACT

SAKAUCHI, D. Vaccine potential of recombinant proteins of human papillomavirus capsid. 2015. 90 p. Ph. D. thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Cervical cancer is the most serious consequence of infection by human papillomavirus (HPV), constituting one of the leading causes of death among women worldwide, and a fact that points to a major challenge to global public health. The prophylactic vaccination on a large scale would be an alternative to reducing cervical cancer rates, making it essential to search for new vaccine strategies. Current vaccines are based on virus-like particles (VLPs) of the major virus capsid protein L1, with effective protection against specific types, but with a limited cross-protection against other HPV types. A vaccination strategy is the use of the L2 protein, which contains highly conserved sequences for a broader protection against different types of HPVs. In this study, we have developed the production of VLPs containing L1 and L2 proteins of HPV16, using human epithelial cells (293-F) suspended in medium without fetal bovine serum. Since its development, it has become one of the most frequently used for the production of recombinant proteins. This is a cell with very intense metabolism, consistent with the observed during cell culture, suitable for the purpose of expressing heterologous proteins. In addition, it has advantages such as ease of culture, transfection and occurrence of processes such as protein glycosylation, phosphorylation, formation of disulfide bonds and other essential post-translational modifications to protein function, facilitating the production of proteins similar to the conditions in vivo. The kinetics of expression of the HPV16 proteins L1L2 showed that maximal expression occurs around 48h post-transfection by confocal microscopy and flow cytometry. Both proteins were localized in the nucleus and cytoplasm of cells. The analysis by transmission electron microscopy showed formation of VLPs and the presence of proteins L1 and L2 through colloidal gold immunolabeling, in cell lysate. Purification by affinity chromatography allows obtaining VLPs more structurally correct. The immunoassays by Western blotting and ELISA confirmed the induction of immune response to both proteins by the immune system of mice. The serum anti-HPV16 L1 and anti-HPV16 L2 of animals immunized with VLPs L1L2 recognized the major protein L1 molecular weight around 55 kDa and the secondary protein L2 of approximately 72 kDa, respectively. The ELISA assays demonstrated that serum antibodies showed anti-HPV16 L1 titers above in relation to anti-HPV16 L2 in the group immunized with adjuvant. New strategies should be experienced to optimize the immunogenicity of VLPs L1L2 of HPV16. However, VLPs L1L2 of HPV16 production system was established efficiently in human epithelial cells in suspension and with promising results, which may contribute to the development of a prophylactic vaccine broad protection spectrum.

Keywords: Human papillomavirus. Cancer. HPV16. VLP. L1L2. Prophylactic vaccine.

### LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Organização genômica do HPV16 de alto risco	21
Figura 2 - Representação esquemática de formação da VLP do HPV	23
Figura 3 - Estrutura do capsômero L1	24
Figura 4 - Modelo tridimensional dos pentâmeros de L1	24
Figura 5 - Esquema do monômero de HPV16 L1 e a reatividade dos anticorpos com a	
HPV16VLP	25
Figura 6 - Reconstrução 3D computadorizada do capsídeo HPV16	26
Figura 7 - Sequência conservada da região aa 17-36 presente em diferentes tipos de	
HPV	27
Figura 8 - Modelo de infecção do HPV no epitélio cervical	28
Figura 9 - Ciclo de vida do HPV de alto risco no epitélio cervical	30
Figura 10 - Processo de transudação e exsudação dos anticorpos para o local de	
infecção do HPV	33
Figura 11 - Representação gráfica das VLPs da Cervarix, Gardasil e vacinas	
profiláticas do HPV da próxima geração, baseadas em proteínas do capsídeo viral L1	
e/ou L2	37
Figura 12 - Esquema dos vetores plasmideais	42
Figura 13 - Micrografia eletrônica de corte ultrafino de célula 293-F não transfectada	55
Figura 14 - Cultivo de células 293-F em suspensão em meio livre de soro fetal bovino	56
Figura 15 - Ensaio de Imunofluorescência de células 293-F não transfectadas	56
Figura 16 - Ensaio de Imunofluorescência de células 293-F transfectadas com os	
núcleos corados com DAPI	57
Figura 17 - Células 293 - F transfectadas com vetor (pUF3/L1h) expressando a	
proteína L1 detectada por imunofluorescência indireta	58
Figura 18 - Cinética da expressão da proteína L1 em células 293-F transfectadas com	

o vetor (pUF3/L1h) por microscopia confocal	60
Figura 19 - Cinética da expressão das proteínas L1 e L2 em células 293 - F	
cotransfectadas com os vetores (pUF3/L1h) e (pUF3/L2h)	62
Figura 20 - Célula 293 - F utilizada como controle, visualizada por microscopia	
confocal	63
Figura 21 - Imunocitoquímica ultraestrutural - célula 293-F cotransfectada	64
Figura 22 - Imunocitoquímica ultraestrutural - célula 293-F cotransfectada	64
Figura 23 - Lisado celular clarificado HPV16 L1L2	65
Figura 24 - Fluxograma das etapas de purificação de proteínas HPV16 L1L2	66
Figura 25 - SDS-PAGE 10%	68
Figura 26 - Western-blotting do lisado celular clarificado HPV16 L1L2 e das frações	
purificadas para a proteína HPV16 L1	69
Figura 27 - Western-blotting do lisado celular clarificado HPV16 L1L2 e das frações	
purificadas da proteína HPV16 L2	70
Figura 28 - SDS-PAGE 10% - Análise eletroforética do lisado celular clarificado e	
das frações da cromatografia de afinidade	71
Figura 29 - Western-blotting das proteínas purificadas HPV16 L1L2 (eluídos pool)	
por cromatografia de afinidade	72
Figura 30 - Titulação dos anticorpos IgG anti- HPV16 L1 pelo método de ELISA	
indireto	74
Figura 31 - Análise de IgG sérica anti- HPV16 L2 pelo método de ELISA	74
Figura 32 - Reconhecimentos de proteínas L1 e L2 pelos soros de camundongos	
imunizados com a formulação vacinal VLP L1L2 e de animais não imunizados, em	
ensaios de Western-blotting	75
Gráfico 1 - Cinética da expressão da L1 em células 293-F, por citometria de fluxo	60
Gráfico 2 - Cinética da expressão de L1 e L2 em células 293 - F, por citometria de	
fluxo	62

### LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Albumina sérica bovina
E	early protein (proteína de expressão precoce)
GFP	Green Fluorescent Protein
HEK	Linhagem celular Human Embryonic Kidney
HPV	Papilomavírus humano (Human papillomavirus)
Ig	Imunoglobulina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
kDa	Quilodalton
kV	Quilovolt
L	late protein (proteína de expressão tardia)
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
pb	Pares de base
pCMV	Promotor de Citomegalovírus
SDS	Dodecil sulfato de sódio
VLP	Partículas semelhantes a vírus (virus-like particles)

### SUMÁRIO

1 1NTRODUÇÃO	15
1.1 Papilomavírus humano (HPV)	17
1.2 Epidemiologia	19
1.3 Genoma viral e proteínas do Papilomavírus	21
1.4 Ciclo viral	27
1.5 Estratégias de evasão viral	30
1.6 Vacinas contra o HPV	31
2 OBJETIVOS	39
2.1 Objetivo Geral	39
2.2 Objetivos Específicos	39
3 MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1 Cultivos celulares	40
3.1.1 Linhagem celular	40
3.1.2 Cultivo celular em suspensão	40
3.2 Vetores de expressão gênica	41
3.2.1 Amplificação dos vetores plasmideais	42
3.2.1.1 Obtenção de bactérias competentes	42
3.2.1.2 Transformação de bactérias competentes	43
3.2.1.3 Seleção dos clones recombinantes e Extração de DNA plasmideal	43
3.3 Transfecção celular	43
3.4 Expressão das proteínas recombinantes L1 e L2	44
3.4.1 Microscopias Confocal e Epifluorescência	44
3.4.2 Citometria de Fluxo	45
3.4.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	46
3.4.3.1 Imunocitoquímica ultraestrutural	47

3.4.3.1.1 Proteínas HPV16 L1 e HPV16 L2	47
3.4.3.1.2 Análise de VLPs	48
3.5 Obtenção do lisado celular clarificado	49
3.6 Purificação de proteínas HPV16 L1 e L2	49
3.6.1 Precipitação com sulfato de amônio	49
3.6.2 Cromatografia de exclusão molecular	49
3.6.3 Cromatografia de afinidade	50
3.7 Dosagens de proteínas	50
3.8 Caracterização de proteínas L1 e L2	51
3.8.1 SDS-PAGE 10%	51
3.8.2 Western-blotting	51
3.8.3 Imunogenicidade das VLPs L1L2	52
3.8.3.1 Imunização dos animais	52
3.8.3.2 Titulação dos soros anti-HPV16 L1 e L2	53
4 RESULTADOS	54
4.1 Avaliação do sistema de expressão em células em suspensão	54
4.1.1 Células 293-F	54
4.1.2 Cultivo celular	55
4.2 Expressão e localização da proteína L1 por Microscopia de	
Epifluorescência	57
4.3 Cinética da expressão e localização da proteína L1	58
4.4 Cinética da expressão das proteínas L1 e L2	61
4.5 Expressão e localização das proteínas L1 e L2 por Microscopia Eletrônica de	
Transmissão (MET)	63
4.6 Purificação de proteínas do HPV16 L1L2	65
4.6.1 Cromatografia de exclusão molecular	66

4.6.1.1 Concentração de proteínas	67
4.6.1.2 SDS-PAGE 10%	67
4.6.1.3 Western-blotting	68
4.6.2 Cromatografia de afinidade do HPV16 L1L2	70
4.6.2.1 Concentração de proteínas	70
4.6.2.2 SDS-PAGE 10%	71
4.6.2.3 Western-blotting	72
4.7 Avaliação dos anticorpos IgG de camundongos imunizados com VLPs	
L1L2 de HPV16	73
4.7.1 Western-blotting	73
4.7.2 Ensaio imunoenzimático do tipo ELISA	75
5 DISCUSSÃO	76
6 CONCLUSÃO	82
	02

### 1 INTRODUÇÃO

A infecção por Papilomavírus humano (HPV) é o mais importante fator para o desenvolvimento de câncer cervical. A associação do vírus HPV com o carcinoma cervical foi postulada na década de 70, pelo cientista Harald zur Hausen, ao observar que o material genético do HPV é comumente encontrado integrado ao genoma da célula infectada (FRAZER; LEGATT; MATAROLLO, 2011; ZUR HAUSEN et al., 1974; ZUR HAUSEN, 1976). Atualmente está bem estabelecido o envolvimento do vírus HPV em praticamente todos os casos de câncer de colo do útero, além de estar associado em menor prevalência com outros tipos de cânceres: anogenital, de cabeça, pescoço, orofaríngeo, pulmonar e cutâneo (CUBIE, 2013; ZUR HAUSEN, 2009).

A infecção por HPV é de grande relevância clínica, sendo considerado o patógeno mais comum em doença sexualmente transmissível (DST), devido ao elevado potencial de transmissão, com estimativa de 60% de transmissão entre os parceiros (CUBIE, 2013). Estima-se que 50-80% de mulheres e homens sexualmente ativos serão infectados por HPVs genitais de ambos os tipos, de alto e baixo risco, em algum período da vida (STANLEY, 2010). A maioria das infecções por HPV são transientes, havendo regressão espontânea em cerca de 70% dos casos em 1 ano; aproximadamente 90% dos casos regridem em 2 anos; e em cerca de 10% dos casos, a infecção é persistente, aumentando o risco de desenvolvimento de câncer cervical (CASTELLSAGUÉ et al., 2009; CUBIE, 2013). A infecção persistente geralmente é definida como: a detecção contínua de DNA viral do mesmo tipo de HPV na cérvice por pelo menos 6 - 12 meses, possibilitando o desenvolvimento de neoplasia intraepitelial de alto grau (CIN2/3), e podendo evoluir para o carcinoma invasivo (SCHWARZ; OBERDAN, 2008).

A infecção persistente por HPV de alto risco está associada ao desenvolvimento de lesões precursoras, denominadas neoplasias intraepiteliais e dependendo do local são denominadas neoplasias intraepiteliais: cervicais (NIC), vulvares (NIV), vaginais (NIVa), penianas (NIP) e anais (NIA) (CUBIE, 2013). A NIC, a mais reconhecida e extensivamente estudada, apresenta um espectro de lesões intraepiteliais que dependendo da gravidade correspondem aos graus 1, 2 ou 3. As neoplasias intraepiteliais de baixo grau (NIC 1) são caracterizadas pelo baixo nível de proliferação celular, geralmente apresentam o genoma viral epissomal, e na maioria das lesões regride espontaneamente. As lesões intraepiteliais de alto grau (NIC 2 e NIC 3) apresentam elevada proliferação viral, geralmente associadas a integração do genoma viral, podendo progredir para o câncer invasivo (FRAZER; LEGATT;

MATAROLLO, 2011; MA et al., 2012; STANLEY, 2008). Apropriadas intervenções, geralmente podem prevenir a progressão para o carcinoma invasivo, no entanto existe uma considerável morbidade associada ao tratamento de estágios pré-cancerosos (CUBIE, 2013).

Além disso, existem fatores de risco adicionais que podem contribuir para a progressão maligna, como: o comportamento sexual, tabagismo, imunidade, predisposição genética, uso prolongado de contraceptivos orais e coinfecção com outros micro-organismos como *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, herpesvírus e HIV. A coinfecção com HIV e HPV é bem reconhecida, por proporcionar um aumento no risco de câncer em vários locais, no organismo de pacientes infectados. Estudos recentes mostram que o HPV também é um cofator para aquisição do HIV (CUBIE, 2013; HOULIHAN et al., 2012).

Em países desenvolvidos a incidência de neoplasia cervical em mulheres está reduzindo significantemente, como resultado dos programas de rastreamento, que realizam a detecção e tratamento da neoplasia intraepitelial cervical de alto grau. No entanto, outros cânceres associados ao HPV não são passíveis de rastreamento e a incidência está aumentando em homens e mulheres (STANLEY, 2014).

Segundo a World Health Organization (2012) estima-se que o HPV está associado em 90% dos casos de câncer anal, 70% dos casos de câncer vaginal, 50% dos casos de câncer de pênis e 43% de câncer de vulva (WHO, 2012). A estimativa global de câncer anal é de aproximadamente 1 caso a cada 100 mil, com 27 mil novos casos por ano (WHO, 2014). Os casos de câncer anal não eram comuns, mas recentemente a incidência mundial está aumentando em homens e mulheres, particularmente em homens homossexuais e em grupos HIV positivos (CUBIE, 2013; STANLEY et al., 2012b). As mulheres apresentam as maiores incidências em relação aos homens, em idades acima de 50 anos e nos homens predominam a faixa etária de 20 a 49 anos, embora esta incidência esteja aumentando (STANLEY et al., 2012b). Assim como na neoplasia cervical, o DNA do HPV pode ser comprovado em todos os estágios de lesão anal pré-maligna, sendo mais frequente o HPV16 na proporção acima de 70% e o HPV18 em cerca de 5% dos casos, seguidos por HPV33 e HPV31 (CUBIE, 2013). Em contraste ao câncer cervical, os cânceres de vagina, vulva e pênis são todos raros, provavelmente devido à falta de uma região de transformação celular em relação a ambas, a cérvice e ânus (CUBIE, 2013). Em todo o mundo, o câncer de vulva representa somente 3% dos cânceres ginecológicos (RUMBOLD et al., 2012). Muitos casos de câncer de pênis ocorrem em homens com idade superior a 50 anos e cerca de 50% dos casos estão associados ao HPV. De acordo com dados recentes dos Estados Unidos, as causas, distribuição racial e geográfica dos casos de câncer de pênis são semelhantes aos do câncer cervical (CUBIE, 2013). Os cânceres de células escamosas da cavidade oral (OCC) e da orofaringe (OPSCC) são o sexto câncer mais comum no mundo, com a estimativa de 400 mil novos casos e 23 mil mortes por ano. O aumento da incidência de câncer orofaríngeo está relacionado principalmente ao aumento nos casos de HPV- positivo, principalmente nos países desenvolvidos como: Estados Unidos, Austrália e Europa. Nos Estados Unidos para o ano de 2020, estima-se que o número anual de câncer orofaríngeo HPV- positivo superará o câncer cervical (STANLEY, 2014).

### 1.1 Papilomavírus humano (HPV)

O Papilomavírus é altamente espécie-específico, com capacidade de infectar répteis, aves e várias espécies de mamíferos (BERNARD et al., 2010; RECTOR; RANST, 2013). O HPV pertence à família Papillomaviridae, apresentando cinco gêneros: Alphapapillomavirus, Betapapillomavirus, Gammapapillomavirus, Mupapillomavirus e Nupapillomavirus (BERNARD et al., 2010). O HPV é capaz de infectar as células epiteliais da mucosa genital (somente Alphapapillomavirus) e da mucosa oral ou cutânea (representantes dos cinco gêneros) (BZHALAVA et al., 2013). Até o momento, 174 tipos de HPVs foram totalmente caracterizados, dos quais aproximadamente 40 tipos infectam a região anogenital (BZHALAVA et al., 2013; SCHIFFMAN et al., 2011). A identificação de um novo tipo de HPV é baseada na sequência de DNA da ORF (Open reading frame) do gene L1 diferir em 10% de outros tipos caracterizados; subtipos, quando a diferença for entre 2-10%; variantes, quando diferir menos que 2% (BERNARD et al., 2010; DE VILLERS et al., 2004). Os novos tipos de HPV recebem uma identificação numérica somente após a clonagem do genoma viral completo e depósito no Centro de Referência Internacional do HPV, estabelecido em 1985 em Heidelberg e transferido em 2012, para o Instituto Karolinska em Estocolmo, Suécia (BZHALAVA et al., 2013).

Os HPVs podem ser classificados de acordo com o seu tropismo para o epitélio cutâneo ou mucoso. Os tipos de HPVs cutâneos são tipicamente de baixo risco, e estão associados às lesões benignas e suas infecções são assintomáticas ou autorresolutivas, sendo observados nos HPVs do gênero *Gamma*, como HPV1 e HPV2, causadores de verrugas benignas e no gênero *Alpha*, incluem-se os HPVs 2, 3, 10 e 57. Os tipos do gênero *Beta*, especialmente os HPV5 e HPV8 são assintomáticos em indivíduos saudáveis, mas podem estar associados ao desenvolvimento de carcinoma de células escamosas não melanoma (SCC), em pacientes com epidermodisplasia verruciforme hereditária, ou em indivíduos

imunossuprimidos, devido à coinfecção com HIV, ou uso prolongado de imunossupressores em pacientes transplantados (DOOBAR et al., 2012, WANG; RODEN, 2013a).

Os HPVs de mucosa do gênero *Alphapapillomavirus*, dependendo do seu potencial oncogênico podem ser classificados em grupos de alto e baixo risco. Os HPVs de baixo risco, como os tipos HPV6 e HPV11 são os mais prevalentes e ambos causam 96-100% das verrugas anogenitais (*Condyloma acuminata*) e quase todos os casos de Papilomatose respiratória recorrente (PRR), assim como uma proporção de neoplasias intraepiteliais de baixo grau cervical (NIC 1), vulval (NIV 1), vaginal (NIVa 1) e anal (NIA 1) (FORMAN et al., 2012; STANLEY, 2012a; WANG; RODEN, 2013a).

Os HPVs de alto risco oncogênico reconhecidos pela Organização Mundial da Saúde são os tipos HPV16, HPV18, HPV31, HPV33, HPV35, HPV39, HPV45, HPV51, HPV52, HPV56, HPV58 e HPV59 (BZHALAVA et al., 2013; DOOBAR et al., 2012). O HPV16 é o tipo mais prevalente, com mais de 50% dos casos associados ao câncer cervical (LI et al., 2011) e ambos HPV16 e HPV18 estão presentes em aproximadamente 70% dos casos mundiais de neoplasias cervicais (CASTELLSAGUÉ et al., 2009). Os tipos HPV31, HPV33 e HPV45 são os próximos mais prevalentes, com 12% dos casos de neoplasia cervical (ROMANOWSKI, 2011). A infecção com múltiplos tipos de HPVs é comum, mas não está associada com o aumento do risco de progressão. Os tipos HPV18 e HPV45 são os mais frequentemente detectados em adenocarcinomas, que podem desenvolver lesões mais agressivas (CUBIE, 2013). Os HPV26, HPV53, HPV66, HPV68, HPV73 e HPV82 (MUNÕZ et al., 2006).

A incidência de infecção por HPV é elevada em jovens, logo após o início da atividade sexual e o risco de infecção aumenta com o número de parceiros sexuais. A prevalência da infecção do HPV nas mulheres varia com a idade, apresentando um pico na adolescência, declinando progressivamente no decorrer dos anos. Em vários países pode ser observada em mulheres ao redor dos 50-55 anos de idade, a ocorrência de um novo pico de infecção, que pode estar associado à reativação da latência viral ou à incidência de nova infecção (CUBIE, 2013; STANLEY, 2010). Nos homens, a aquisição da infecção ocorre na adolescência e a prevalência mantém-se constante nas décadas subsequentes (STANLEY, 2014).

A principal via de transmissão viral é a via sexual, embora o vírus possa ser transmitido através do contato direto com a pele e mucosas. O HPV pode ficar incubado por um período de 3 - 4 semanas, meses ou anos, sendo que a duração do período de latência pode estar relacionada com a carga viral recebida (STANLEY, 2010).

Aparentemente também podem ocorrer outras vias de infecção, como a transmissão vertical do HPV materno-fetal, durante a gestação ou durante o nascimento (ARMBRUSTER-MORAES et al.,1994; CUBIE, 2013). Apesar da incidência rara, pode ocorrer na criança o desenvolvimento de Papilomatose respiratória recorrente (PRR), afetando aproximadamente 4 em cada 100 mil crianças, sendo caracterizada pela presença de verrugas na laringe, necessitando de repetidas intervenções cirúrgicas, para evitar a obstrução respiratória (CUBIE, 2013; STANLEY, 2010).

Estudos recentes sobre vias alternativas de infecção por HPV demonstram a interação do HPV na forma de HPV16 VLPL1L2, com leucócitos do sangue periférico humano e células-tronco precursoras da linhagem hematopoiética do líquido amniótico humano (KAVATI et al., 2012; PALUMBO et al., 2008; SZULCZEWSKI et al., 2009).

### 1.2 Epidemiologia

Aproximadamente 20% dos carcinomas globais são atribuídos a uma infecção persistente e mais comumente por um vírus (FRAZER; LEGGATT; MATTAROLLO, 2011). Estima-se que o HPV esteja envolvido em 5,2% de todos os casos de cânceres mundiais (MA et al., 2012; STANLEY, 2012a). Representa o terceiro tipo de neoplasia mais comum, após o câncer de mama e câncer colorretal, além de ser a quarta principal causa de morte por neoplasia em mulheres no mundo (ROMANOWSKY, 2011). Atualmente representa um importante desafio para a saúde pública mundial, principalmente nos países em desenvolvimento, onde ocorrem mais de 85% de todos os casos de mortes por neoplasia cervical e estima-se para o ano de 2020, o aumento para 90% dos casos (MA et al., 2012). A incidência é cerca de duas vezes maior em países menos desenvolvidos, em relação aos países mais desenvolvidos (INCA, 2012). Nesses países, os casos de neoplasia cervical são detectados em estágios muito avançados, devido a diversas dificuldades na implantação de programas de rastreamento do câncer cervical, tornando-se uma das principais causas de morte em mulheres. No Brasil, a principal estratégia de rastreamento do câncer de colo do útero, recomendada pelo Ministério da Saúde é o exame citopatológico, o teste de Papanicolau, para mulheres de 25 a 64 anos de idade (INCA, 2012).

De acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA), ocorreu um avanço nos programas de prevenção do câncer de colo do útero, pois na década de 90 cerca de 70% dos casos diagnosticados eram de doenças invasivas, considerado o estágio mais agressivo, atualmente 44% dos casos correspondem às lesões precursoras de câncer (INCA, 2014).

Em todo o mundo estima-se que 530 mil mulheres são diagnosticadas com neoplasia cervical, com a ocorrência de 265 mil mortes por ano (ROMANOWSKI, 2011).

No Brasil, segundo o INCA o câncer de colo do útero é o terceiro tipo mais incidente na população feminina, após o câncer de mama e de cólon e reto. Em 2014 foi estimado a ocorrência de 15.590 mil novos casos de neoplasia cervical, com um risco estimado de 15,3 casos a cada 100 mil mulheres, e destas cerca de 5 mil mulheres vão a óbito. Nas regiões brasileiras, a maior incidência de casos ocorre na região Norte, com 23,57 casos em 100 mil mulheres, sem considerar os casos de tumores de pele não melanomas, os mais frequentes na região. Nas regiões Centro-Oeste e Nordeste ocorrem respectivamente 22,19 casos e 18,79 casos em 100 mil mulheres, sendo o segundo tipo de neoplasia mais frequente. Na região Sudeste são registrados 10,15/100 mil e no Sul do país 15,87 casos em 100 mil mulheres. Em relação à mortalidade feminina, as diferenças regionais são expressas de forma semelhante (INCA, 2014).

Mais de 99% dos casos de neoplasia cervical contêm o DNA do HPV, embora a proporção associada a determinados tipos de HPV de alto risco seja diferente em diversos países, e mostrem variações demográfica, étnica e socioeconômica (CUBIE, 2013).

Estudos baseados em uma metanálise, envolvendo 194 pesquisas e um milhão de mulheres mostram a prevalência global de 11,7% do HPV, em mulheres com citologia normal, mas com infecção de HPV cervical detectável. Existe uma variação global considerável entre os países, com elevadas prevalências encontradas na África Subsaariana (24%), Leste Europeu (21%) e América Latina (14%). Particularmente, elevadas prevalências são encontradas na África oriental e Caribe com índices acima de 30% (BRUNI et al., 2010; FORMAN et al., 2012). Segundo a WHO, os países europeus, Estados Unidos, Canadá, Japão e Austrália apresentam as menores taxas de incidência (WHO, 2014).

Mundialmente ocorre uma relação entre a prevalência do HPV e a idade, ocorrendo índices máximos em indivíduos mais jovens, com idade abaixo de 25 anos, e um declínio em idades mais avançadas. Na Europa e América do Norte, as taxas de prevalências são muito elevadas em jovens, abaixo de 25 anos, tornando-se muito baixas em mulheres acima de 45 anos, porém em alguns países da Américas Latina e Caribe ocorre um declínio, seguido de um aumento em mulheres com idade igual ou superior a 45 anos (BRUNI et al., 2010; FORMAN et al., 2012).

Estudos mostram que os cinco tipos mais prevalentes mundialmente são os HPV16 (3,2%), HPV18 (1,4%), HPV52 (0,9%), HPV31 (0,8%) e HPV58 (0,7%). A prevalência para os outros tipos de HPV é de 0,6% ou menos, incluindo o HPV45 (0,5%, que juntos com

HPV16 e 18 são comuns em câncer invasivo), assim como HPV6 (0,5%) e HPV11 (0,2%), ambos são os genótipos associados a verrugas genitais (BRUNI et al., 2010; FORMAN et al., 2012).

### 1.3 Genoma viral e proteínas do Papilomavírus

Os Papilomavírus são vírus não envelopados, com capsídeo de simetria icosaédrica de 50-60 nm de diâmetro (WANG; RODEN, 2013a).

O genoma do Papilomavírus consiste de DNA circular de dupla fita, de aproximadamente 8 kb, representado por três regiões: uma região reguladora (LCR ou URR), uma região precoce (E-Early) e uma região tardia (L- Late), conforme mostra a Figura 1 (DE VILLIERS et al., 2004; DOOBAR, 2006).



Figura 1 - Organização genômica do HPV16 de alto risco. Genoma do HPV (7904 pb) contendo a região reguladora (LCR) e 8 genes, que codificam as proteínas do capsídeo viral (L) e proteínas não estruturais (E). LCR contém sítios de ligação para fatores de transcrição celular (SP1) e para proteínas E1 e E2. Promotores: PE (precoce) e PL (tardio). Sítios de poliadenilação precoce (PAE), e poliadenilação tardia (PAL). Fonte: Adaptado de Doobar et al., 2012.

A região reguladora LCR (*long control region*) ou URR (*upstream regulatory region*), localizada entre as regiões L1 e E6, contém elementos reguladores necessários para replicação e transcrição do DNA viral (CAMPO; RODEN, 2010; DE VILLIERS et al., 2004).

A região precoce (E- Early) com aproximadamente 2/3 do genoma viral, contém os genes que codificam seis proteínas precoces e não estruturais: E1, E2, E4, E5, E6 e E7 (CAMPO; RODEN, 2010). As primeiras proteínas expressas são E1 e E2, necessárias para a replicação e transcrição celular. A proteína E1 é uma helicase requerida para a replicação e amplificação do vírus epissomal no núcleo dos queratinócitos infectados (BERGVALL; MELENDY; ARCHAMBAULT, 2013). A proteína E2 é multifuncional e essencial no ciclo de vida viral, estando envolvida na regulação da expressão de todos os outros genes virais. Contribui no processo de replicação viral, auxiliando no recrutamento de E1 para replicação do DNA original (CAMPO; RODEN, 2010). E2 está envolvida na regressão transcricional de E6 e E7, sendo a sua perda indutora de desregulação na expressão de E6 e E7 (MA et al., 2012).

O gene E3 ainda não é conhecido, talvez não produza proteína. A proteína E4 é uma proteína intermediária expressa durante a fase de replicação do DNA viral, estando envolvida na reorganização do citoesqueleto (CAMPO; RODEN, 2010).

A proteína viral E5 interage com receptores do fator de crescimento (EGF), estimulando a proliferação celular. As proteínas E6 e E7 são importantes na transformação e malignidade celular, regulando o ciclo viral na célula. As oncoproteínas E6 e E7 associam-se aos fatores supressores de tumor presentes na célula, onde a E6 associa-se a níveis celulares de p53 e a E7 atua na proteína retinoblastoma (pRB) (KAVATI, 2012; MA et al., 2012).

A região tardia (L- Late) com aproximadamente 1/3 do genoma viral, contém os genes que codificam duas proteínas estruturais do capsídeo viral a L1 e L2 (CAMPO; RODEN, 2010).

A proteína L1 é a principal proteína do capsídeo viral, com massa molecular de aproximadamente 55 kDa, com a capacidade de se autoestruturar espontaneamente em partículas semelhantes a vírus (VLPs) (BUCK; DAY; TRUS, 2013). Essas VLPs são estruturas semelhantes ao HPV, do ponto de vista morfológico e antigênico, desprovidas de material genético, sendo a base das vacinas atuais descritas em vários estudos anteriores (AIRES et al., 2006; BAZAN et al., 2009; CIANCIARULLO et al., 2009, 2010; KAVATI et al., 2014; MARIGLIANI et al., 2012, 2013; SZULCZEWSKI, 2009). As VLPs são imunógenos potentes devido ao reconhecimento pelas células B dos epítopos da superfície icosaédrica (BUCK; DAY; TRUS, 2013).

O capsídeo viral é composto por 360 cópias de proteínas L1, organizadas em 72 capsômeros ou pentâmeros, e cada capsômero é constituído por cinco proteínas L1, formando uma estrutura de simetria icosaédrica, conforme mostra a Figura 2 (SCHILLER; MÜLLER, 2015).



**Figura 2 -** Representação esquemática de formação da VLP do HPV. Fonte: Adaptado de Schiller e Müller, 2015.

A região C- terminal da proteína L1 é bastante elaborada, estando disposta como braços que se estendem em direção à superfície externa do capsômero, ligando-se aos capsômeros adjacentes por pontes dissulfeto. No HPV16, as pontes dissulfetos entre os capsômeros envolvem a cisteína (Cys 175) em L1 do capsômero invadido e a cisteína (Cys 428) da região C- terminal da L1 do capsômero invasor. Essas duas cisteínas presentes na proteína L1 são conservadas em todos os tipos conhecidos de papilomavírus. A presença de pontes dissulfeto parece ser essencial para a estabilidade do vírion (Figura 3) (BUCK; DAY; TRUS, 2013).



Figura 3 - Estrutura do capsômero L1. (A) Cada monômero L1 está identificado por uma coloração diferente. (B) Capsômero contendo alças (*loops*) internas nas proteínas L1 que interagem com as cisteínas. Fonte: Adaptado de Buck, Day e Trus, 2013.

A conformação e a localização dos epítopos são críticos para a produção de anticorpos neutralizantes. Sugere-se que a superfície do capsômero é composta por "loops" estruturais e muitos anticorpos monoclonais são capazes de neutralizar a infectividade de várias espécies de papilomavírus, ligando em uma ou várias superfícies desses *loops*, que contêm epítopos específicos (Figura 4) (LOWE et al., 2008). A superfície dos *loops* é fracamente conservada, mesmo entre os tipos de papilomavírus intimamente relacionados, isto é, provavelmente resultante da pressão seletiva para que os papilomavírus acumulem mutações, para prevenir ligações neutralizantes obtidas em infecções anteriores (BUCK; DAY; TRUS, 2013).



Figura 4 - Modelo tridimensional dos pentâmeros de L1. (A) Visão lateral. (B) Visão frontal. (C) base do pentâmero de L1. A sequência da proteína L1 entre genótipos (rosa) é altamente variável na face externa do pentâmero, enquanto a estrutura interna do pentâmero é altamente conservada (azul). Os anticorpos neutralizantes anti-L1 interagem com as superfícies expostas das alças (*loops*) das proteínas L1. Fonte: Adaptado de Frazer, Leggatt e Mattarollo, 2011.

Estudos com anticorpos monoclonais sugerem que os epítopos compostos de alças (*loops*) FG e HI são importantes para neutralização do HPV16, enquanto as alças BC, DE e HI são importantes na neutralização do HPV6 e 11. Como exemplo o anticorpo monoclonal do HPV16 (mAb) H16.V5 interage com o epítopo conformacional na superfície da alça FG (aminoácido 262-291 L1) e com menor intensidade à alça HI (aa 348-360), enquanto o anticorpo H16.E70 reconhece o resíduo 282 na alça FG. O anticorpo monoclonal Camvir-1 reconhece o epítopo linear, que corresponde aos resíduos 204 - 210 do HPV16 L1, o qual está localizado entre as alças EF e FG, conforme mostra a figura 5 (KIM; LIM; KWAG, 2012; LOWE et al., 2008).



Figura 5 - Esquema do monômero de HPV16 L1 e a reatividade dos anticorpos com a HPV16VLP. (A) Alças estruturais indicadas como: B-C, C-D, D-E, E-F, F-G e H-I. (B) Resíduos da proteína HPV16L1 reconhecidos pelos anticorpos Camvir-1, H16.V5 e H16.E70 são mostrados graficamente em boxes: alças da face exposta do capsídeo (preto), alça interna (branco), alça localizada parcialmente no lado externo do capsídeo (cinza). A numeração indica os aminoácidos a partir da região N terminal Fonte: Adaptado de Kim, Lim e Kwag, 2012; Modis, Trus e Harrison, 2002.

O capsídeo viral também contém a proteína L2, secundária do capsídeo, contendo menos que 500 aminoácidos que correspondem a uma massa molecular de aproximadamente 55 kDa. No entanto, a análise de SDS-PAGE, a L2 aparentemente apresenta uma massa molar de 64-78 kDa e a razão desse fenômeno ainda não está esclarecida (WANG; RODEN, 2013a). O número de moléculas da proteína L2 no capsídeo viral não está completamente definido, no entanto sugere-se que esteja entre 12 a 72 proteínas L2 por capsídeo (BUCK et al., 2008; WANG; RODEN, 2013a). Estudos recentes comparando a estrutura de HPV16 L1 e HPV16 L1L2, utilizando reconstrução 3D computadorizada revela que a porção de L2 está localizada

no interior do lúmen do capsômero, favorecendo a existência de 72 moléculas de L2 por capsídeo viral (Figura 6) (BUCK et al., 2008).



Figura 6 - Reconstrução 3D computadorizada do capsídeo HPV16. (A) Capsídeo HPV16 proteína L1. (B) Capsídeo HPV16 contendo a proteína L1 em azul e a proteína L2 em coloração vermelha. Fonte: Adaptado de Buck et al., 2008.

O resíduo de L1 que medeia à interação com L2 no capsídeo permanece ainda não definido, embora estudos envolvendo a cristalografia da estrutura de VLPL1 sugerirem que L2 deve interagir com L1 pela região N-terminal (BUCK et al., 2008; LOWE et al., 2008).

A proteína secundária L2 possui várias regiões que podem ser alvos de anticorpos neutralizantes (NIETO et al., 2012). Uma das quais se localiza na posição do aminoácido 17-36, que consiste no maior epítopo de neutralização cruzada, representando um atraente antígeno candidato para uma vacinação amplamente protetora. A sequência amino- terminal da proteína L2 de diferentes tipos de HPV revela-se altamente conservada, incluindo uma região contendo dois resíduos altamente conservados de cisteínas (C22 e C28), presentes em todos os tipos de papilomavírus reconhecida e neutralizada pelo anticorpo monoclonal RG-1 (Figura 7) (WANG; RODEN, 2013a).



Figura 7 - Sequência conservada da região aa 17-36, presente em diferentes tipos de HPV contendo duas cisteínas (C22 e C28), importantes na infecção e reconhecimento pelo anticorpo monoclonal RG-1. Fonte: Adaptado de Wang e Roden, 2013a.

A proteína L2 não forma VLP, mas pode ser incorporada quando coexpressa com L1. As VLPs L1 e L2 purificadas são incapazes de formar complexos *in vitro* sem coexpressão, sugerindo que a interação ocorre antes da montagem do capsídeo ou ocorra em nível de capsômero, na inserção de L2 para formar VLP L1L2 (WANG; RODEN, 2013a).

### 1.4 Ciclo viral

O HPV é um patógeno exclusivamente intraepitelial e o ciclo de infecção viral é totalmente dependente da diferenciação dos queratinócitos. O vírus infecta os queratinócitos das células basais do epitélio cervical e outros tecidos epiteliais, através de microlesões, enquanto que a expressão dos genes virais com a produção de proteínas e montagem do vírus ocorre apenas nas camadas mais diferenciadas do epitélio celular, com os vírions dos papilomavírus liberados para o ambiente, através do processo de descamação.

O processo de entrada do HPV é extremamente lento em comparação com outros tipos virais (PALMER et al., 2009). O receptor para a entrada do vírus nas células epiteliais ainda não foi identificado. No entanto, um receptor nos queratinócitos, alfa 6 beta integrina foi considerado candidato a receptor do HPV, assim como os receptores do fator de crescimento, entre outros tem sido implicados neste processo (DOOBAR et al., 2012; EVANDER et al., 1997). Estudos recentes demonstraram a internalização de VLPs L1L2 do HPV16, por

leucócitos e células-tronco do líquido amniótico humano, utilizando a via do receptor de transferrina, CD71 (KAVATI et al., 2012; PALUMBO et al., 2008; SZULCZEWSKI et al., 2009).

Vários estudos sobre o mecanismo de infecção do HPV têm sugerido que o HPV ligase à membrana basal da superfície celular, através da interação de baixa afinidade, com o heparan sulfato dos proteoglicanos- HSPG. Ocorre uma mudança conformacional no capsídeo viral devido à clivagem por uma protease celular, a furina, causando a exposição específica da região N-terminal da proteína L2. Após a clivagem, ocorre uma diminuição na afinidade do capsídeo pela HSPG, permitindo a interação do vírion com o receptor secundário, ainda desconhecido em queratinócitos. Em seguida, ocorre a internalização dos vírions nas células basais e a liberação do genoma viral para o núcleo, conforme mostra a figura 8 (DOOBAR et al., 2012; FRAZER; LEGGATT; MATTAROLLO, 2011; WANG; RODEN, 2013b).



Figura 8 - Modelo de infecção do HPV no epitélio cervical. Acesso do vírus à membrana basal ocorrendo a ligação ao heparan sulfato dos proteoglicanos (HSPG). A interação do HPV com a proteína da célula hospedeira conduz a uma mudança conformacional na superfície do capsídeo, expondo transientemente a proteína secundária L2. Ocorre a clivagem da L2 pela furina e a internalização do vírion na célula basal para o início da infecção. Fonte: Adaptado de Wang e Roden, 2013b.

Após a infecção das células basais, ocorre a liberação do genoma viral para o núcleo da célula infectada. Inicialmente o genoma viral epissomal expressa as proteínas precoces para manutenção do queratinócito em estado proliferativo. Como o queratinócito permanece em processo de divisão e diferenciação, o genoma viral mantém um baixo número de cópias. Acredita-se que ocorra um ciclo de replicação do DNA viral, independente do ciclo celular, com a amplificação de 50-100 cópias virais por célula. A célula infectada migra para o compartimento suprabasal, onde ocorre a fase de manutenção do plasmídeo na forma epissomal, quando o número de cópias se mantém constante e a expressão do gene viral é mínima. Nesta fase do ciclo viral do HPV de alto risco, ocorre a expressão dos potentes oncogenes E6 e E7 em nível baixo. Quando os queratinócitos infectados migram para o compartimento de diferenciação celular, ocorre a interrupção da divisão celular, com o início da fase produtiva viral e a reprogramação das células suprabasais pelo vírus, ocorrendo a amplificação do número de cópias do genoma viral, para milhares de cópias por célula. No caso de ocorrer a malignidade celular, ocorre a perda no controle da expressão de E6 e E7 e a expressão do gene na célula torna-se desregulada (CAMPO; RODEN, 2010; STANLEY, 2012a).

As células com o DNA viral amplificado migram para as camadas mais elevadas do epitélio estratificado, na camada granular, onde os genes virais expressam as proteínas do capsídeo L1 e L2, ocorrendo o início da encapsulação e maturação do genoma viral. Os vírus descendentes são montados e liberados com a descamação das células, nas camadas mais superficiais do epitélio (Figura 9).

Durante a fase inicial da infecção, o HPV permanece na forma epissomal no núcleo celular, mas a integração do DNA viral de alto risco ao genoma da célula infectada é uma etapa importante para a progressão neoplásica na cérvice cervical (STANLEY, 2012a). A integração geralmente causa a deleção de alguns genes precoces E2, E4, E5 e genes tardios L1 e L2. Como a E2 é uma repressora da transcrição dos genes E6 e E7, a perda de E2 permite a desregulação dos oncogenes E6 e E7. As oncoproteínas E6 e E7 inativam e degradam o supressor tumoral p53 e a retinoblastoma (Rb), respectivamente, e ambos os efeitos conduzem à desregulação do ciclo celular, instabilidade genômica e descontrole da proliferação celular (MA et al., 2012; WANG; RODEN, 2013b).



Figura 9 - Ciclo de vida do HPV de alto risco no epitélio cervical. As células infectadas na camada basal formam o reservatório da infecção, com o genoma viral mantido em número baixo de cópias e após a divisão celular, as células filhas migram para a superfície epitelial. Durante a migração são desencadeados diversos eventos em diferentes estágios. Nas lesões causadas pelo HPV de alto risco, as células das camadas mais baixas expressam os oncogenes E6 e E7, sendo estimuladas a entrar em mitose (células e núcleos vermelhos). Na camada intermediária, ocorre a amplificação do genoma viral nas células e nestas ocorre a expressão da proteína viral E4 (células em verde, com núcleo em vermelho). Nas camadas epiteliais superiores, as células são liberadas para o exterior e nas células E4- positivas, as proteínas L1 e L2 são produzidas, permitindo a montagem do genoma viral amplificado e liberação das células infectadas. PAE: Sítio de poliadenilação da região precoce, PAL: sítio de poliadenilação da região tardia, PE: promotor precoce ou p97, PL: promotor tardio ou p670. Fonte: Adaptado de Doobar et al., 2012.

#### 1.5 Estratégias de evasão viral

O HPV é um vírus extremamente eficaz, apresentando mecanismos de evasão do sistema imunológico do hospedeiro, uma vez que não provoca viremia, morte celular ou inflamação. O vírus infecta os queratinócitos basais, que amadurecem nas células epiteliais e, em seguida, novos vírus são liberados ao mesmo tempo em que ocorre a morte natural das células. Dessa forma o sistema imune não reconhece o evento como um sinal de perigo (CULP; CHRISTENSEN, 2004). Todo o ciclo viral ocorre acima da camada basal, sem ocasionar diretamente a lise celular. As células do sistema imune, que buscam por patógenos abaixo da membrana basal, desconhecem a infecção que ocorre nas camadas superiores do epitélio, particularmente na expressão das proteínas tardias (CAMPO; RODEN, 2010). Além disso, os papilomavírus não ativam as células de Langerhans, essenciais para captar, processar

e apresentar os antígenos aos linfócitos T, desregulando a superfície do complexo de histocompatibilidade principal de classe I (MHC), o maior apresentador de antígenos a células T e interferem na sinalização de interferons (IFN) do tipo I. Juntos esses eventos ajudam a explicar a ausência de inflamação local, a fraca resposta imune e a longa persistência do papiloma, mesmo em indivíduos imunocompetentes (CAMPO; RODEN, 2010).

#### 1.6 Vacinas contra o HPV

A imunização preventiva aliada a programas de rastreamento de lesões pré-cancerosas através do exame citopatológico, integram as principais estratégias preventivas para a redução da incidência e mortalidade consequente da neoplasia cervical (INCA, 2012).

A WHO reconhece a relevância do câncer cervical e outras doenças envolvidas com o HPV como problema de saúde pública global e recomenda a inclusão da vacina contra o HPV no programa nacional de imunização (WHO, 2014). O reconhecimento da relação entre a infecção cervical persistente e o HPV de alto risco permitiu o desenvolvimento da vacina profilática contra o papilomavírus humano, sendo a primeira vacina desenvolvida especificamente para prevenção de um câncer humano (FRAZER; LEGGATT; MATTAROLLO, 2011).

O desenvolvimento das vacinas surgiu com a noção de que a proteína L1 do capsídeo do papilomavírus era capaz de se autoestruturar em partículas semelhantes a vírus (VLP), quando expressa em um sistema eucariótico heterólogo. A imunização de espécies específicas com a VLP L1 protegeu contra o desafio viral em coelho (cotton rabbit papillomavirus - CRPV), boi (bovino papillomavirus - BPV) e cão (canine oral papillomavirus - COPV) (INGLIS; SHAW; KOENIG, 2006). Vários estudos demonstraram que as VLPs L1 contendo epítopos conformacionais são requeridas para a indução de anticorpos neutralizantes. Os resultados obtidos nesses modelos animais foram fundamentais para o desenvolvimento das vacinas do HPV (INGLIS; SHAW; KOENIG, 2006; STANLEY; PINTO; TRIMBLE, 2012c).

As vacinas contra o HPV foram licenciadas em mais de 100 países (ROMANOWSKI, 2011) e os programas de vacinação têm sido adotados em vários deles. Segundo a OMS em agosto de 2014, cerca de 60 países (30%) incluíram a vacina contra o HPV em seus programas de vacinação para meninas e em alguns países como: Estados Unidos, Austrália e Canadá, a vacina quadrivalente foi recomendada também para os meninos. Em 2007, a Austrália foi o primeiro país a incluir a vacina no seu calendário vacinal (OMS, 2014; ROMANOWSKI, 2011; STANLEY, 2014). No Brasil, a vacina contra o HPV foi incorporada

no calendário do Programa Nacional de Imunizações (PNI) do Ministério da Saúde, em 1º de julho de 2013, para imunização de meninas entre 9 a 13 anos de idade. Desde março de 2014, a vacina quadrivalente contra o HPV está disponível na rede pública, para aplicação em crianças de 10 e 11 anos de idade (CIANCIARULLO, 2014; INCA, 2013). Com a transferência de tecnologia da MSD, o Instituto Butantan passará a produzí-las futuramente.

Atualmente existem duas vacinas profiláticas contra o HPV aprovadas pela OMS e ANVISA no Brasil: a quadrivalente Gardasil® da Merck (Merck & Co., Whitehouse Station, NJ, Estados Unidos), aprovada pela Food and Drug Administration (FDA, Estados Unidos), em junho de 2006. A Gardasil<sup>®</sup> contém VLPs dos genótipos de alto risco HPV16 e HPV18 associadas ao câncer cervical, assim como os tipos de baixo risco HPV6 e HPV11, envolvidos nas verrugas anogenitais. A vacina é produzida em Saccharomyces cerevisae e composta de 20 µg de cada proteína L1 de HPV16 e HPV18; e 40 µg de cada proteína L1 de HPV6 e HPV11, contendo adjuvante de sulfato de hidroxifosfato de alumínio. A vacina bivalente Cervarix<sup>®</sup> da GSK (GlaxoSmithKline, Londres, Inglaterra) e aprovada em outubro de 2009. A vacina é produzida em células de inseto (Trichoplusia ni Hi-5) e contém VLPs para os dois tipos de alto risco HPV16 e HPV18. Cada dose de 0,5 mL da vacina contém 20 µg de proteínas L1 de HPV16 e HPV18 e o adjuvante ASO<sub>4</sub>, contendo o hidróxido de alumínio e o MPL-A (3-Odesacyl-4'-monofosforil lipídeo A (toll like receptor - TLR-4 agonista). As vacinas são administradas em três doses: 0, 1 e 6 meses para a vacina bivalente e 0, 2 e 6 meses para a vacina quadrivalente. A vacinação é recomendável na pré-adolescência, antes da infecção natural (ROMANOWSKI, 2011; SCHILLER; MÜLLER, 2015).

Em dezembro de 2013, a Agência de Medicina Européia aprovou o protocolo de duas doses da vacina bivalente para meninas de 9 a 14 anos, e três doses para meninas acima de 14 anos. Em vários países a alteração do protocolo para duas doses das vacinas licenciadas, especialmente para adolescentes de 9 a 13 anos, encontra-se em andamento, e provavelmente se torne uma norma futura (SCHILLER; MÜLLER, 2015).

Atualmente as vacinas disponíveis Gardasil<sup>®</sup> e Cervarix<sup>®</sup> são baseadas em partículas semelhantes a vírus (VLPs) da proteína principal L1 do capsídeo viral e capazes de induzir anticorpos neutralizantes contra a proteína do capsídeo viral L1. As vacinas apresentam efetiva proteção contra os tipos específicos que compõem a vacina, com limitada proteção cruzada contra outros tipos de HPV. No caso da vacina Cervarix<sup>®</sup>, a imunização mostra elevada proteção contra HPV31 e HPV45, os quais estão relacionados aos tipos HPV16 e HPV18 respectivamente (JAGU et al., 2010).

A vacina contra o HPV é uma promissora ferramenta no combate ao câncer cervical, sendo altamente imunogênica e induzindo um título geométrico médio de anticorpos de 80 a 100 vezes mais elevado, daquele observado na infecção natural (HARPER et al., 2004). Após a infecção natural, os níveis de anticorpos neutralizantes induzidos podem ser muito baixos no soro e mucosa cervical, que podem ser insuficientes para proteção contra novas infecções (HO et al., 2002; ROMANOWSKI, 2011). Apesar da baixa resposta imunogênica na infecção natural, os homens induzem resposta imune robusta para vacinas de VLP com virtualmente 100% de soroconversão (STANLEY, 2014). A imunização de homens com a vacina quadrivalente Gardasil<sup>®</sup> tem-se mostrado eficaz contra doenças e infecções em homens heterossexuais, prevenindo as verrugas genitais dos tipos HPVs 6 e 11 e nos homossexuais as neoplasias intraepiteliais anais 6/11/16/18 (STANLEY, 2014). Ambas as vacinas têm sido associadas a uma diminuição substancial de infecção, verrugas anogenitais e doenças cervicais (SCHILLER; MÜLLER, 2015).

As vacinas de HPV são capazes de induzir resposta humoral, produzindo anticorpos neutralizantes contra a proteína do capsídeo viral L1, podendo bloquear a entrada do vírus (STANLEY, 2008). Em indivíduos vacinados, os anticorpos representam a primeira linha de defesa e estão presentes no momento da exposição. Estes anticorpos não são produzidos localmente, mas transudados ou exsudados do soro para as secreções cérvice-vaginal, como mostra a figura 10 (SCHWARZ; OBERDAN, 2008).



Figura 10 - Processo de transudação e exsudação dos anticorpos para o local de infecção do HPV. (A) Processo de transudação envolve a transferência de IgG intravascular para o trato genital. (B) Processo de exsudação com o escape lento do fluído dos vasos danificados para os locais das microlesões. Fonte: Adaptado de Schwarz e Oberdan, 2008. As VLPs são altamente imunogênicas, induzindo potentes respostas de anticorpos na ausência de adjuvantes, devido à sua capacidade de ativação de ambas as respostas imunes: inata e adaptativa (STANLEY, 2012a). A Organização Mundial da Saúde (OMS) considera que os anticorpos neutralizantes fornecem a maior base de proteção das vacinas baseadas em VLPs em humanos (ROMANOWSKI, 2011).

Para as vacinas de HPV apresentarem uma proteção mais duradoura, elas devem fornecer uma produção sustentada de anticorpos, juntamente com a reposição de células B de memória, que podem repor o pool de células secretoras de anticorpos (ROMANOWSKI, 2011; SCHWARZ; OBERDAN, 2008).

Estudos com outras vacinas evidenciam a correlação entre a frequência de células B de memória do antígeno-específico e níveis de anticorpos do antígeno-específico (ROMANOWSKI, 2011; SCHWARZ; OBERDAN, 2008). É provável que as células T *helper* auxiliem na produção de anticorpos e na manutenção de células B de memória, mas existem evidências de que as vacinas de VLPs podem induzir resposta de anticorpos, que são independentes da atividade de células T (ROMANOWSKI, 2011).

O estudo envolvendo as vacinas contra o HPV fornecem evidências de que a vacina bivalente Cervarix<sup>®</sup> induz uma resposta imune mais elevada, do que a vacina quadrivalente Gardasil<sup>®</sup> (ROMANOWSKI, 2011). Provavelmente, a resposta imune elevada e os altos níveis de anticorpos neutralizantes obtidos na vacina bivalente Cervarix<sup>®</sup> sejam devido ao sistema de adjuvante ASO<sub>4</sub> utilizado na formulação da vacina em comparação com a vacina Gardasil<sup>®</sup>, formulada somente com o alumínio. Existem evidências de que a proteção cruzada contra tipos que não compõem a vacina pode ser mais elevada na vacina bivalente Cervarix<sup>®</sup> (JAGU et al., 2010; ROMANOWSKI, 2011).

Em dezembro de 2014, a primeira vacina de VLPs HPVs de segunda geração, a vacina nonavalente da Merck foi licenciada para uso pela Food and Drug Administration (FDA). A vacina é produzida em *Saccharomyces cerevisae* e contém cinco tipos a mais de VLPs dos HPVs 31, 33, 45, 52 e 58, do que a vacina quadrivalente (HPV 6, 11, 16 e 18). O acréscimo desses cinco tipos oncogênicos na vacina nonavalente irá proporcionar um aumento na proteção de aproximadamente 70 para 90% nos casos de câncer cervical (SCHILLER; MÜLLER, 2015). A utilização desses outros tipos oncogênicos pode aumentar muito o custo e a complexidade de produção da vacina (MUNÕZ et al., 2003; NIETO et al., 2012).

Nos últimos anos, diversos grupos de pesquisa têm se dedicado ao desenvolvimento de vacinas profiláticas e terapêuticas contra o HPV e os cânceres associados ao vírus.
As vacinas terapêuticas contra o HPV em desenvolvimento visam o controle e a regressão das lesões induzidas pelo HPV. As vacinas atuais Gardasil<sup>®</sup> e Cervarix<sup>®</sup>, baseadas em VLPs de L1 são utilizadas na profilaxia e apresentam pouco ou nenhum efeito terapêutico no tratamento de infecções existentes (WANG; RODEN, 2013b). Diversas estratégias vacinais estão sendo realizadas, com o desenvolvimento de vacinas terapêuticas baseadas em peptídeos, proteínas recombinantes, DNA e células dendríticas.

Nas vacinas terapêuticas ocorre a indução de respostas citotóxicas, principalmente das células T CD8<sup>+</sup> contra proteínas precoces, principalmente as oncoproteínas E6 e E7, expressas nas células do carcinoma cervical (SCHILLER; MÜLLER, 2015). Atualmente não existem vacinas terapêuticas disponíveis no mercado, embora algumas indicações de eficácia clínica fossem relatadas, como exemplo a vacina baseada em peptídeo longo utilizada na neoplasia intraepitelial vulvar, com a indução de uma resposta imune celular e a regressão de lesões (KENTER et al., 2009), no entanto nenhuma abordagem comprovou eficácia terapêuticas não foram bem sucedidas, devido a vários fatores como: limitação no modelo animal; indução de resposta imune celular moderada em ensaios clínicos; incerteza sobre quais tipos de respostas são necessárias para a remoção, direcionamento das lesões de alto grau e cânceres para evasão imune, e assim como tráfego inconsistente da resposta imune celular sistêmica para as lesões intraepiteliais periféricas (SCHILLER; MÜLLER, 2015).

Várias estratégias estão sendo desenvolvidas para a próxima geração de vacinas profiláticas, visando amplo espectro de proteção contra diversos tipos de HPV de alto risco e a redução de custos. Nestas abordagens incluem-se as vacinas de VLP multivalentes, capsômeros de L1, vacinas de L2, entre outras (Figura 11). Nas vacinas multivalentes ocorre a inclusão de mais tipos de HPVs, para uma proteção mais ampla contra a maioria dos genótipos de alto risco oncogênico. No entanto, muitos parâmetros não estão esclarecidos quanto à dose necessária para cada tipo de HPV, influência da resposta imune de um tipo de VLP sobre o outro, tempo de duração da proteção e custo da vacina multivalente em relação às vacinas comerciais.

Os capsômeros de L1 representam uma alternativa de baixo custo em relação às vacinas licenciadas do HPV. Podem ser produzidos em *Escherichia coli* alcançando elevados níveis e induzindo altos títulos de anticorpos neutralizantes. Atualmente a Xiamen Innovax Biotech, obteve elevadas produções de VLPs L1 dos HPVs 16 e 18 em *E. coli*, usando L1 mutante e está realizando o estudo de eficácia fase 3 (JAGU et al., 2010; SCHILLER; MÜLLER, 2015).

Uma estratégia de aprimoramento às vacinas de VLP L1, seria a utilização da proteína L2 como antígeno vacinal, que contém sequências altamente conservadas entre diferentes tipos de HPV, com potencial para induzir uma proteção mais ampla contra os diversos tipos de HPVs (MA et al., 2012).

A proteína L2, a secundária do capsídeo viral, não induz resposta de anticorpos neutralizantes em infecções naturais. No entanto, a imunização com a proteína L2 gera anticorpos neutralizantes, que são protetores contra o desafio viral em bovinos e coelhos. Estes anticorpos possuem ampla neutralização cruzada contra os HPVs mucoso e cutâneo, sugerindo que a L2 pode constituir uma vacina pan - HPV (STANLEY; PINTO; TRIMBLE, 2012c). Estudos mostram que as imunogenicidades em animais, com o amino (N) - terminal do peptídeo L2, induziram anticorpos neutralizantes, demonstrando proteção contra o desafio com tipos cognatos de papilomavirus *in vivo*, (EMBERS et al., 2002), neutralização cruzada com tipos heterólogos *in vitro* (PASTRANA et al., 2005; RODEN et al., 2000), e proteção oral com HPV16 L2 (N-terminal aa 1-124), expresso na superfície do *Lactobacillus casei*, induziu anticorpos neutralizantes significantes contra HPV16, assim como mostrou a capacidade de neutralização cruzada contra pseudovírus HPV18, 45 e 58 (MA et al., 2012).

Apesar das vantagens, as vacinas de L2 apresentam baixa imunogenicidade, não induzindo um nível elevado de anticorpos neutralizantes em comparação com as vacinas de VLPs de L1, sendo o maior desafio no uso da proteína L2 como antígeno vacinal (JAGU et al., 2010). Várias estratégias estão sendo desenvolvidas para aumentar a imunogenicidade da proteína L2, como o estudo da interação de L2 com adjuvantes como o alumínio em combinação com agonista TLR4 (*toll like receptor*), como o monophosphoril lipid A (MPLA) (MA et al., 2012; NIETO et al., 2012). Outra tentativa foi o desenvolvimento de VLP derivada do bacteriófago PP7, contendo o epítopo de L2 exposto no PP7, induzindo alta imunogenicidade com elevado título de anticorpos neutralizantes e demonstrando proteção contra uma variedade de subtipos de HPV (MA et al., 2012; TUMBAN et al., 2011).

Uma abordagem para melhorar a neutralização cruzada da vacina L2 foi a geração de sequências de regiões sintéticas do HPV L2 ou a produção de antígeno L2 polimérico. Um estudo recente utilizando uma proteína concatenada L2 multitipo fusionada, contendo epítopos de L2 derivados de vários tipos de HPVs 1, 5, 6, 16, 18, geraram elevados títulos de anticorpos neutralizantes para HPVs heterólogos e proteção contra o desafio cérvico-vaginal, com pseudovírus do HPV16 (JAGU et al., 2009). A proteína multimérica L2 fusionada,

combinada com a vacina Cervarix ou capsômeros do HPV16 L1, também mostrou ampla proteção contra a infecção do HPV (JAGU et al., 2010; MA et al., 2012).

As vantagens da imunogenicidade da L1 e a ampla proteção cruzada mediada pela L2 podem ser combinadas e formar a VLP L1L2 quimérica. As vacinas VLP quiméricas combinadas na forma de L1L2, com a L2 conjugada geneticamente ou quimicamente com a L1 e inserida na superfície da L1, podem gerar mais respostas imunogênicas, e protetoras contra múltiplos genótipos de HPV. A vacina quimérica VLP L1 com peptídeo L2 em sua superfície, demonstrou a indução de anticorpos neutralizantes HPV16, assim como elicitou anticorpos capazes de neutralização cruzada contra os pseudovírus 18, 31, 52 e 58. A imunização com a vacina quimérica VLP L1L2 do HPV16, induziu em coelhos e camundongos, anticorpos capazes de neutralização cruzada para os tipos de alto e baixo risco oncogênico do HPV16 (MA et al., 2012; SCHELLENBACHER; RODEN; KIRNBAUER, 2009). A inclusão de L2 como vacina representa uma promissora direção para a próxima geração de vacinas profiláticas, com a indução de amplo espectro de anticorpos neutralizantes contra o HPV.



Figura 11 - Representação gráfica das VLPs da Cervarix<sup>®</sup>, Gardasil<sup>®</sup> e vacinas profiláticas contra o HPV de futuras gerações, baseadas em proteínas do capsídeo L1 e/ou L2. (A) Cervarix<sup>®</sup>, formadas pelas VLPs de HPV16 e 18. (B) Gardasil<sup>®</sup>, compostas por VLPs HPV6, 11, 16 e 18. (C) VLPs multivalentes formadas por VLPs HPV6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58 – Gardasil 9<sup>®</sup>. (D) Vacina de capsômero L1. (E) Vacina quimérica VLPL1L2 com L2 na superfície. (F) Vacina de peptídeo L2. (G) Peptídeo L2 concatenado. (H) Peptídeo L2 exposto na superfície do bacteriófago. Fonte: Adaptado de Ma et al., 2012.

Em países em desenvolvimento, a neoplasia cervical constitui uma das principais causas de morbidade e mortalidade em mulheres. Representa uma doença de elevada relevância epidemiológica, com mais de 83% dos casos de cânceres cervicais diagnosticados, onde os programas de rastreamento são limitados ou inexistentes, além de 70% dos casos de neoplasias vaginais e 90% dos casos de cânceres anais, tornando-se essencial a busca de novas abordagens vacinais.

A pesquisa sobre a viabilidade deste sistema de expressão recombinante, baseado em células epiteliais humanas em suspensão, com a produção de partículas semelhantes ao capsídeo viral de HPV16 L1L2, assim como a avaliação do potencial vacinal em animais, contribuem para o desenvolvimento de uma estratégia vacinal alternativa, auxiliar no estudo e na prevenção das graves doenças desencadeadas por HPV, visando proporcionar um benefício à saúde pública.

# **2 OBJETIVOS**

# 2.1 Objetivo Geral

 Desenvolver a produção de VLPs L1L2 de HPV16 em culturas de células epiteliais humanas 293-F em suspensão e avaliar o potencial imunogênico em animais, visando o desenvolvimento de uma estratégia vacinal contra o Papilomavírus humano.

# 2.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver a metodologia para obtenção de VLPs L1L2 de HPV16, em culturas de células humanas 293-F em suspensão, utilizando o sistema de transfecção com vetores plasmideais, para expressão das proteínas do capsídeo viral L1 e L2;
- Analisar a expressão e localização das proteínas intracelulares HPV16 L1 e HPV16 L2; .
- Caracterizar as proteínas recombinantes L1 e L2 de HPV16;
- Purificar as proteínas heterólogas HPV16 L1L2 para a formulação vacinal;
- Induzir e avaliar a resposta imunológica da formulação vacinal VLPs L1L2 de HPV16 em modelo murino.

# **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

A realização deste projeto foi aprovada pela Comissão de Biossegurança Interna do Instituto Butantan (CIBio) e pela Comissão Técnica Nacional - CTNBio. Os procedimentos de cultivos celulares foram realizados em laboratório classificado no Nível de Biossegurança classe 2, NB-2 e as Boas Práticas Laboratoriais foram adotadas ao longo das atividades desenvolvidas nesta pesquisa. Os experimentos em animais foram realizados de acordo com os protocolos aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB), sob o registro de nº 923/12.

## 3.1 Cultivos celulares

### 3.1.1 Linhagem celular

 Freestyle<sup>™</sup>293-F (Invitrogen<sup>™</sup>, Carlsbad, Califórnia, Estados Unidos): Linhagem celular derivada da HEK 293, adaptada para o crescimento em suspensão (MANUAL INVITROGEN, 2007).

As células HEK 293 são provenientes de células embrionárias renais humanas (*Human Embryonic Kidney*), transformadas pelo DNA de adenovírus humano tipo 5 (Ad5) (GRAHAM et al., 1977).

### 3.1.2 Cultivo celular em suspensão

 Freestyle<sup>™</sup>293 Expression System (Invitrogen <sup>™</sup>, Carlsbad, Califórnia, Estados Unidos): Sistema de expressão 293, contendo o meio de expressão 293 livre de soro fetal bovino (FreeStyle<sup>™</sup>293 Expression Medium).

As células FreeStyle<sup>™</sup>293-F (293-F) foram cultivadas em suspensão na concentração de 3x10<sup>5</sup> células viáveis por mL, utilizando o meio de expressão 293 livre de soro, conforme recomendação do fabricante. As células em suspensão foram subcultivadas, quando a concentração celular atingiu 2-3 x10<sup>6</sup> células viáveis por mL, geralmente a cada 3-4 dias. Alíquotas da suspensão celular foram transferidas e homogeinizadas vigorosamente por 10-30 segundos, para separação dos agrupamentos celulares. A seguir, foram determinadas a concentração e viabilidade celular pelo método de exclusão de Azul de Tripan, através da

contagem em câmara de Neubauer e visualizadas ao microscópio invertido Leica DMIL. As células em suspensão foram mantidas a 37 °C, em atmosfera úmida com 5% de  $CO_2$ , sob agitação orbital de 120 rpm. As células em suspensão destinadas aos estoques celulares foram mantidas em criotubos, na concentração de 5-8 x 10<sup>6</sup> células por mL, contendo 90% de meio de expressão 293 livre de soro e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) e mantidos em tanque de nitrogênio líquido a -192 °C.

# 3.2 Vetores de expressão gênica

Os vetores de expressão gênica pUF3L1h e pUF3L2h humanizados utilizados nas clonagens, transfecções e cotransfecções foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Martin Müller (Forschungsschwerpunkt Angewandte Tumorvirologie, DKFZ - Heidelberg, Alemanha) (LEDER et al., 2001).

- pUF3L1h (#874): Vetor de expressão gênica com 5781 pares de bases, contendo o gene L1 do HPV16 (Figura 12A).
- pUF3L2h(#893): Vetor de 5685 pares de bases, contendo o gene L2 do HPV16 (Figura 12B).

Os vetores pUF3L1h e pUF3L2h humanizados (Figura 12) foram construídos sob regulação do promotor constitutivo do citomegalovírus humano (pCMV), expressando os respectivos genes L1 e L2 do HPV16. Contêm o gene de resistência a ampicilina e o gene repórter GFP (green fluorescent protein) (LEDER et al., 2001).



Figura 12 - Esquema dos vetores plasmideais. (A) Vetor pUF3L1h (#874) para expressão da proteína L1 de HPV16. (B) Vetor pUF3L2h (#893) para expressão da proteína L2 de HPV16.

### 3.2.1 Amplificação dos vetores plasmideais

### 3.2.1.1 Obtenção de bactérias competentes

*Escherichia coli* (*E. coli*) DH5a: linhagem que permite manipulações genéticas, utilizada na propagação e amplificação de DNAs plasmideais e clonagens de genes.

Para a preparação da *Escherichia coli* (*E.coli*) competente, foi utilizado o método descrito por Hanahan (HANAHAN, 1983). Esta linhagem foi gentilmente cedida pela Dra. Itamar Romano Garcia Ruiz, do Laboratório de Genética do Instituto Butantan. As bactérias *E.coli* DH5 $\alpha$  foram cultivadas em meio Luria-Broth (LB) composto por triptona a 1%, extrato de levedura a 0,5%, cloreto de sódio a 0,5% e incubadas a 37 °C, sob agitação de 250 rpm até a cultura atingir a D.O.<sub>600nm</sub> = 0,6. A seguir, as bactérias em suspensão foram centrifugadas a 5.000 x *g* a 4 °C, por 10 minutos. O pellet resultante foi ressuspenso em solução gelada de 0,1M CaCl<sub>2</sub> e incubado por 60 minutos no gelo. A suspensão foi centrifugada a 5.000 x g a 4 °C, por 10 minutos e o pellet de bactérias foi ressuspenso em 2 mL de solução gelada de 0,1M CaCl<sub>2</sub>. A suspensão de bactérias competentes foi aliquotada, contendo 10% de glicerol e armazenadas a -80 °C até o momento do uso.

A transformação de bactérias competentes foi baseada no método descrito por Sambrook (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Uma alíquota de 10  $\mu$ L do DNA plasmideal foi usada para transformar bactérias *E.coli* DH5 $\alpha$ , quimiocompetentes. A mistura de DNA e bactérias foi incubada por 30 minutos no gelo, submetida rapidamente ao choque térmico por 2 minutos a 42 °C e incubada novamente no gelo durante 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 350  $\mu$ L de meio LB líquido e a mistura incubada por 90 minutos a 37 °C. As bactérias transformadas foram plaqueadas em meio LB-ágar com 100  $\mu$ g/mL de ampicilina e incubadas a 37 °C, por 18 horas.

### 3.2.1.3 Seleção dos clones recombinantes e Extração de DNA plasmideal

Os clones positivos de *E.coli* DH5 $\alpha$ , resistentes à ampicilina foram selecionados e inoculados em 3 mL de meio LB líquido contendo 100 µg/mL de ampicilina a 37 °C, por 18 horas, sob agitação de 250 rpm. Cada cultura foi centrifugada a 12.000 x *g* por 30 segundos, o sobrenadante descartado e o precipitado bacteriano foi utilizado para purificação de DNA plasmideal usando o kit AxyPrep<sup>TM</sup> Plasmid Miniprep Kit (Axygen Biosciences, Union City, Califórnia, Estados Unidos), conforme as instruções do fabricante. A concentração do DNA purificado foi determinada pelo espectrofotometro Nanodrop<sup>TM</sup> 100 (ThermoScientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) e alíquotas de DNA plasmideal purificado foram armazenadas a -20 °C para uso posterior.

### 3.3 Transfecção celular

As transfecções e cotransfecções transientes em células Freestyle<sup>TM</sup>293-F foram realizadas por lipofecção, utilizando o reagente 293fectin<sup>TM</sup> (Invitrogen<sup>TM</sup>), conforme instruções do fabricante. As células em suspensão foram cultivadas um dia antes da transfecção, na concentração de 6,0 a  $7,0\times10^5$  células viáveis por mL em meio de expressão 293, livre de soro (Invitrogen<sup>TM</sup>). No dia da transfecção, as células em suspensão na concentração de  $3x10^7$  células foram mantidas em 28 mL de meio de expressão 293, em atmosfera úmida a  $37^{\circ}$  C e agitação orbital de 120 rpm. Para cada transfecção foram utilizados 30 µg de DNA plasmideal L1 e na cotransfecção foram utilizados 15 µg de DNA de L1 e 15 µg de DNA de L2. Em um tubo tipo Falcon foi preparada a solução de 30 µg de DNA

plasmideal para 1 mL de Opti-MEM<sup>®</sup>I (Invitrogen<sup>TM</sup>, Carlsbad, Califórnia, Estados Unidos). Em outro tubo foi realizada a diluição de 60  $\mu$ L do reagente de transfecção 293fectin<sup>TM</sup> (Invitrogen<sup>TM</sup>) em 1 mL de Opti-MEM<sup>®</sup> I, homogeneizado gentilmente e incubado a temperatura ambiente por 5 minutos. As duas soluções preparadas de DNA plasmideal e do reagente 293 fectin<sup>TM</sup> foram misturadas, colocando-se 1 mL de cada solução, homogeneizadas gentilmente e incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente. O volume de 2,0 mL da mistura de transfecção foi adicionado às células em suspensão mantidas em 28 mL de meio de expressão 293. As células em suspensão foram incubadas a 37 °C em atmosfera úmida, com 5% de CO<sub>2</sub> e agitação orbital de 120 rpm. As células 293-F transfectadas com os vetores pUF3L1h e cotransfectadas com ambos os vetores L1 e L2 foram coletadas em diferentes tempos variando de 6 a 72 horas pós-transfecção. Para a otimização da expressão das proteínas L1 e L2 foi realizada a cinética de expressão das proteínas recombinantes L1 e L2 do HPV16. Nas amostras transfectadas, cotransfectadas e não transfectadas foram realizados os ensaios utilizando a citometria de fluxo e microscopias: confocal a laser, epifluorescência e eletrônica de transmissão (MET).

### 3.4 Expressão das proteínas recombinantes L1 e L2

### 3.4.1 Microscopias Confocal e Epifluorescência

Para detecção de proteínas recombinantes L1 e L2 de HPV16, as células 293-F foram cultivadas e transfectadas conforme descrito nos itens 3.1.2 e 3.3, respectivamente. Após esta etapa, as células transfectadas foram lavadas com PBS pH 7,4 por 3 vezes e centrifugadas a 200 x g, por 5 minutos. As células foram incubadas em 1 mL de PBS pH 7,4 contendo 5% de albumina sérica bovina (BSA, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Saint Louis, Missori, Estados Unidos), durante 60 minutos e lavadas 3 vezes por 5 minutos cada. Após a centrifugação a 200 x g por 5 minutos, as células foram incubadas com os anticorpos primários: monoclonal anti-HPV16 L1 (Camvir-1, BD Pharmingen<sup>®</sup>, San Diego, Califórnia, Estados Unidos), e/ou policlonal anti-HPV16 L2 (11-200 aa), gentilmente cedido pelo Dr. Richard Roden, Departamento de Patologia, Universidade John Hopkins, Baltimore, Maryland, Estados Unidos. Os anticorpos foram diluídos a 1:150 e 1:100 respectivamente em PBS, contendo 0,01% de Tween 20 (Polyoxyethylenesorbitan monolaurate, Sigma Chemical, Saint Louis, Missori, Estados Unidos) e 0,5% BSA, durante 2 horas em temperatura ambiente. As células foram então lavadas com PBS entendo 1% BSA e incubadas com os respectivos anticorpos secundários

IgG de cabra anti-IgG de camundongo conjugado ao fluorocromo AlexaFluor<sup>®</sup> 488 (Molecular Probes<sup>TM</sup>, Carlsbad, Califórnia, Estados Unidos), para detecção de L1 e/ou IgG de cabra anti-IgG de coelho conjugado ao fluorocromo AlexaFluor<sup>®</sup> 633 (Molecular Probes<sup>TM</sup>, Carlsbad, Califórnia, Estados Unidos), para detecção de L2. Os anticorpos foram ambos diluídos 1:250 em PBS contendo 0,01% de Tween 20 e 1,5% BSA e incubados por 1 hora, a temperatura ambiente. Após a lavagem em PBS contendo 1% BSA, as células foram fixadas em lâminas pré-tratadas com poli-L-lisina (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>). As lamínulas foram montadas com 5 µL de Mowiol (EMD Biosciences, La Jolla, Califórnia, Estados Unidos), e as amostras mantidas protegidas da luz a 4 °C para análise em microscópio confocal a laser Zeiss LSM Meta laser scanning microscope (Zeiss, Alemanha), no Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan. Para a marcação dos ácidos nucléicos, após a fixação das células as lamínulas foram montadas em 10 µL de Vectashield<sup>®</sup> (4'-6-diamidino-2-fenilindol - DAPI, Vector laboratories, Burlingame, Califórnia, Estados Unidos) sobre lâminas histológicas e as amostras mantidas a 4 °C para análise ao microscópio de epifluorescência (Nikon Eclipse N*i*), no Laboratório de Genética do Instituto Butantan.

### 3.4.2 Citometria de Fluxo

Para a detecção de L1 e L2 produzidas pela linhagem 293-F por citometria de fluxo, as células foram cultivadas e transfectadas, conforme descrito nos itens 3.1.2 e 3.3, respectivamente. Após esta etapa, as células transfectadas foram lavadas com PBS pH 7,4 por 3 vezes e centrifugadas a 200 x g, por 5 minutos. As células foram incubadas em 1 mL de PBS pH 7,4 contendo 3% de BSA, e 0,05% de Tween 20, durante 60 minutos e lavadas com PBS pH 7,4. Após a centrifugação a 200 x g, por 5 minutos, as células foram incubadas com os anticorpos primários anti-HPV16L1 e/ou anti-HPV16L2, diluídos respectivamente a 1:150 e 1:100 em PBS, contendo 0,01% de Tween 20 e 0,5% BSA, por 60 minutos a temperatura ambiente. Após, foram lavadas e incubadas com os respectivos anticorpos secundários IgG de cabra anti-IgG de camundongo conjugado ao fluorocromo AlexaFluor<sup>®</sup> 488 (Molecular Probes<sup>TM</sup>) e IgG de cabra anti-IgG de coelho conjugado ao fluorocromo AlexaFluor<sup>®</sup> 633 (Molecular Probes<sup>TM</sup>) ambos diluídos 1:250 em PBS contendo 3% BSA, por 60 minutos a temperatura ambiente. As células foram novamente lavadas em PBS, contendo 3% de BSA e analisadas pelo citômetro de fluxo BD FACSCanto<sup>TM</sup> II utilizando o software BD FACS Diva (BD Biosciences, San Jose, Califórnia, Estados Unidos), no Laboratório de Imunoquímica do Instituto Butantan.

### 3.4.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As células 293-F não transfectadas foram cultivadas para análise morfológica normal destas células e também como controle negativo da expressão das proteínas L1 e L2 em MET, conforme descrito em trabalhos anteriores (CIANCIARULLO et al., 2007, 2009, 2010; MARIGLIANI et al., 2012). Essas células foram cultivadas sob as mesmas condições descritas anteriormente no item 3.1.2, quando foram então lavadas com PBS e centrifugadas a 200 x g, por 5 minutos. O precipitado celular foi lavado três vezes com PBS para remoção de resíduos de meio de cultura e debris celulares. A seguir, foram fixadas em solução tampão fosfato de sódio a 0,1M pH 7,2 contendo 3,5% de sacarose e 2,5% de glutaraldeído (Glutardialdehyde solution, Merck, Darmetadt, Hessen, Alemanha), incubadas por 1h a temperatura ambiente. As células foram lavadas três vezes com solução tampão fosfato de sódio a 0,1M pH 7,2 contendo 3,5% de sacarose e centrifugadas a 200 x g, por 5 minutos. Após a fixação com 1% de tetróxido de ósmio (Osmium tetroxide, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missori, Estados Unidos) no mesmo tampão fosfato de sódio, as células foram incubadas por 1h a temperatura ambiente em local protegido da luz e com agitação ocasional. Em seguida, foram lavadas com tampão fosfato contendo sacarose, seguido por duas lavagens com solução salina a 0,85% e uma vez com água destilada, por 10 minutos cada.

Para a contrastação dos ácidos nucléicos, as células foram incubadas com acetato de uranila aquoso a 2% por 2 h a temperatura ambiente, lavadas três vezes com água bidestilada por 5 minutos cada e desidratadas em uma série de etanol em concentrações de 30%, 50%, 70%, 95% por 15 minutos cada, etanol 100% por 30 minutos, 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 minutos cada, solução acetona-Epon 1:2 por 18 h a 4 °C. Após a incubação overnight foi realizada a embebição em resina Epon pura por 24 h, centrifugadas por 30 minutos a 1250 x g para substituição da resina Epon pura 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 ultramicrótomo 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 (Uranyl acetate, Polysciences Inc., Warrington, Pensilvânia, Estados Unidos) a 2% em solução aquosa. Após a secagem em temperatura ambiente, as amostras foram examinadas em MET Zeiss EM 109, operado a 80 kV, no Laboratório de Genética do Instituto Butantan. As imagens foram capturadas pela câmera Mega View III, software ITEM, Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Olympus, Alemanha.

#### 3.4.3.1 Imunocitoquímica ultraestrutural

# 3.4.3.1.1 Proteínas HPV16 L1 e HPV16 L2

Para a imunocitoquímica ultraestrutural foi utilizado o protocolo especial para o processamento de células para análise em microscopia eletrônica de transmissão. As células 293-F cotransfectadas foram coletadas em tubo tipo Falcon de 15 mL, centrifugadas a 200 x g por 5 minutos, lavadas duas vezes em PBS para remoção de resíduos de meio de cultura e debris celulares e uma vez em tampão fosfato de sódio a 0,1M pH 7,2. As células foram então fixadas em solução tampão fosfato de sódio a 0,1M pH 7,2 acrescidos de 3,5% de sacarose, 4% de paraformaldeído (paraformaldehyde, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missori, Estados Unidos) e 1% de glutaraldeído, incubadas por 2 h em temperatura ambiente. Em seguida as células foram lavadas duas vezes de 30 minutos cada, com solução tampão fosfato de sódio a 0,1M pH 7,2 acrescida de 3,5% de sacarose e lavadas duas vezes com PBS por 10 minutos. As células foram desidratadas utilizando uma série de etanol a 50%, 70% e 80% por 15 minutos cada. A pré-embebição foi feita em resina acrílica LR White (LR White resin, Electron Microscopy Sciences, Hatfiedt, Pensilvânia, Estados Unidos) e álcool 70% na proporção de 2:1, por 1 hora. A embebição foi feita em resina LR White a 100% por 1h, posteriormente a resina foi trocada por resina 100% e incubadas por 18 h. A seguir, a resina foi novamente trocada e mantida por 30 minutos e as amostras distribuídas 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 10 min. Os blocos foram cortados utilizando um ultramicrótomo 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, diluídos a 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 lavados quatro vezes com PBS contendo 1% de BSA, por 5 minutos cada.

A seguir, os cortes foram incubados com os anticorpos secundários anti-IgG camundongo (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>), e anti-IgG coelho (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>), complexados com partículas de ouro coloidal de 10 nm para detectar a proteína L1 e 15 nm para L2, diluídos 1:100 em PBS contendo 0,01% de Tween 20 e 1,5% BSA, durante 1 hora, em câmara úmida, a temperatura ambiente. A seguir os cortes foram lavados quatro vezes com salina contendo 1% de BSA, por 5 minutos cada e uma lavagem com água destilada em jatos suaves para remoção de partículas inespecíficas. Foi realizada a contrastação negativa com acetato de uranila a 2% em solução aquosa e após a secagem das amostras foram examinadas em MET Zeiss EM109, operado a 80 kV, no Laboratório de Genética, do Instituto Butantan. As imagens foram capturadas pela câmera Mega View III, software ITEM, Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Olympus, Alemanha.

#### 3.4.3.1.2 Análise de VLPs

Para o ensaio imunocitoquímico, 10 µl de amostras do lisado celular clarificado foram colocados em grades de níquel 300 mesh, revestidas com colódio a 2% em acetato de amila e carbono, durante 1 minuto a temperatura ambiente. A seguir, o excesso de amostra da grade de níquel foi removido com papel de filtro. As amostras foram incubadas com o anticorpo primário anti-HPV16 L1 e o anticorpo anti-HPV16 L2, diluídos 1:100 em PBS contendo 0,01% de Tween 20 e 0,5% BSA, durante 2 horas em câmara úmida a temperatura ambiente. Foram lavadas em PBS, antes da incubação com os anticorpos secundários IgG de cabra anti-IgG de camundongo e IgG de cabra anti- IgG de coelho (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>), complexados com partículas de ouro coloidal de 10 nm para detectar L1 e 15 nm para L2, diluídos 1:100 em PBS contendo 0,01% de Tween 20 e 1,5% BSA, durante 1 hora, em câmara úmida, a temperatura ambiente. A seguir, as grades contendo as amostras foram lavadas quatro vezes com salina contendo 1% de BSA, por 5 minutos cada e uma lavagem com água destilada em jatos suaves para remoção de partículas com ligações inespecíficas. Foi realizada a contrastação negativa com acetato de uranila a 2% em solução aquosa por 1 minuto e após a secagem das amostras a temperatura ambiente, foram examinadas em MET Zeiss EM 109, operado a 80 kV, no Laboratório de Genética, do Instituto Butantan. As imagens foram capturadas pela câmera Mega View III, software ITEM, Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Olympus, Alemanha.

#### 3.5 Obtenção do lisado celular clarificado

As células 293-F foram cultivadas e transfectadas conforme descrito nos itens 3.1.2 e 3.3, respectivamente. As células não transfectadas e cotransfectadas com os vetores L1 e L2 foram coletadas 48 horas pós-transfecção, lavadas em PBS pH 7,4 por 3 vezes e centrifugadas a 200 x g, por 10 minutos. O pellet celular obtido foi ressuspenso em solução tampão de lise celular, contendo inibidor de protease, Sigma Fast<sup>TM</sup> Protease Inhibitor Tablets (Sigma Aldrich<sup>TM</sup>, Saint Louis, Missori, Estados Unidos), conforme instruções do fabricante. A seguir, a suspensão de células foi lisada utilizando 5 ciclos de agitação em vórtex, seguida pela incubação em gelo por 1 minuto cada. Os lisados celulares foram clarificados por centrifugação a 500 x g, por 10 minutos e os lisados celulares clarificados foram armazenados a -20 °C até o momento da análise.

### 3.6 Purificação de proteínas HPV16 L1 e L2

#### 3.6.1 Precipitação com sulfato de amônio

Para purificar as proteínas HPV16 L1L2 intracelulares, as células cotransfectadas com os vetores L1 e L2 foram lisadas, conforme item 3.5.

O lisado celular clarificado HPV16 L1L2 foi precipitado com sulfato de amônio a 45%, homogeneizado a 4 °C por 30 minutos e centrifugado a 12.000 x g a 4 °C, por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspenso em 1 mL de PBS pH 7,2 estéril e dialisado com tampão fosfato pH 7,2 e 0,01 % de Tween 80 a 4 °C durante 72 horas, com trocas de tampão a cada 12 horas.

#### 3.6.2 Cromatografia de exclusão molecular

Após a diálise da amostra, foi realizada a cromatografia de exclusão molecular com a resina Sephacryl<sup>™</sup> 300-HR (Sigma-Aldrich<sup>™</sup>, Saint Louis, Missori, Estados Unidos), utilizando uma coluna de polipropileno de 10 mL (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missori, Estados Unidos) conectada a uma bomba peristáltica (PUMP P-50, Amersham Biosciences). A coluna cromatográfica foi manualmente empacotada no laboratório, com 3 ml de resina. Inicialmente, foi realizada a lavagem da resina com água destilada, para a retirada de solução preservativa. A seguir a coluna foi equilibrada com 5 volumes da coluna (5 VC), com a

solução de 10 mM de fosfato de sódio pH 7,2; 0,15M de NaCl e 0,01 % de Tween-80. O volume de 0,5 mL de lisado celular clarificado, com conteúdo proteico total determinado pelo método de BCA (ácido bicinconínico) foi aplicado na coluna pré-empacotada, com fluxo de 0,5 mL/minuto. As proteínas foram eluídas com a mesma solução de 10 mM de fosfato de sódio pH 7,2; 0,15M de NaCl e 0,01 % de Tween-80 e coletadas as frações de 0,25 mL de amostras em microtubos siliconizados. Após o término do processo, a coluna empacotada foi lavada com água destilada e mantida em solução de etanol 20% a 4 °C. As frações purificadas coletadas foram analisadas, quanto à concentração de proteínas, SDS-PAGE e Western-blotting.

#### 3.6.3 Cromatografia de afinidade

Outra condição de purificação das proteínas L1L2 foi realizada, utilizando a cromatografia de afinidade. As etapas de precipitação das proteínas com sulfato de amônio a 45% de saturação e a diálise foram realizadas de acordo com o item 3.6.1. No procedimento de purificação, foi utilizada a coluna de afinidade pré-empacotada HiTrap<sup>™</sup> Heparin HP (GE Healthcare, Uppsala, Suécia), acoplada a uma bomba peristáltica (PUMP P-50, Amersham Biosciences).

Inicialmente a coluna foi lavada com 5 VC de água destilada, para retirada da solução preservativa. Após esse período, a coluna foi equilibrada com 5 VC de solução tampão de fosfato de sódio pH 7,0 contendo 0,3 M NaCl e 0,01% Tween 80. O volume de 0,3 mL de amostra foi aplicado na coluna, com fluxo de 0,5 mL/minuto e a seguir, a coluna foi lavada com a solução tampão de fosfato de sódio pH 7,2 com 0,3 M NaCl e 0,01% Tween 80. As proteínas adsorvidas à resina foram eluídas em solução tampão de fosfato de sódio pH 7,2 contendo 1,0 M NaCl e 0,01% Tween 80, com um fluxo constante de 0,5 mL/minuto. As frações eluídas de 0,25 mL foram coletadas em microtubos siliconizados e a seguir, a coluna foi lavada com água destilada, mantida em álcool 20% e armazenada a 4 °C. As frações eluídas foram analisadas quanto à concentração de proteínas, SDS-PAGE e Western-blotting.

# 3.7 Dosagens de proteínas

Para a dosagem de proteínas durante os ensaios de purificação e caracterização foi utilizado o Kit "BCA - Protein assay Kit" (Pierce, Rockford, Illinois, Estados Unidos), baseado no método do ácido bicinconínico. A determinação foi realizada conforme instruções

do fabricante para microensaios, para detectar a concentração de 5 a 250  $\mu$ g/mL de proteína total. Em uma microplaca de 96 poços foram pipetados 25  $\mu$ L da amostra em teste, ou com o padrão de solução de BSA. A seguir, 200  $\mu$ L da mistura do reagente A e B foram adicionados em cada poço, sendo 50 partes do reagente A e 1 parte do reagente B. A microplaca foi incubada a 37 °C por 30 minutos e a leitura realizada a 570 nm em um leitor de placas (Multiskan Ex, Labsystems Uniscience), do Laboratório de Genética do Instituto Butantan. O conteúdo proteico foi calculado empregando-se o BSA como padrão.

### 3.8 Caracterização de proteínas L1 e L2

# 3.8.1 SDS-PAGE 10%

As amostras das frações purificadas, lisado celular clarificado L1L2 e as células 293-F não transfectadas foram analisadas em relação ao grau de pureza por eletroforese em gel de poliacrilamida, acrescido de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), método descrito por Laemmli (1970). A concentração do gel de separação utilizada foi de 10% de poliacrilamida. As amostras foram diluídas em tampão de amostra, contendo 0.0625 mM, Tris/HCl pH 6,8; 10% SDS, 0,02% azul de bromofenol, 20% glicerol e 2% β-mercaptoetanol, sob condição redutora e usado como padrão de massas moleculares, o BenchMark<sup>™</sup> ProteinLader, Invitrogen<sup>™</sup>. Após a corrida eletroforética, o gel foi corado pelo método de coloração de prata (BLUM; BEIER; GROSS, 1987).

#### 3.8.2 Western-blotting

Para a realização deste ensaio, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida SDS/PAGE a 10% em condições redutoras, como mencionado no item 3.8.1.

As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Trans-Blot Transfer Membrane, BioRad, Benicia, Califórnia, Estados Unidos). Para isso, os géis foram colocados sobre as membranas de nitrocelulose envoltas por folhas de papel de filtro e espuma, em uma cuba de transferência (Trans-Blot SD, BioRad, Benicia, Califórnia, Estados Unidos), com tampão de transferência, contendo glicina 250 mM, SDS 1% e metanol 20% em tampão Tris-HCL 25 mM, pH 8,3, sob amperagem de 400 mA, a 4 °C por 1 hora. A seguir, as membranas foram coradas com solução de Ponceau, para verificar a eficiência da transferência e para a

identificação das bandas do padrão de massas moleculares (BenchMark<sup>™</sup> Protein Lader, Invitrogen<sup>™</sup>).

As membranas contendo as proteínas foram bloqueadas com 0,05% PBS-T (Tween 20) contendo 5% de leite desnatado por 16 horas a 4 °C. Em seguida as membranas foram lavadas com 0,05% PBS-T (Tween 20) por 3 vezes de 10 minutos cada. As membranas foram incubadas com os anticorpos primários: para a proteína L1 foi usado o soro monoclonal anti-HPV16 L1 (Camvir-1), diluído 1:500 e para proteína L2, utilizado o soro policional anti-HPV16 L2 diluído 1:50 ou soro monoclonal HPV16 L2 (1-40 aa) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, Estados Unidos) diluído 1:10 em PBS-T com leite desnatado por 1 hora, a temperatura ambiente, sob agitação. As membranas foram lavadas três vezes em PBS-T, por 10 minutos cada, sob agitação e incubadas com os anticorpos secundários anti-IgG de camundongo (L1) e anti-IgG de coelho (L2), ambos conjugados à peroxidase e diluídos 1:500 em PBS-T com leite desnatado por 1 hora, a temperatura ambiente. As membranas foram novamente lavadas por três vezes de 10 minutos cada e reveladas com reagentes para detecção de peroxidase por quimioluminescência, utilizando o kit Novex® ECL HRP Chemiluminescent Substrate Reagent Kit (Invitrogen<sup>™</sup>). Em um ambiente escuro, as membranas foram expostas ao filme Amersham Hyperfilm<sup>™</sup> ECL (GE Healthcare, Hatfield, Hertfordshire, Reino Unido). Após a revelação do filme utilizando o revelador e fixador Dental Kodak, foi realizada a lavagem, secagem natural e digitalização com o scanner HP Scanjet G4050 e o software HP Photosmart Premier.

### 3.8.3 Imunogenicidade das VLPs L1L2

### 3.8.3.1 Imunização dos animais

Para avaliar a resposta imunológica induzida pelas VLPs L1L2 foram utilizados grupos de seis camundongos Balb/c, entre 6 a 8 semanas de idade, provenientes do Biotério Central do Instituto Butantan. Para os experimentos de imunização, foram preparadas as formulações vacinais utilizando 20 µg das proteínas eluídas (*pool*) da cromatografia de afinidade, e dialisadas em solução tamponada pH 7,4 contendo 0,3M NaCl e 0,01% Tween80. As amostras dialisadas foram diluídas em 250 µl de solução tamponada pH 7,4 contendo 200 µg de hidróxido de alumínio (AlOH<sub>3</sub>). Os animais foram imunizados por via subcutânea, com três doses de 250 µl das vacinas formuladas, distribuídas em um intervalo de 15 dias (0, 15 e 30 dias). Um grupo de animais foi vacinado com amostras de VLPs L1L2, contendo

hidróxido de alumínio como adjuvante. Um segundo grupo de animais foi imunizado com 20 µg de VLPs L1L2 sem adjuvante. Um grupo controle foi imunizado com solução fisiológica 0,85%. Duas semanas após a imunização com a terceira dose das respectivas preparações, foram realizadas as sangrias dos animais para a avaliação da produção de anticorpos. Antes da primeira imunização foram coletadas e armazenadas as amostras dos soros pré-imunes dos animais. Após as coletas individuais dos animais, os soros foram mantidos por 30 minutos a 37 °C, deixados pelo mesmo período a 8 °C, centrifugados e armazenados a -20 °C até a realização dos ensaios.

### 3.8.3.2 Titulação dos soros anti-HPV16 L1 e L2

A sorologia de anti-HPV16 L1 e anti-HPV16 L2 foi realizada pelo método de ELISA (Enzyme-linked Imunosorbent Assay) indireto. Microplacas descartáveis de 96 poços de fundo plano foram sensibilizadas com diferentes concentrações de proteínas HPV16 L1 ou HPV16 L2, diluídas em 100 µL de solução tampão carbonato a 100 mM, pH 9,6 e mantidas overnight a 4 °C, em câmara úmida. Os poços foram lavados com PBS-Tween20 a 0,05% (PBS-T) por três vezes e bloqueados com 200 µL BSA a 3% em PBS, por 2 horas a 37 °C. Após a lavagem da placa por três vezes com PBS-T, foram realizadas as diluições seriadas iniciadas a partir de 1:50, das amostras de soros controle e dos animais (pool) imunizados com HPV16 L1L2, na presença ou ausência de adjuvante, diluídas em 100 µL de PBS-BSA a 1%, adicionadas aos poços e incubadas por 2 horas a 37 °C, em câmara úmida. Após a lavagem com PBS-T, foi adicionado 100 µL do anticorpo IgG de cabra anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (Sigma Aldrich<sup>®</sup>) diluído 1/3000 e incubado por 1 hora a 37 °C. As placas foram lavadas e reveladas com 100 µL de solução tampão citrato-fosfato pH 5,0 contendo orto-fenilenodiamina (OPD) e água oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), por 15 minutos a temperatura ambiente e no escuro. A reação de revelação foi interrompida com 50 µL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 4,5 N e a leitura da absorbância foi realizada a 492 nm em um leitor de placas Multiskan Ex (Labsystems Uniscience) (AIRES et al., 2006; KARANAM et al., 2009; VAN DER BURG et al., 2001).

### **4 RESULTADOS**

#### 4.1 Avaliação do sistema de expressão em células em suspensão

### 4.1.1 Células 293-F

As células 293-F são derivadas da linhagem celular HEK 293, proveniente de uma linhagem permanente estabelecida de células embrionárias de rim humano, transformado pelo DNA de adenovírus humano tipo 5 (GRAHAM et al., 1977; HARRISON; GRAHAM; WILLIAMS, 1977). As células 293-F foram adaptadas para o crescimento em suspensão e em meio isento de soro fetal bovino. Estas células foram preparadas a partir de poucas passagens do banco de células mestre, derivadas de células parentais 293-F, que foram reclonadas em diluições limitantes. Os derivados clonais 293 das culturas foram mantidos isentos de soro fetal bovino, por apenas 30 - 35 passagens totais (MANUAL INVITROGEN, 2007).

A morfologia da célula 293-F controle, não transfectada, foi visualizada por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), utilizando o processamento convencional. A célula 293-F apresenta uma estrutura organizada, com as membranas organelares, plasmática e nuclear íntegras. No núcleo a eucromatina apresenta uma distribuição não uniforme, com áreas de coloração mais clara e o DNA menos condensado e ativamente transcrito. A região de heterocromatina apresenta-se com áreas de coloração intensa de DNA genômico, altamente condensado e transcricionalmente inativo. O nucléolo constituído por RNA, apresenta-se bastante desenvolvido e com morfologia bem definida, frequentemente visualizado em células metabolicamente ativas na produção das subunidades ribossômicas 40S e 60S, constituídas por RNA ribossômico (RNAr) e proteínas ribossomais importadas do citoplasma. Nestas células apresenta coloração bastante eletrondensa e na porção mais periférica é possível visualizar as subunidades ribossomais como pontos escuros dispersos por toda a matriz nuclear. No citoplasma vemos os ribossomos que em células de mamíferos possuem 80S, encontrados livres, associados entre si, formando polirribossomos e associados ao retículo endoplasmático rugoso. As demais organelas bem distribuídas e preservadas, como as mitocôndrias, retículo endoplasmático liso, complexo de Golgi, lisossomos e vacúolos, caracterizando uma célula com metabolismo bastante intenso (Figura 13).



Figura 13 - Micrografia eletrônica de corte ultrafino de célula 293-F não transfectada. Processada por protocolo convencional para MET e contrastada com acetato de uranila e citrato de chumbo. Núcleo (N), nucléolo (nu), citoplasma (C), mitocôndria (m). MET Zeiss EM109, operado em 80 kV. Aumento original: 3.000x.

# 4.1.2 Cultivo celular

As células 293-F cultivadas em suspensão em meio isento de soro fetal e sob agitação orbital, apresentaram elevada eficiência no crescimento celular. A figura 14 mostra o cultivo dessas células, apresentando alta concentração celular, permitindo o sub-cultivo a cada 3-4 dias. A viabilidade celular foi comprovada pela técnica de exclusão de Azul de Tripan, podendo ser observada a presença de células viáveis, transparentes e ausência de coloração azulada das células (Figura 14).



Figura 14 - Cultivo de células 293-F em suspensão em meio livre de soro fetal bovino. Visualização de células viáveis pelo Azul de Tripan. Microscópio invertido Leica DMIL. Aumento: 200x.

No cultivo de células 293-F normais, não transfectadas em meio livre de soro, pode ser observado elevado crescimento celular, com os núcleos corados em azul pelo DAPI e visualizados por microscopia de epifluorescência, conforme mostra a figura 15.



Figura 15 - Ensaio de Imunofluorescência de células 293-F não transfectadas (controle). Em (A) a marcação com DAPI, delimitando o núcleo (azul). Em (B) o contraste de fase das células. Microscópio Nikon Eclipse Ni. Aumento: 200x.

### 4.2 Expressão e localização da proteína L1 por Microscopia de Epifluorescência

As células 293-F transfectadas com o vetor pUF3/L1h foram analisadas por imunofluorescência indireta, utilizando anticorpo monoclonal anti-HPV16 L1 e anticorpo secundário IgG de cabra anti-IgG de camundongo conjugado ao fluorocromo AlexaFluor<sup>®</sup> 488. A figura 16 mostra a expressão intracelular da proteína L1 após 48 horas de transfecção, com a visualização das células 293-F transfectadas (verde).



Figura 16 - Ensaio de Imunofluorescência de células 293F transfectadas (verde) com os núcleos corados com DAPI (azul). Microscópio Nikon Eclipse N*i*. Aumento: 400x.

A figura 17 mostra as células 293-F transfectadas com o vetor L1, em amostras coletadas nos períodos de 6 h, 24 h, 48 h e 72 h pós-transfecção, observando-se em todos os tempos as proteínas L1 mais intensamente marcadas no núcleo celular, quando coradas com o DAPI e visualizadas ao Microscópio de Epifluorescência.



Figura 17 - Células 293-F transfectadas com vetor (pUF3/L1h) expressando a proteína L1 detectada por imunofluorescência indireta. A proteína L1 foi visualizada mais intensamente no núcleo celular por microscopia de epifluorescência. (A) Proteína L1 e anticorpo monoclonal anti-HPV16 L1 revelado por IgG de cabra anti-IgG de camundongo conjugado ao fluorocromo AlexaFluor<sup>®</sup> 488 (verde) e núcleos visualizados com DAPI em azul; (B) Proteína L1 em verde; (C) Núcleos celulares em azul. Microscópio Nikon Eclipse N*i*. Aumento: 400x.

### 4.3 Cinética da expressão e localização da proteína L1

Para avaliar a expressão da proteína recombinante L1 pelas células 293-F foram realizados os ensaios de imunofluorescência indireta, utilizando o anticorpo primário monoclonal anti-L1 de HPV16. A expressão intracelular da proteína heteróloga L1 foi demonstrada em todas as amostras coletadas nos tempos de 6 h, 24 h, 48 h e 72 h pós-transfecção celular, utilizando o anticorpo específico anti-HPV16 L1. Através da análise qualitativa foi possível observar que a maior expressão da proteína L1 foi verificada ao redor de 24 h após a transfecção celular. Na célula não transfectada utilizada como controle, não foi observada expressão da proteína L1. Na análise da localização intracelular foi possível

observar as imunomarcações de L1 localizadas no citoplasma e distribuídas pelo interior do núcleo celular (Figura 18).

A expressão da proteína recombinante HPV16 L1 foi avaliada por citometria de fluxo. A análise dos gráficos da porcentagem (%) de células expressando a proteína L1 e a média de fluorescência permite observar que a maior expressão da L1 ocorre ao redor de 24 h após a transfecção celular. Este resultado confirma a análise realizada em microscopia confocal.

A proteína recombinante L1 foi detectada pelo anticorpo monoclonal anti-HPV16 L1 e secundário IgG de cabra anti-IgG de camundongo conjugado ao fluorocromo AlexaFluor<sup>®</sup> 488. Para cada experimento foram realizadas leituras de 10.000 eventos e as porcentagens de células expressando a proteína L1 e as médias das intensidades de fluorescência de cada amostra foram utilizadas para a comparação da expressão da proteína L1, em diferentes tempos de amostragens.

As curvas da cinética de expressão celular mostraram que nos tempos de 6 h, 24 h, 48 h e 72 horas pós-transfecção, aproximadamente 83%, 78%, 71% e 57% das células expressaram a proteína L1, respectivamente, conforme mostra o gráfico 1A.

O perfil da curva cinética de emissão da fluorescência para L1 mostrou que no tempo de 24 h pós-transfecção ocorre o maior aumento de expressão da proteína L1, evidenciado pelo aumento do valor médio de intensidade da fluorescência, em comparação aos tempos de 6 h, 48 h e 72 h (Gráfico 1B).



Gráfico 1 - Cinética de expressão da proteína L1 em células 293-F por citometria de fluxo. Células 293-F transfectadas marcadas com o anticorpo anti-HPV16 L1 e reveladas com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado ao fluorocromo AlexaFluor<sup>®</sup> 488. (A) Resultados em porcentagens de células. (B) Resultados em médias de fluorescências.



Figura 18 - Cinética de expressão da proteína L1 em células 293-F transfectadas com o vetor (pUF3/L1h) por microscopia confocal. Células observadas em diferentes tempos de transfecção, variando de 6 h a 72 h. (A) Sobreposição das imagens B e C; (B) Proteína L1 + anticorpo monoclonal anti-HPV16 L1 revelado com IgG de cabra anti IgG de camundongo conjugado ao AlexaFluor<sup>®</sup> 488 (verde); (C) Canal de luz transmitida -DIC. Controle negativo - célula 293F. Aumento: Objetiva C-Apocromática 63x/1.4 Óleo. Barra: 10 μm.

### 4.4 Cinética de expressão das proteínas L1 e L2

Para avaliar a curva da cinética de expressão das proteínas L1 e L2 por microscopia confocal, as células 293-F foram cotransfectadas de forma transiente com ambos os vetores pUF3/L1h e pUF3/L2h. Após o período de 6 h, 12 h, 24 h, 36 h e 48 h pós-transfecção, as células foram analisadas por imunofluorescência indireta, utilizando os respectivos anticorpos primários, monoclonal anti-HPV16 L1 e policlonal anti-HPV16 L2. Foi observada a expressão das proteínas L1 e L2 em todas as amostras analisadas e a maior expressão de ambas ocorre ao redor de 48 horas pós-transfecção. A análise da localização dessas proteínas permitiu visualizar a expressão intracelular das proteínas L1 (verde) e L2 (vermelho) distribuídas no citoplasma e núcleo celular (Figura 19).

O gráfico 2A mostra a curva de expressão das células para ambas as proteínas, L1 e L2 por citometria de fluxo, sendo possível observar que nos tempos de 12 h (78%), 24 h (85%) e 36 h (87%) pós-transfecção ocorre um aumento gradual na expressão das células e em 48 h (79%) há uma ligeira queda na expressão intracelular.

O gráfico 2B mostra a análise da curva de intensidade de fluorescência para a proteína L1 (linha azul), evidenciado pelo aumento do valor médio de intensidade de fluorescência. Pode ser observado um aumento gradual nos valores de fluorescência até atingir 48 horas póstransfecção.

O perfil da curva de intensidade de fluorescência para a proteína L2 (linha vermelha) demonstra que a fluorescência das células transfectadas em 48 horas foi superior, em comparação com outros tempos de cotransfecção (6 h, 12 h, 24 h e 36 h).

As análises comparativas de expressão das proteínas L1 e L2, baseadas nas curvas de expressão das células e das intensidades de fluorescência, mostram que o tempo de otimização dessas proteínas ocorre em 48 horas pós-transfecção, apesar do porcentual de células expressando as proteínas ser menor em comparação aos outros tempos (79%). Os experimentos posteriores foram realizados com o tempo de 48 h pós-cotransfecção das células 293-F, para a expressão das proteínas HPV16 L1 e HPV16 L2.



Gráfico 2 - Cinética de expressão das proteínas L1 e L2 em células 293-F, por citometria de fluxo. Células 293-F cotransfectadas marcadas para L1 com o anticorpo monoclonal anti-HPV16 L1 e revelada com AlexaFluor<sup>®</sup> 488 anti-IgG e a proteína L2 com anticorpo policional anti-HPV16 L2 revelado com AlexaFluor<sup>®</sup> 633 anti-IgG. (A) Porcentagens de células. (B) Médias de fluorescências.



Figura 19 - Cinética de expressão das proteínas L1 e L2 em células 293-F cotransfectadas com os vetores (pUF3/L1h) e (pUF3/L2h). Células observadas em diferentes tempos de cotransfecção, variando de 6 h a 48 h. (A) Sobreposição das imagens B e C; (B) Proteína L1 e anticorpo monoclonal anti-HPV16 L1 revelado com IgG de cabra anti-IgG de camundongo conjugado ao fluorocromo AlexaFluor<sup>®</sup> 488 (verde); (C) Proteína L2 e anticorpo policlonal anti-HPV16 L2 revelado com IgG de cabra anti-IgG de coelho conjugado ao fluorocromo AlexaFluor<sup>®</sup> 633 (vermelho); (D) Canal de luz transmitida - DIC. Aumento: Objetiva C-Apocromática 63x/1.4 Óleo. Barra: 10 μm.

Em células 293-F, utilizadas como controles, não foram encontradas imunomarcações para L1 e L2, conforme mostra a figura 20.



Figura 20 - Célula 293-F utilizada como controle, visualizada por microscopia confocal. (A) Canal de luz transmitida (DIC), (B) Imunofluorescência. (C) Sobreposição das imagens A e B. Aumento: Objetiva C-Apocromática 63x/1.4 Óleo. Barra: 10 μm.

# 4.5 Expressão e localização das proteínas L1 e L2 por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A expressão das proteínas L1 e L2 de HPV16 foi confirmada por imunocitoquímica ultraestrutural utilizando MET. As células 293-F cotransfectadas com ambos os vetores L1 e L2 foram imunomarcadas com os anticorpos primários anti-L1 do HPV16 (Camvir-1) e anti-L2, e com anticorpos secundários conjugados a partículas de ouro coloidal de 10 nm e 15 nm, respectivamente. As imunomarcações específicas com ouro coloidal das proteínas L1 e L2 podem ser visualizadas em toda célula, localizando-se no interior do núcleo, nucléolo e dispersas no citoplasma das células 293-F cotransfectadas (Figuras 21 e 22).



Figura 21 - Imunocitoquímica ultraestrutural. Célula 293-F cotransfectada e imunomarcada para L1 com partículas de 10 nm (seta azul) e L2 com partículas de 15 nm (seta vermelha) no núcleo (N), nucléolo (nu) e citoplasma (C). Aumento original 10.000x. Barra: 2µm.



Figura 22 - Imunocitoquímica ultraestrutural. Célula 293-F cotransfectada e imunomarcada para L1 com partículas de 10 nm (seta azul) e L2 com partículas de 15 nm (seta vermelha) no núcleo (N) e citoplasma (C). Aumento original: 17.000x. Barra: 1μm. Para avaliação da presença de proteínas L1, L2 e VLP, o lisado celular clarificado foi imunomarcado com ambos os anticorpos primários anti-L1 e anti-L2, seguido pela marcação com anticorpo secundário conjugado a partículas de ouro coloidal de 10 nm e 15 nm, respectivamente. A análise por MET permitiu observar a formação de agregados proteicos, indicativo de autoestruturação para formar as partículas semelhantes a vírus (VLPs), com tamanhos variando de 20 nm a 55 nm de diâmetro. Também foi possível observar a presença de VLPs imunomarcadas para proteínas L1 e L2 (Figura 23).



Figura 23 - Lisado celular clarificado HPV16 L1L2. (A) VLPs imunomarcadas com proteína L1 (seta azul) e L2 (seta vermelha). Tamanho aproximado das partículas em formação (setas amarelas): 20 nm. (B) Formação de VLP (seta amarela), tamanho de 55 nm. Aumento original: (A) 30.000x, (B) 60.000x. Barras: (A) 100 nm. (B) 50 nm.

#### 4.6 Purificação de proteínas HPV16 L1L2

No processo de purificação das proteínas L1 e L2 foram utilizados os lisados celulares clarificados de proteínas HPV16 L1 e L2, obtidos a partir de células 293-F cotransfectadas com os vetores para L1 (pUF3L1h) e L2 (pUF3L2h). Neste protocolo, o extrato celular HPV16 L1L2 foi lisado, clarificado e a seguir, precipitado com sulfato de amônio para a

retirada dos contaminantes, seguido pela diálise antes da purificação por cromatografias de exclusão molecular ou afinidade, conforme mostra a figura 24.



Figura 24 - Fluxograma das etapas de purificação de proteínas HPV16 L1L2.

# 4.6.1 Cromatografia de exclusão molecular

Para a purificação das proteínas por cromatografia de exclusão molecular foram realizadas várias tentativas de purificação, no primeiro ensaio foram coletadas 10 amostras dos eluídos (dados não apresentados), com o pico da purificação ocorrendo ao redor de 1/3 do volume da coluna, estando este resultado de acordo com o estudo realizado por Buck e Thompson (BUCK; THOMPSON, 2007). Dessa forma, nas outras tentativas de purificação foram analisadas somente as amostras coletadas neste intervalo de eluição.

A concentração de proteína total do lisado celular clarificado HPV16 L1L2 e das frações purificadas da cromatografia foram quantificadas pelo método de BCA. Para o lisado celular clarificado HPV16 L1L2, a concentração de proteína total obtida foi de 3,46 mg/mL. A quantificação da fração eluída 1 da cromatografia de heparina foi correspondente a 1,88 mg/mL, a fração eluída 2 apresentou a concentração de 955 µg/mL e a fração 3 foi de 551,7 µg de proteína total por mL. O rendimento da proteína purificada na metodologia de exclusão molecular foi de 48,9%.

#### 4.6.1.2 SDS-PAGE 10%

O grau de pureza das amostras do lisado celular clarificado HPV16 L1L2 e das frações eluídas da cromatografia de exclusão molecular foram analisados por SDS-PAGE 10% em condições redutoras e os resultados estão apresentados na figura 25.

O perfil eletroforético do lisado celular clarificado apresentou uma banda de aproximadamente 55 kDa, massa molecular semelhante à proteína L1. Foi observada a presença de uma proteína ao redor de 72 kDa semelhante à massa molecular da proteína L2, além de outras bandas com peso molecular ao redor de 50 kDa, 60 kDa e 100 kDa (Figura 25, canaleta 2).

O perfil eletroforético da fração eluída da cromatografia apresentou bandas de massas molares ao redor de 50 kDa, 60 kDa, 72 kDa, 120 kDa e 140 kDa (Figura 25, canaleta 3).

Na fração eluída 2 foi visualizada bandas de massas moleculares ao redor de 50 kDa e 72 kDa (Figura 25, canaleta 4). Na fração eluída 3 foi observada a presença de bandas de aproximadamente 50 kDa e 72 kDa (Figura 25, canaleta 5).



Figura 25 - SDS-PAGE 10% - Análise eletroforética do lisado celular clarificado e as frações eluídas da cromatografia de exclusão molecular. Canaletas: 1 - Padrão de massa molecular (10 kDa a 220 kDa). 2 - Lisado celular clarificado de células 293-F transfectada com os vetores para proteínas L1 e L2; 3 - L1L2 purificada (fração 1); 4 - L1L2 purificada (fração 3).

#### 4.6.1.3 Western-blotting

A expressão intracelular das proteínas L1 e L2 do HPV16 foram analisadas por Western-blotting. Na análise da expressão da proteína heteróloga L1 foi utilizado o anticorpo monoclonal específico anti-L1(Camvir-1) do HPV16. As análises do lisado celular clarificado do HPV16 L1L2 e das frações eluídas 1, 2 e 3 da cromatografia de exclusão molecular, estão apresentadas na figura 26.

No lisado celular clarificado HPV16 L1L2 foi reconhecida uma proteína de massa molecular de aproximadamente 55 kDa, semelhante à massa molar da proteína L1 (Figura 25, canaleta 3). No entanto, o lisado de células 293-F não transfectadas, utilizado como controle negativo, não apresentou nenhuma proteína semelhante à proteína L1, reconhecida pelo anticorpo anti-HPV16 L1 (Figura 26, canaleta 2).

As frações 1, 2 e 3 purificadas apresentaram uma proteína específica ao redor de 55 kDa, reconhecida pelo anticorpo monoclonal anti-HPV16 L1, semelhante ao monômero da proteína L1 (Figura 26, canaletas 4, 5,6), descritos anteriormente e referenciados pelo grupo.

As análises dos resultados de Western-blotting do lisado celular clarificado e das frações eluídas da cromatografia de exclusão molecular mostraram que as proteínas L1, em ambas as amostras, foram expressas e reconhecidas pelo anticorpo monoclonal HPV16 L1.



Figura 26 - Western-blotting do lisado celular clarificado HPV16 L1L2 e das frações purificadas para a proteína HPV16 L1. Canaletas: 1 - Padrão de massa molecular (10 kDa a 220 kDa); 2 - Célula 293-F não transfectada (controle negativo); 3 - Lisado celular clarificado HPV16 L1L2; 4 - Fração eluída 1 da cromatografia de exclusão molecular; 5 - Fração eluída 2; 6 - Fração eluída 3.

A análise da expressão intracelular da proteína HPV16 L2 foi realizada por Westernblotting, utilizando anticorpo policional anti-HPV16 L2.

O lisado celular clarificado e as frações da cromatografia de exclusão molecular estão na figura 27. No lisado celular clarificado do HPV16 L1L2 foi observada uma banda de massa molecular de aproximadamente 72 kDa, semelhante à massa molar da proteína L2, que foi reconhecida pelo anticorpo policional anti-HPV16 L2.

As bandas imunorreativas de massas molares ao redor de 40 kDa, 50 kDa, 60 kDa, 90 kDa e 100 kDa também foram reconhecidas pelo anticorpo policional HPV16 L2 (Figura 27, canaleta 2A). No lisado de células 293-F não transfectadas, utilizado como controle negativo,

foram detectadas duas bandas de aproximadamente 50 kDa e 60 kDa (Figura 27, canaleta 3A).

Nas frações purificadas da cromatografia, a fração eluída 1 apresentou uma proteína com massa molar ao redor de 72 kDa, reconhecida pelo anticorpo anti-HPV16 L2, além de outras bandas ao redor de 60 kDa, 90 kDa e 100 kDa (Figura 27, canaleta 2B).

Nas frações eluídas 2 e 3, ambas apresentaram proteínas de aproximadamente 60 kDa e 72 kDa, reconhecidas pelo anticorpo anti-HPV16 L2 (Figura 27, canaletas 3B e 4B respectivamente). Uma proteína inespecífica de massa molar ao redor de 60 kDa, também foi identificada na linhagem controle, não transfectada (Figura 27, canaletas 3A).



Figura 27 - Western-blotting do lisado celular clarificado HPV16 L1L2 e das frações purificadas da proteína HPV16 L2. Canaletas: 1A e 1B - Padrão de massa molecular (10 kDa a 220 kDa); 2A - Lisado celular clarificado de HPV16 L1L2; 3A - Célula 293-F não transfectada; 2B - Fração eluída 1, da cromatografia de exclusão molecular; 3B - Fração eluída 2; 4B - Fração eluída 3.

# 4.6.2 Cromatografia de afinidade do HPV16 L1L2

# 4.6.2.1 Concentração de proteínas

No processo de purificação das proteínas HPV16 L1L2 por cromatografia de afinidade foram coletadas três amostras dos eluídos, com volumes de 0,25 mL cada. As amostras do
lisado celular clarificado HPV16 L1L2 e das amostras eluídas foram quantificados pelo método de BCA. No lisado celular clarificado HPV16 L1L2 obteve-se o valor de 4,64 mg/mL de proteína total, a fração eluída 1 apresentou a concentração proteica de 37,5  $\mu$ g/mL, a fração eluída 2 foi de 149,1  $\mu$ g/mL e a fração eluída 3 foi de 262,5  $\mu$ g de proteína total por mL. O rendimento de proteína purificada nesta metodologia foi de 8,06%.

### 4.6.2.2 SDS-PAGE 10%

As análises eletroforéticas das amostras do lisado celular clarificado HPV16 L1L2 e das frações eluídas da cromatografia de afinidade, estão apresentadas na figura 28.

O lisado celular clarificado do HPV16 L1L2 apresentou bandas de massas moleculares ao redor de 45, 50, 55, 60 e 72 kDa (Figura 28, canaleta 2). No lisado de células não transfectadas (controle negativo) não foi detectada a presença de proteínas (Figura 28, canaleta 3).

Os perfis eletroforéticos das frações eluídas 1, 2 e 3 apresentaram bandas de massas moleculares de aproximadamente 55 kDa e 72 kDa semelhantes às massas molares para as proteínas L1 e L2, respectivamente, além da presença de bandas ao redor de 45, 60 e 100 kDa (Figura 28, canaletas 4, 5 e 6).



Figura 28 - SDS - PAGE 10% - Análise eletroforética do lisado celular clarificado e das frações eluídas da cromatografia de afinidade. Canaletas: 1 - Padrão de massa molecular (10 kDa a 220 kDa);
2 - Lisado clarificado de células 293-F cotransfectadas com os vetores para proteínas L1 e L2; 3 - Lisado de células 293-F não transfectadas; 4 - L1L2 purificada (fração 1); 5 - L1L2 purificada (fração 3).

O resultado do ensaio de Western-blotting da amostra HPV16 L1L2 purificada (eluídos 1 a 3 - *pool*) por cromatografia de afinidade, confirmam a presença da proteína HPV16 L1, reconhecida pelo anticorpo monoclonal específico anti-HPV16 L1 (Camvir-1), com massa molecular de aproximadamente 55 kDa (Figura 29, canaleta 2A). Uma banda imunorreativa, com massa molecular de aproximadamente 72 kDa, correspondente à proteína L2, foi detectada pelo anticorpo monoclonal anti-HPV16 L2 (Santa Cruz Biotechnology, Inc). Bandas de massas moleculares inferiores a 60 kDa foram também observadas (Figura 29B), provavelmente resultantes da degradação proteica, não evidenciada no controle, apesar do uso de inibidores de protease durante a lise celular.



Figura 29 - Western - blotting das proteínas purificadas HPV16 L1L2 (eluídos *pool*) por cromatografia de afinidade. Canaletas:
1A - Padrão de massa molecular (10 kDa a 220 kDa); 2A - proteína L1 revelada pelo anticorpo monoclonal específico anti-HPV16 L1 (Camvir-1) e anticorpo secundário IgG de cabra e anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase;
B - Proteína L2 detectada pelo anticorpo monoclonal anti-HPV16 L2 e anticorpo secundário IgG de cabra e anti-IgG de cabra o proteína l2 detectada pelo anticorpo monoclonal anti-HPV16 L2 e anticorpo secundário IgG de cabra e anti-IgG de cabra o proteína l2 detectada pelo anticorpo monoclonal anti-HPV16 L2 e anticorpo secundário IgG de cabra e anti-IgG de cabra o peroxidase.

### 4.7 Avaliação dos anticorpos de camundongos imunizados com VLPs L1L2 de HPV16

#### 4.7.1 Ensaio imunoenzimático do tipo ELISA

As avaliações dos títulos de IgG séricos de camundongos imunizados com a VLPs L1L2 foram realizados pelo método de ELISA indireto. Os anticorpos anti - L1 e L2 de seis animais *"pool"* dos grupos controle e imunizados com HPV16 L1L2 na presença e ausência de adjuvante foram analisados duas semanas após a terceira dose de vacina e avaliados os níveis séricos anti-L1 e anti-L2 do HPV16.

Inicialmente, a determinação da curva padrão foi realizada utilizando diferentes concentrações de antígenos, sendo estabelecido que a curva com a concentração de 8  $\mu$ g/poço de antígeno foi a que obteve a melhor resposta (dados não mostrados), assim foi utilizada essa concentração nos ensaios subsequentes.

As titulações dos anticorpos séricos anti-HPV16 L1 e anti-HPV16 L2 foram determinadas, conforme mostram as figuras 30 e 31. A proteína HPV16 L1 utilizada como antígeno, foi testada com o "pool" dos soros dos animais imunizados com a preparação VLP L1L2 e adjuvante (hidróxido de alumínio). Os resultados indicam que os anticorpos anti-L1 apresentaram títulos ao redor de 300, conforme mostra a figura 30. Os soros individuais dos seis animais imunizados com a mesma preparação VLP L1L2 e adjuvante foram testados para HPV16 L1 e apresentaram títulos semelhantes aos obtidos no "pool" de soros com resultados ao redor de 300 (dados não mostrados).

Os níveis de anticorpos anti-L1 e anti-L2 do grupo vacinado com VLP L1L2 na ausência de adjuvante, mostraram títulos baixos para anti-HPV16 L1 (1:50) e anti-L2 (1:20). Os soros de animais dos grupos controle e pré-imunes testados não foram reativos em todos os ensaios.

A presença de anticorpos anti-HPV16 L2 no "pool" de soros de camundongos imunizados com a preparação VLP L1L2 com adjuvante foi detectada utilizando como antígeno a proteína HPV16 L2 e os resultados mostram os títulos de anticorpos anti-HPV16 L2, ao redor de 30, conforme mostra a figura 31.



Figura 30 - Titulação dos anticorpos anti- HPV16 L1 pelo método de Elisa indireto. Grupos de animais imunizados por via subcutânea, com as preparações VLP L1L2 com adjuvante, VLP L1L2 e solução fisiológica. Os soros de 6 animais (*pool*) foram testados utilizando a HPV16 L1.



Figura 31 - Análise de anticorpos anti-HPV16 L2 pelo método de Elisa indireto. Grupos de camundongos imunizados por via subcutânea, com 3 doses de preparações VLP L1L2 com hidróxido de alumínio, VLP L1L2 e solução fisiológica. Os soros de seis animais (*pool*) foram testados, utilizando a proteína HPV16 L2.

#### 4.7.2 Western-blotting

A especificidade do soro de camundongos imunizados com a preparação VLP L1L2 contendo hidróxido de alumínio, foi determinada pela análise de Western-blotting.

Os soros de camundongos imunizados com a preparação VLP L1L2 com hidróxido de alumínio reconheceram os monômeros e dímeros de HPV16 L1, de massas molares de aproximadamente 55 kDa e 120 kDa, respectivamente, na amostra de dialisado do HPV16 L1L2. Uma proteína de massa molar de 72 kDa, também foi detectada no soro de animais imunizados (Figura 32 A, canaleta 4).

Nas frações dos eluídos 2 e 3 do HPV16 L1L2, os resultados indicam que após a vacinação ocorreu a indução de anticorpos específicos, através dos reconhecimentos de L1 e L2 pelo soro (Figura 32 B, canaletas 9 e 10). No grupo de animais controle não imunizados, não foram detectadas as proteínas L1 e L2 do HPV16 nas amostras do dialisado e nos eluídos do HPV16 L1L2, no entanto, foi observada a presença de proteínas não específicas ao redor de 60 kDa (Figuras 32 A, canaleta 2, e 32 B canaletas 6 e 7).



Figura 32 - Reconhecimentos de proteínas L1 e L2 pelos soros de camundongos imunizados com a preparação VLP L1L2 com adjuvante e de animais não imunizados, em ensaios de Western-blotting. Canaletas: 1, 3, 5, 8 - Padrão de massa molecular; A - Amostras de dialisados HPV16 L1L2; 2 - Contra soros de camundongos não imunizados; 4 - Contra soros de camundongos imunizados; B - Eluídos HPV16 L1L2: 6 - Eluído 2; 7 - Eluído 3, ambos contra soros de camundongos não imunizados; 9 - Eluído 2; 10 - Eluído 3, ambos contra soros de camundongos imunizados com a preparação VLP L1L2 com adjuvante. As proteínas foram reveladas com anticorpos secundários IgG de cabra anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase.

## **5 DISCUSSÃO**

O HPV representa uma grande importância clínica mundial, por estar envolvido na infecção sexualmente transmissível mais frequente em todo o mundo, as verrugas anogenitais, com incidência média elevada de 194,4 casos novos anuais e recorrentes em 100 mil homens e mulheres, além de causar amplo espectro de neoplasias (WHO, 2014).

De acordo com os dados da OMS, nos últimos 5 anos os índices de cânceres cervicais (+ 90%) e anais (90%) mantêm-se elevados e houve um acréscimo de 40% para 50% dos casos de câncer de pênis (WHO, 2007, 2012); fato que justifica o investimento em novas estratégias para o controle deste agravo à saúde pública.

Com o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante, a produção de proteínas heterólogas foi intensificada nos últimos anos, o que permitiu o desenvolvimento da vacina profilática contra o HPV. As partículas semelhantes a vírus (VLPs) de HPV têm sido produzidas em vários sistemas de expressão, utilizando células de leveduras (Gardasil, Merck & Co.), insetos (Cervarix, Glaxo SmithKline), bactérias e mamíferos (AIRES et al., 2006; CIANCIARULLO et al., 2010; HAGENSEE; YAEGASHI; GALLOWAY, 1993; ZHANG et al., 1998). Por ser o HPV um vírus exclusivamente epitelial e dependente da diferenciação dos queratinócitos para completar seu ciclo de vida, limitando a sua obtenção, uma alternativa seria a utilização da tecnologia de DNA recombinante.

Este trabalho teve como objetivo a obtenção de VLPs L1L2 de HPV16, utilizando o sistema de expressão heteróloga em células epiteliais humanas em suspensão e a avaliação da imunogenicidade em modelo murino, com o propósito de desenvolvimento de uma vacina profilática para HPV.

Neste estudo, o sistema de expressão em células embrionárias humanas (HEK) foi escolhido por ser amplamente utilizado na pesquisa em biologia celular por vários anos e também usado na biotecnologia industrial, para a produção de proteínas terapêuticas e na terapia gênica (CIANCIARULLO et al., 2010). A linhagem celular HEK 293 foi a primeira linhagem transformada, usando o DNA do adenovírus humano tipo 5 (Ad5) (GRAHAM et al., 1977). Desde o seu desenvolvimento, tornou-se uma das mais frequentemente utilizadas na produção de proteínas. Através da sua morfologia ultraestrutural observa-se uma célula com metabolismo bastante intenso, caracterizada pela presença de nucléolo bem desenvolvido e abundância de eucromatina, compatível com o observado durante o cultivo celular. Além disso, apresenta vantagens como a facilidade de cultivo, transfecção e ocorrência de processos como a glicosilação de proteínas, fosforilação, formação de pontes de dissulfeto e outras

modificações pós-traducionais essenciais para a função das proteínas, facilitando a produção de proteínas similares às condições *in vivo* (BANDARANAYAKE; ALMO, 2014; MOSSADEGH et al., 2004). Existem várias linhagens variantes da original e as células 293-F adaptadas para crescer em ausência de soro foi escolhida para a realização deste estudo.

Várias tentativas iniciais de cultivo foram realizadas para a adaptação das células 293-F às condições ambientais, sendo o estabelecimento do sistema em células 293-F em suspensão bem-sucedido no laboratório. O sistema de cultivo baseado em células em suspensão apresenta vantagens em relação ao sistema aderente como: a facilidade de manipulação devido ao crescimento em suspensão e permite a produção de células em larga escala, sendo um sistema de cultura não realizado anteriormente pelo laboratório. A ausência de soro fetal bovino no meio de expressão pode facilitar a purificação das proteínas de interesse, eliminando o elevado teor de proteínas no meio e possíveis contaminantes, como agentes adventícios.

A cultura de células 293-F em suspensão demonstrou elevada eficiência de crescimento, em meio isento de soro fetal e em condições pré-estabelecidas, alcançando elevada viabilidade e concentração celular, fatores que foram fundamentais para o uso do sistema de cultivo em escala laboratorial.

Para a expressão das proteínas recombinantes foram empregados os vetores pUF3L1h (L1) e pUF3L2h (L2) humanizados e construídos sob regulação do promotor do citomegalovírus (pCMV) (CIANCIARULLO et al., 2010). Os vetores com códons-otimizados permitiram melhorar a eficiência da expressão de proteínas intracelulares HPV16 L1L2. A alteração na sequência dos genes dos códons, para aqueles mais frequentes em genes humanos, sem a modificação na sequência da proteína, permitiram aumentar a expressão das proteínas intracelulares. Diversos grupos mostram que os códons modificados para células humanas resultaram no aumento da expressão das células, para vários genes como E5, E7 e L1 de HPV16 (CID-ARREGUI; JUAREZ; ZUR HAUSEN, 2003; DISBROW et al., 2003; LEDER et al., 2001). Os vetores L1 e L2 utilizados nas transfecções foram construídos no HPV tipo 16, considerado o mais prevalente em todo mundo, detectado em 50% dos casos de carcinoma cervical e frequentemente utilizado no desenvolvimento de vacinas profiláticas e terapêuticas para HPV (LEDER et al., 2001).

Os sistemas de transfecções e cotransfecções celulares foram realizados eficientemente, em ambos os vetores pUF3L1h e pUF3L2h. A transfecção transiente por lipofecção foi demonstrada pela eficiência na transfecção, com a expressão de níveis elevados de proteínas estruturais HPV16 L1 e HPV16 L2. O sistema de transfecção de células 293-F

por lipofecção demonstrou a mesma eficiência comparada com as células aderentes de outras linhagens celulares, utilizadas anteriormente pelo grupo (CIANCIARULLO et al., 2010; KAVATI et al., 2014; MARIGLIANI et al., 2012).

A expressão da proteína HPV16 L1 apresentou altos níveis no período de 24 horas pós-transfecção, por imunofluorescência e citometria de fluxo. Uma porcentagem elevada de 80% de células epiteliais humanas expressou a proteína recombinante L1 do HPV.

A expressão da proteína HPV16 L1 em células 293-F em suspensão foi bem sucedida, o que conduziu para a realização dos sistemas de expressão das proteínas HPV16 L1L2, utilizando os vetores pUF3L1h e pUF3L2h, nas mesmas condições de expressão da proteína HPV16 L1. Embora não seja necessária para a produção de VLPs, um avanço na tecnologia de VLPs seria a incorporação de L2 na partícula, sugerindo-se aumentar a sua estabilidade (CONWAY; MEYERS, 2009).

As proteínas heterólogas L1 e L2 mostraram elevada eficiência em 48 horas póstransfecção, por microscopia confocal e citometria de fluxo, demonstrando que cerca de 80% das células expressaram as proteínas de interesse.

A localização das proteínas estruturais L1 e/ou L2 produzidas em células transfectadas e cotransfectadas foram analisadas por imunofluorescência indireta. Os resultados dos ensaios sugerem as presenças de proteínas HPV16 L1 e HPV16 L2 no interior do núcleo e dispersas no citoplasma celular como descrito anteriormente (CIANCIARULLO et al., 2010; KAVATI et al., 2014; MARIGLIANI et al., 2012). Um estudo demonstrou a presença de fluorescência do HPV11 L1 no citoplasma e núcleo celular, sendo que o elevado nível de proteína L1 foi expresso a partir do gene modificado, formando os agregados no citoplasma, que foram transportados através dos poros do envoltório nuclear ou carioteca (MOSSADEGH et al., 2004).

Os ensaios de microscopia eletrônica de transmissão (MET) confirmam a presença das proteínas HPV16 L1 e HPV16 L2 no citoplasma, núcleo e nucléolo celular. A análise de imunocitoquímica ultraestrutural permitiu identificar a presença de estruturas, que sugerem semelhanças com *virus-like particles*, as VLPs de HPV16 L1L2, apresentando tamanhos heterogêneos, variando de 20 a 55 nm de diâmetro. Também foi possível observar as VLPs imunomarcadas com ouro coloidal, confirmando a presença de proteínas do capsídeo viral L1 ou L2.

Diversas tentativas foram realizadas durante o processo de purificação das VLPs L1L2. O protocolo de purificação utilizado foi baseado na precipitação com sulfato de amônio

a 45% no lisado celular HPV16 L1L2, antes da separação por cromatografia. Na etapa de precipitação com sulfato de amônio, tem sido sugerida a remoção dos contaminantes, sem alteração da conformação das VLPs, como descrito anteriormente (KIM et al., 2010). O tratamento com sulfato de amônio é uma etapa preliminar importante para o clareamento do lisado celular, para o uso posterior nas etapas de cromatografias de exclusão molecular ou afinidade. Diversos estudos mostram que o tratamento com sulfato de amônio, permite aumentar as ligações dissulfeto intermoleculares entre moléculas L1 vizinhas, proporcionando uma maior estabilidade entre as proteínas L1 de HPV16 (CARDONE et al., 2014; KIM; LIM; KWAG, 2012).

A etapa de cromatografia de exclusão molecular foi realizada nos ensaios preliminares de purificação do lisado celular HPV16 L1L2, sendo uma metodologia bem estabelecida para purificação de moléculas ou arranjos moleculares grandes, como os capsídeos de HPV16 (BUCK; THOMPSON, 2007; CARDONE et al., 2014).

A cromatografia de afinidade de heparina foi o método selecionado mais promissor para a purificação do lisado HPV16 L1L2, devido à heparina apresentar a vantagem de selecionar a conformação intacta da VLP (KIM et al., 2010). O estudo realizado por Kim e cols. relata que durante o processo de purificação de proteínas recombinantes, pode ocorrer a interação entre a VLP e a resina, podendo afetar a estrutura e a imunogenicidade da VLP purificada (KIM; LIM; KWAG, 2012). Na etapa inicial da infecção por HPV ocorre a ligação do vírus com o heparan sulfato dos proteoglicanos (HSPG) presentes na superfície celular (DOOBAR et al., 2012; FRAZER; LEGGATT; MATTAROLLO, 2011). Ainda não está esclarecido, mas a heparina apresenta uma similaridade estrutural a HSPG, interagindo com as VLPs em sua conformação correta e intacta, sendo um indicativo importante no controle de qualidade das VLPs (KIM et al., 2010). Estudo de Joyce e cols. relata a presença de uma sequencia conservada na região carboxi- terminal de L1, contendo aminoácidos do tipo XBBBBXB, onde B=Arg ou Lys, sugerindo que pode mediar a interação entre VLP L1 e heparina, nas quais mostra certa especificidade (JOYCE et al, 1999).

As condições de purificação são importantes para manutenção da conformação das VLPs, pois as VLPs recombinantes são instáveis e tendem a agregar-se em solução. A presença de um agente estabilizante, o surfactante não iônico polissorbato 80 (Tween 80), contribuiu no bloqueio das ligações inespecíficas das proteínas, minimizando a agregação dos capsídeos e evitando a perda de VLPs durante a purificação (BUCK; THOMPSON, 2007; SHI et al., 2005). A utilização de uma solução de alta concentração de NaCl também permitiu o bloqueio das interações inespecíficas, impedindo a desnaturação e agregação (BUCK;

#### **THOMPSON**, 2007).

Estudo de Shi e cols. demostrou que os capsídeos dos papilomavírus podem interagir inespecificamente com as superfícies sólidas dos recipientes de estocagem, como o polipropileno, vidro e outros tipos de superfícies, podendo dar início ao processo de agregação e para evitá-las foram utilizados microtubos siliconizados nas coletas das amostras (SHI et al., 2005).

As análises do grau de pureza das frações das cromatografias de exclusão molecular e afinidade por SDS-PAGE indicam a presença de uma proteína de massa molecular ao redor de 55 kDa, esperada para a proteína HPV16 L1 (BUCK; THOMPSON, 2007). Foi detectada uma outra proteína de massa molar ao redor de 72 kDa, semelhante à mobilidade eletroforética da proteína L2, como descrito anteriormente (CIANCIARULLO et al., 2010). Relato de um estudo mostra que a proteína L2 apresenta massa molecular ao redor de 72 kDa (HAGENSEE; YAEGASHI; GALLOWAY, 1993). A massa molecular estimada da proteína L2 é de aproximadamente 55 kDa, apesar da análise de SDS-PAGE apresentar massa molecular entre 64- 78 kDa (WANG; RODEN, 2013a). A razão desse fenômeno não está esclarecida, quando não se conhecem as modificações pós- traducionais da L2, exceto na modificação da proteína SUMO da lisina 35 do HPV16 L2 e em uma proteína L2 produzida em bactéria foi encontrada uma massa molecular similar (WANG; RODEN, 2013a). Nas análises das frações purificadas da cromatografia foi constatada a presença de uma proteína inespecífica de massa molecular ao redor de 66 kDa.

Os experimentos de SDS-PAGE e Western-blotting confirmam a identidade e os tamanhos das proteínas recombinantes HPV16 L1L2 no lisado celular e nas amostras purificadas das cromatografias. Na linhagem celular 293-F não transfectada usada como controle, não foram reconhecidas bandas de massas moleculares de L1 e L2, mas foram visualizadas duas bandas inespecíficas de massas molares ao redor de 50 kDa e 60 kDa, reconhecidas pelos anticorpos anti- L1 e anti-L2.

A capacidade das VLPs L1L2 em induzir anticorpos neutralizantes em modelo animal foi demonstrada através dos ensaios de Western-blotting e ELISA. As especificidades dos anticorpos IgG séricos dos camundongos imunizados com as VLPs L1L2 frente as proteínas L1 e L2, foram confirmadas pelas análises de Western-blotting. Os anticorpos séricos anti - VLP L1L2 reconheceram os monômeros e/ou dímeros da proteína L1 e monômeros da proteína L2 no lisado celular e nas duas amostras purificadas. Os soros de animais não imunizados usados como controle, não reconheceram as proteínas L1 e L2, mas foi observada

uma proteína de massa molar ao redor de 60 kDa, também reconhecida na amostra de soros imunizados com VLPs L1L2.

Os ensaios imunoenzimáticos de ELISA e Western- blotting revelaram a indução de anticorpos IgG séricos de VLPs L1L2 específicos, direcionados para as proteínas do capsídeo viral L1 e L2.

Os anticorpos séricos IgG anti- L1 dos camundongos imunizados com VLPs L1L2 contendo adjuvante, mostraram níveis mais elevados ao redor de 300 em relação ao soro anti-HPV16 L2, com valor ao redor de 30. Comparando-se os títulos dos soros anti-L1 e anti-L2 observa-se o título 10 vezes mais elevado com a L1 em relação à L2, sugerindo-se que a L2 é menos imunogênica que a VLP L1.

Diversos estudos mostram que a resposta imune da proteína L2, quando apresentada para o sistema imune na forma de VLP L1L2, a L1 responde de maneira dominante em relação à resposta humoral específica de L2, que apresenta uma resposta baixa ou indetectável devido à L2 ser pouco exposta na superfície do capsídeo viral (JAGU et al., 2010; RODEN et al., 2000).

A detecção de anticorpos anti-L1 e anti-L2 no soro dos animais imunizados com VLPs L1L2 sem adjuvante mostrou que não foram eficientes e apresentaram títulos mais baixos em comparação ao grupo imunizado com adjuvante. Nos soros dos animais pré-imunes não foram observadas as presenças de anticorpos específicos.

Estudos demonstram que a presença de VLPs imaturas apresentando alterações nas estruturas conformacionais pode comprometer a eficiência da resposta imunológica. Nas VLPs L1 imaturas as interações dissulfeto entre os capsômeros adjacentes não estão totalmente consolidadas (CARDONE et al., 2014; CONWAY; MEYERS, 2009).

Os resultados gerados neste estudo sugerem que o antígeno vacinal VLP L1L2 pode ser uma estratégia vacinal alternativa, podendo contribuir para o desenvolvimento de uma vacina profilática de segunda geração, para a prevenção do câncer cervical e outros tipos de cânceres associados ao HPV.

## 6 CONCLUSÃO

Neste estudo o sistema de expressão utilizando células de mamíferos em suspensão foi bastante promissor, como estratégia para o desenvolvimento de vacina profilática do HPV.

As análises de cultivo em suspensão demonstraram que as células 293-F foram cultivadas eficientemente em meio livre de soro, possibilitando a implantação da metodologia. O sistema de transfecção transiente por lipofecção mostrou-se eficiente para a transferência de DNA exógeno.

Os sistemas de expressão heterólogas de HPV16 L1 e HPV16 L2 demonstraram que as células expressaram eficientemente as proteínas recombinantes e foram caracterizadas por microscopias eletrônica de transmissão, confocal e citometria de fluxo, utilizando os anticorpos específicos anti- HPV16 L1 e anti- HPV16 L2. A microscopia eletrônica de transmissão mostrou evidências na formação de partículas semelhantes a vírus, as VLPs. A cromatografia de afinidade mostrou-se como o processo de purificação mais promissor, para a obtenção de partículas com estruturas conformacionais mais corretas.

As especificidades dos anticorpos IgG séricos anti-VLP L1L2 foram demonstradas imunologicamente por ensaios de Western-blotting, frente às proteínas do capsídeo viral L1 e L2. Dados preliminares das análises de ELISA mostraram a indução de anticorpos específicos anti-HPV16 L1 e anti-HPV16 L2, sendo mais elevada na proteína L1 em relação à proteína L2, no grupo imunizado com adjuvante.

Novas estratégias de respostas imunológicas devem ser realizadas para a otimização da imunogenicidade das preparações VLPs L1L2, como a combinação com adjuvantes mais potentes.

Neste trabalho foi demostrada a produção de VLPs L1L2 de HPV16, utilizando sistema de expressão heteróloga em células epiteliais humanas em suspensão e os resultados sugerem que as VLPs L1L2 se mostram com potencial promissor como antígeno recombinante, contribuindo para o desenvolvimento de uma vacina profilática de segunda geração, de amplo espectro de proteção contra diversos tipos de HPV.

# **REFERÊNCIAS\***

AIRES, K. A.; CIANCIARULLO, A. M.; CARNEIRO, S. M.; VILLA, L. L.; BOCCARDO, E.; PÉREZ-MARTINEZ, G.; PÉREZ-ARELLANO, I.; OLIVEIRA, M. L. S.; HO, P. L. Production of human papillomavirus type 16 virus-like particles by recombinant Lactobacillus casei cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 1, p. 745-752, 2006.

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.

BANDARANAYAKE, A. D; ALMO, S. C. Recent advances in mammalian protein production. **FEBS Letters**, v. 588, p. 253-260, 2014.

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.

BERGVALL, M.; MELENDY, T.; ARCHAMBAULT, J. The E1 proteins. **Virology**, v. 445, p. 35-56, 2013.

BERNARD, H. U.; BURK, R. D.; CHEN, Z.; DOORSLAER, K. V.; ZUR HAUSEN, H.; DE VILLIERS, E. M. Classification of Papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. **Virology**, v. 401, p. 70-79, 2010.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, p. 93-99, 1987.

BRUNI, L.; DIAZ, M.; CASTELLSAGUE, X.; FERRER, E.; BOSCH, F. X.; SANJOSÉ, S. Cervical human Papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 202, n. 12, p. 1789-1799, 2010.

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.; 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.; DAY, P. M.; TRUS, B. L. The papillomavirus major capsid protein L1. Virology, v. 445, p. 169-174, 2013.

\*De acordo com:

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

BZHALAVA, D.; GUAN, P.; FRANCESCHI, S.; DILLNER, J.; CLIFFORD, G. A systematic review of the prevalence of mucosal and cutaneous human papillomavirus types. **Virology**, v. 445, p. 224-231, 2013.

CAMPO, M. S.; RODEN, R. B. S. Papillomavirus prophylactic vaccines: established successes new approaches. Journal of Virology, v. 84, n. 3, p. 1214-1220, 2010.

CARDONE, G.; MOYER, A. L.; CHENG, N.; THOMPSON, C. D.; DVORETZKY, I.; LOWRY, D. R.; SCHILLER, J. T.; STEVEN, A. C.; BUCK, C. B.; TRUS, B. L. Maturation of the human papillomavirus 16 capsid. **mBio Journal**, v. 5, p. 1-11, 2014.

CASTELSAGUÉ, X.; SCHNEIDER, A.; KAUFMANN, A. M.; BOSCH, F. X. HPV vaccination against cervical cancer in women above 25 years of age: key considerations and current perspectives. **Gynecologic Oncology**, v .115, p. S15-S23, 2009.

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 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 (Suppl. C), p.661-662, 2009.

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. **Microscopy:** science, technology, application and education. Badajóz, Spain: Formatex Research Center, 2010, v. 2, p. 1073-1082.

CIANCIARULLO, A. M. Profilaxia contra o papilomavírus humano. **Revista Sodebras**, v. 9, n. 100, p. 8-15, 2014.

CID-ARREGUI, A., JUAREZ, V., ZUR HAUSEN, H. A synthetic E7 gene of human papillomavirus type 16 that yields enhanced expression of the protein in mammalian cells and is useful for DNA immunization studies. **Journal of Virology**, v. 77, p. 4928-4937, 2003.

CONWAY, M. J.; MEYERS, C. Replication and assembly of human papillomavirus. **Journal Dental Research**, v. 88, p. 307-317, 2009.

CUBIE, H. A. Diseases associated with human papillomavirus infection. **Virology**, v. 445, p. 21-34, 2013.

CULP, T. D.; CHRISTENSEN, N. D. Kinetics of in vitro adsorption and entry of papillomavirus virions. **Virology**, v. 319, p. 152-161, 2004.

DE VILLIERS, E. M.; FAUQUET, C.; BROKER, T. R.; BERNARD, H. U.; HAUSEN, H. Classification of Papillomaviruses. **Virology**, v. 324, p. 17-27, 2004.

DISBROW, G. L., SUNITHA, I., BAKER, C. C., HANOVER, J., SCHLEGEL, R. Codon optimization of the HPV-16 E5 gene enhances protein expression. **Virology**, v. 311, p. 105-

114, 2003.

DOOBAR, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. **Clinical Science**, v. 110, p. 525-541, 2006.

DOOBAR, J.; QUINT, W.; BANKS, L.; BRAVO, I. G.; STOLER, M.; BROKER, T.R.; STANLEY, M. A. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. **Vaccine**, v. 305, p. F55-F70, 2012.

EMBERS, M. E.; BUDGEON, L. R.; PICKEL, M.; CHRISTENSEN, 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, 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.

FORMAN, D.; MARTEL, C.; LACEY, C. J.; SOERJOMATARAM, I.; LORTET-TIEULENT, J.; BRUNI. L.; VIGNAT, J.; FERLAY, J.; BRAY, F.; PLUMMER, M.; FRANCESCHI, S. Global burden of human papillomavirus and related diseases. **Vaccine**, v. 30, p. F12-F23, 2012.

FRAZER, I. H.; LEGGATT, G. R.; MATTAROLLO, S. R. Prevention and treatment of Papillomavirus - related cancers through immunization. **Annual Review of Immunology**, v. 29, p. 111-138, 2011.

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

GRAHAM, F. L.; SMILEY, J.; RUSSEL, W. C.; NAIM, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. **Journal of General Virology**, v. 36, p. 59-74, 1977.

HAGENSEE, M. E., YAEGASHI, 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.

HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmid. Journal of Molecular Biology, v. 166, p. 557-579, 1983.

HARPER, D. M.; FRANCO, E. L.; WHEELER, C.; FERRIS, D. G.; JENKINS, D. Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial. **Lancet**, v. 364, p. 1757-1765, 2004.

HARRISON, T.; GRAHAM, F.; WILLIAMS, J. Host-range mutants of adenovirus type 5 defective for growth in HeLa cells. **Virology**, v. 77, p. 319-329, 1977.

HO, G. Y. F.; STUDENTSOV, Y.; HALL, C. B.; BIERMAN, R.; BEARDSLEY, L.; LEMPA, M. Risk factors for subsequent cervicovaginal human papillomavirus (HPV) infection and the protective role of antibodies to HPV-16 virus-like particles. Journal of Infectious Diseases, v. 186, p. 737-742, 2002.

HOULIHAN, C. F.; LARKE, N. L.; WATSON-JONES, D.; SMITH-MCCUNE, K. K.; SHIBOSKI, S.; GRAVITT, P. E.; SMITH, J. S.; KUHN, L.; WANG, C.; HAYES, R. HPV infection and increased risk of HIV acquisition. A systematic review and meta-analysis. **Aids**, v. 26, p. 1-18, 2012.

INGLIS, S.; SHAW, A.; KOENIG, S. Chapter 11: HPV vaccines: commercial, research & development. **Vaccine**, v. 24S3, p. S3/99-S3/105, 2006.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Estimativa 2012: Incidência de câncer no Brasil. INCA, 2012. Disponível em http://www.inca.go v.br/estimativa/2012/index.asp?ID=5. Acesso em: 9 set. 2013.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Vacina do HPV inclusão no calendário vacinal. INCA, 2013. Disponível em: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agenciar. Acesso em: 10 jan. 2014.

JOYCE, J. G.; TUNG, J. S.; PRZYSIECKI, C. T.; COOK, J. C.; LEHMAN, E. D.; SANDS, J. A.; JANSEN, K. U.; KELLER, P. M. The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 5810-5822, 1999.

JAGU, S.; KARANAM, B.; GAMBHIRA, R.; CHIVUKULA, S. V.; CHAGANI, 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. 110, p. 782-792, 2009.

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

KARANAM, B.; GAMBHIRA, R.; PENG, S.; JAGU, S.; KIM, D.-J.; KETNER G. W.; STERN, P. T.; ADAMS, R. J.; RODEN, R. B. S. Vaccination with HPV16 L2E6E7 fusion protein in GPI-0100 adjuvant elicits protective humoral and cell-mediated immunity. **Vaccine**, v. 27, 1040-049, 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. 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.

KAVATI, E. A.; OLIVEIRA, H. B.; CANALI, R. A.; SAKAUCHI, D.; CIANCIARULLO A. M. Comparative analysis of the recombinant HPV16 proteins expression between two human epithelial cell lineages. In: Méndez- Vilas, A. **Microscopy: advances in scientific research and education**, 6th ed. Badajóz, Spain: Formatex Research Center, 2014, v. 1, p. 397-402.

KENTER, G. G.; WELTERS, M. J. P.; VALENTIJN, A. R. P. M.; LOWIK, M. J. G.; VAN DER MEER, D. M. A. B.; VLON, A. P. G.; ESSAHSAH, F.; FATHERS, L. M.; OFFRINGA, R.; DRIJFHOUT, J. W.; WAFELMAN, A. R.; OOSTENDORP, J.; FLEUREN, G. J.; VAN DER BURG, S. H.; MELIEF, C. J. M. Vaccination against HPV-16 oncoproteins for vulvar intraepithelial neoplasia. **The New England Journal of Medicine**, v. 361, p.1838-1847, 2009.

KIM, H. J.; KIM, S. Y.; LIM, S. J.; KIM, J. Y.; LEE, S. J.; KIM, H. J. One step chromatographic purification of human papillomavirus type 16 L1 protein from Saccharomyces cerevisae. **Protein Expression and Purification**, v. 70, p. 68-74, 2010.

KIM, H. J.; LIM, S. J.; KWAG, H. L. The choice of resin-bound ligand affects the structure and immunogenicity of column- purified human papillomavirus type 16 virus-like particles. **PloS ONE**, v. 7, n. 4, e35893, 2012.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage  $T_4$ . Nature, v. 227, p. 680-685, 1970.

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.

LI, N.; FRANCESCHI, S.; HOWELL-JONES, R.; SNIJDERS, P. J. F.; CLIFFORD, G. M. Human papillomavirus type distribution in 30.848 invasive cervical cancers worldwide: variation by geographical region, histological type and year of publication. **International Journal of Cancer**, v. 128, p. 927-935, 2011.

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. 1-11, 2008.

MA, B.; MARAJ, B.; TRAN, N. P.; KNOFF, J.; CHEN, A.; ALVAREZ, R. D.; HUNG, C. F.; WU, T. C. Emerging human papillomavirus vaccines. **Expert Opinion on Emerging Drugs**, v. 17, p. 469-492, 2012.

MANUAL INVITROGEN. Freestyle<sup>™</sup> 293 expression system for large - scale transfection of suspension 293 cells in a defined, serum- free medium, versão C, p. 1-15, 2007.

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. Current microscopy contributions to advances in science and technology. Badajóz, Spain: Formatex Research Center, 2012, v. 1, p. 678-684.

MARIGLIANI, B. Caracterização de partículas semelhantes a vírus HPV16 produzidas em células HEK293T. 2013. 89 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

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

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, p. 57-66, 2004.

MUNÕZ, N.; BOSCH, F. X.; SAN JOSE, S.; HERRERO, R.; CASTELLSAGUE, X.; SHAH, K. V.; SNIJDERS, P. J.; MEIJER, C. J. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 6, p. 518-527, 2003.

MUNÕZ, N.; CASTELLSAGUÉ, X.; DE GONZALEZ, A. B.; GISSMANN, L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine**, v. 24, p. S3/1-S3/10, 2006.

NIETO, K.; WEGHOFER, M.; SEHR, P.; RITTER, M.; SEDLMEIER, S.; KARANAM, B.; SEITZ, H.; MÜLLER, M.; KELLNER, M.; HORER, 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.

PALMER, K. E.; JENSEN, A. B.; KOUOKAM, J. C.; LASNIK, A. B.; GHIM, S. J. Recombinant vacines for prevention of human papillomavirus infection and cervical cancer. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 86, 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. HPV 16 L1L2 VLP interaction with human amniotic fluid cells. Acta Microscopica, v. 18, p. 659-660, 2009. Suppl. C.

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

RECTOR, A.; RANST, M. V. Animal papillomaviruses. **Virology**, v. 445, p. 213-223, 2013. RODEN, R. B.; YUTZY, W.; FALLON, R.; INGLIS, S.; LOWY, D. R.; SCILLER, J. T. Minor capsid protein of human genital papillomaviruses contains subdominant, crossneutralizing epitopes. **Virology**, v. 270, p. 254-257, 2000.

ROMANOWSKI, B. Long-term protection against cervical infection with the human papillomavirus. **Human Vaccines**, v. 7, p. 161-169, 2011.

RUMBOLD, A. R.; TAN, S. E.; CONDON, J. R.; TAYLOR-THOMSON, D.; TABRIZI, S. N.; DAVY, M. L. J.; O'BRIEN, M. M.; CONNORS, C. M.; ZARDAWI, I.; STANKOVICH, J.; GARLAND, S. M. Investigating a cluster of vulvar cancer in young women:across-sectional study of genital human papillomavirus prevalence. **BMC Infectious Diseases.**, v. 12, p. 1-8, 2012.

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

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

SCHIFFMAN, M.; WENTZENSEN, N.; WACHOLDER S.; KINNEY, W.; GAGE, J. C.; CASTLE, P. E. Human papillomavirus testing in the prevention of cervical cancer. Journal of the National Cancer Institute, v. 103, p. 368-383, 2011.

SCHILLER, J. T; MÜLLER, M. Next generation prophylactic human papillomavirus vaccines. Lancet Oncology, v. 16, p. e 217-e 225, 2015.

SCHWARZ, T. F.; OBERDAN, L. Immune response to human papillomavirus after prophylactic vaccination with ASO4- adjuvant HPV-16/18 vaccine: Improving upon nature. **Gynecology Oncology**, v. 110, p. S1-S10, 2008.

SHI, L.; SANYAL, G.; NI, A.; LUO, Z.; DOSHNA, S.; WANG, B.; GRAHAM, T. L.; WANG, N.; VOLKIN, D. B. Stabilization of human papillomavirus virus-like particles by non-ionic surfactants. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 94, n. 7, p. 1538-1551, 2005.

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

STANLEY, M. HPV - immune response to infection and vaccination. **Infections Agents and Cancer**, v. 5, p. 1-6, 2010.

STANLEY, M. Epithelial cell responses to infection with human Papillomavirus. Clinical Microbiology Reviews, v. 25, n. 2, p. 215-222, 2012a.

STANLEY, M.; WINDER, D. M.; STERLING, J. C.; GOON, P. K. C. HPV infection, anal intra-epithelial neoplasia (AIN) and anal cancer: current issues. **BioMed Central Cancer**, v. 12, p. 1-4, 2012b.

STANLEY, M.; PINTO, L. A.; TRIMBLE, C. Human Papillomavirus vaccines-immune responses. **Vaccine**, v. 30S, p. F83-F87, 2012c.

STANLEY, M. HPV vaccination in boys and men. Human Vaccines & Immunotherapeutics, v. 10, p. 2109-2111, 2014.

SZULCZEWSKI, V.; LEÃO, E.; BORELLI, P.; BEÇAK, W.; MÜLLER, M.; ARMBRUSTER-MORAES, E.; CIANCIARULLO, 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.

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, e23310, 2011.

VAN DER BURG, S. H.; KWAPPENBERG, K. M. C.; O' NEILL, T.; BRANDT, R. M.; MELIEF, C. J.; HICKLING, J. K.; OFFRINGA, R. Pre-clinical safety and efficacy of TA-CIN, a recombinant HPV16 L2E7E6 fusion protein vaccine, homologous and heterologous prime-boost regimens. **Vaccine**, v. 19, p. 3652-3660, 2001.

WANG, J. W.; RODEN, R. B. S. L2, the minor capsid protein of papillomavirus. **Virology**, v. 445, p. 175-186, 2013a.

WANG, J. W.; RODEN, R. B. S. Virus-like particles for the prevention of human papillomavirus associated malignancies. **Expert Review of Vaccines**, v. 12, p. 1-22, 2013b.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Cervical cancer, human papillomavirus (HPV) and HPV vaccines. Key points for policy-markers and health professional. 2007. Disponível em: <a href="http://whqlibdoc.who.int/hq/2008/WHO">http://whqlibdoc.who.int/hq/2008/WHO</a> RHR 08.14 eng.pdf>. Acesso em: 12 set. 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION/ICO HPV INFORMATION CENTRE REPORT. Human Papillomavirus (HPV) and related cancers in the global alliance and immunization (GAVI) countries. 2012. Disponível em: http://www.hpv centre.net/link\_media/GAVI\_report2012\_doc.pdf. Acesso em: 9 jan. 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, **Weekly epidemiological record**, n. 43, p. 465-492, 2014. Disponível em: http://www.who.int/wer. Acesso em: 20 jan. 2014.

ZHANG, W.; CARMICHAEL, J.; FERGUSON, J.; INGLIS, S.; ASHRAFIAN, H.; STANLEY, M. Expression of human papillomavirus type 16 L1 protein in *Escherichia coli*: denaturation, renaturation and self-assembly of virus-like particles *in vitro*.**Virology**, v. 243, p. 423-431, 1998.

ZUR HAUSEN, H.; MEINHOF, W.; SCHEIBER, W.; BORNKAMM, G. W. Attempts to detect virus-specific DNA sequences in human tumors: I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. **International Journal of Cancer**, v. 13, p. 650-656, 1974.

ZUR HAUSEN, H. Condylomata acuminata and human genital cancer. **Cancer Research**, v. 36: p. 794, 1976.

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