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

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.

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 HPVs considerados potencialmente de alto risco, mas com baixa prevalência são os tipos 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).

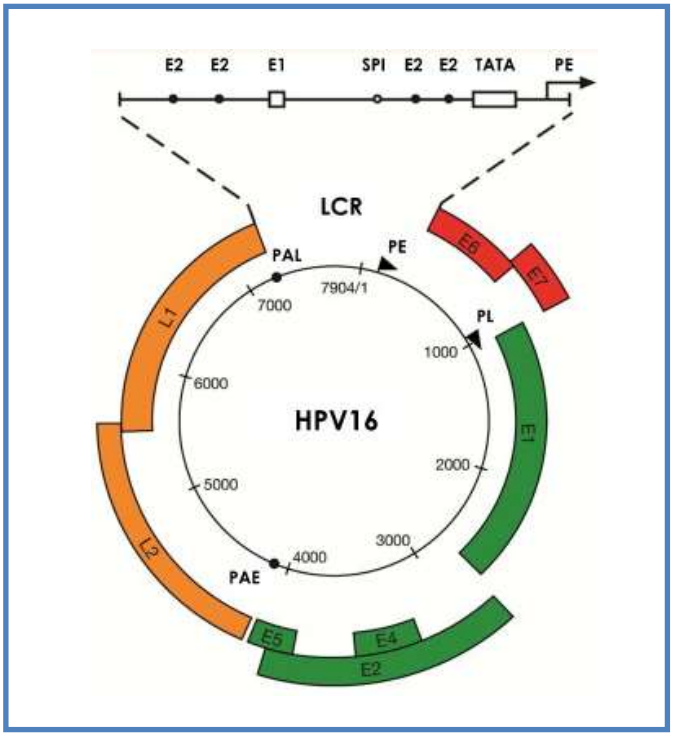

Figura 1 - Organização genômica do HPV16 de alto risco. Genoma do HPV (7904 pb) contendo a região reguladora (LCR) e 8 genes, que codificam as proteínas do capsídeo viral (L) e proteínas não estruturais (E). LCR contém sítios de ligação para fatores de transcrição celular (SP1) e para proteínas E1 e 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 repressão 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).

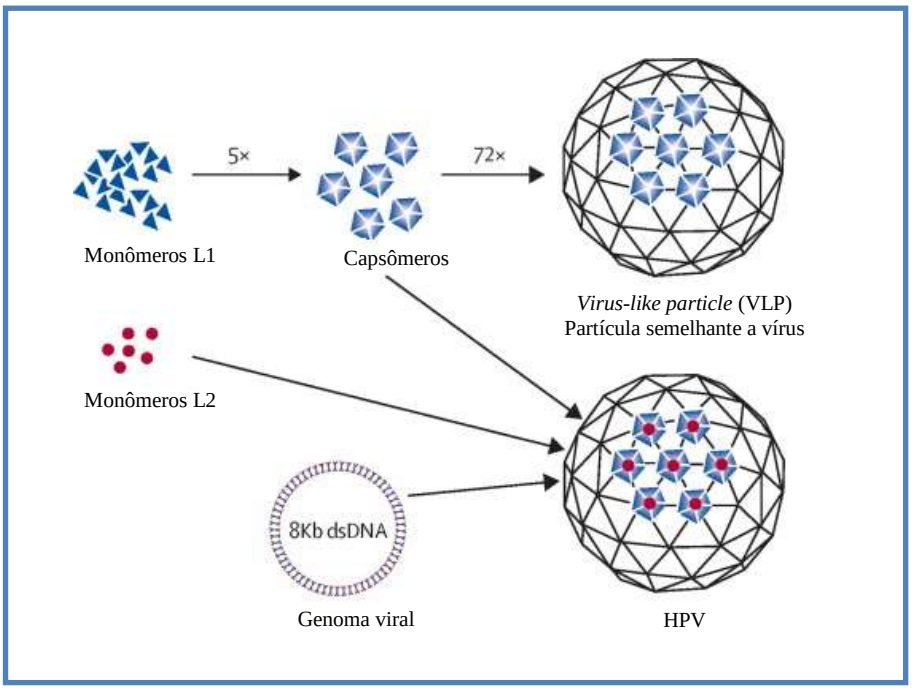

Figura 2 - Representação esquemática de formação da VLP do HPV.
Fonte: Adaptado de Schiller e Müller, 2015.

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).

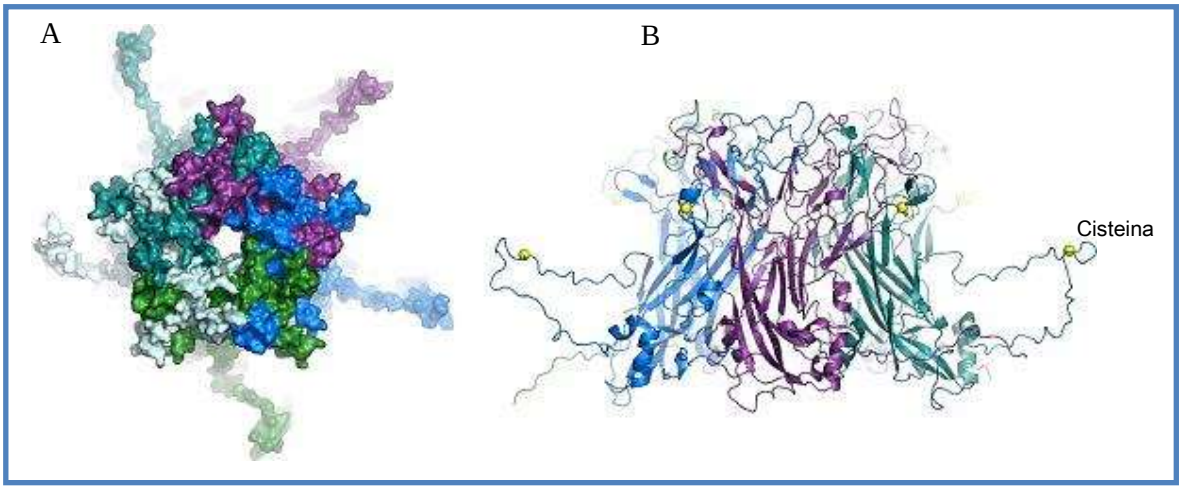

Figura 3 - Estrutura do capsômero L1. (A) Cada monômero L1 está identificado por uma coloração diferente. (B) Capsômero contendo alças (*loops*) internas nas proteínas L1 que interagem com as cisteínas. Fonte: Adaptado de Buck, Day e Trus, 2013.

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).

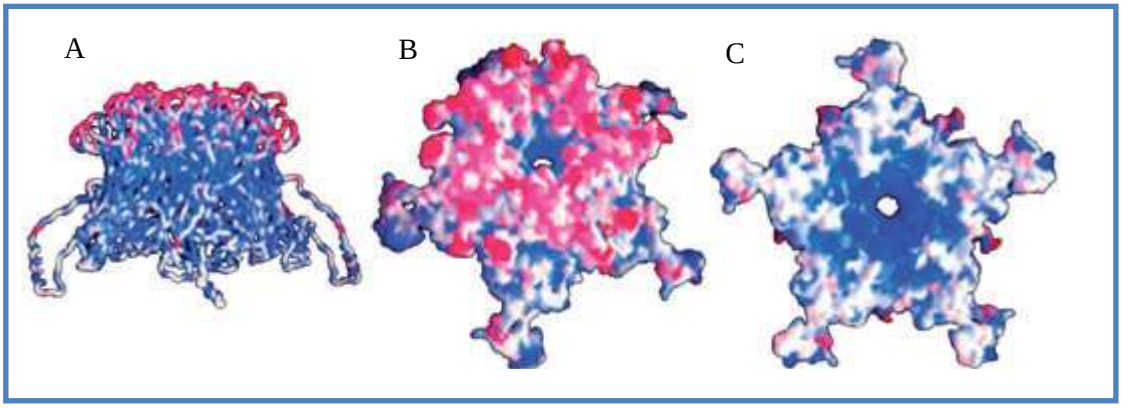

Figura 4 - Modelo tridimensional dos pentâmeros de L1. (A) Visão lateral. (B) Visão frontal. (C) base do pentâmero de L1. A sequência da proteína L1 entre genótipos (rosa) é altamente variável na face externa do pentâmero, enquanto a estrutura interna do pentâmero é altamente conservada (azul). Os anticorpos 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).

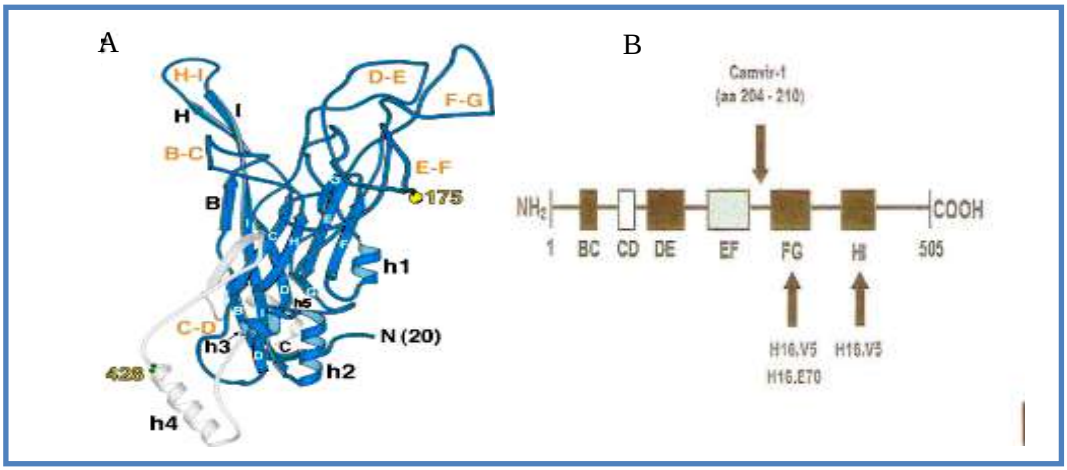

Figura 5 - Esquema do monômero de HPV16 L1 e a reatividade dos anticorpos com a HPV16VLP. (A) Alças estruturais indicadas como: B-C, C-D, D-E, E-F, F-G e H-I. (B) Resíduos da proteína HPV16L1 reconhecidos pelos anticorpos Camvir-1, H16.V5 e H16.E70 são mostrados graficamente em boxes: alças da face exposta 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).

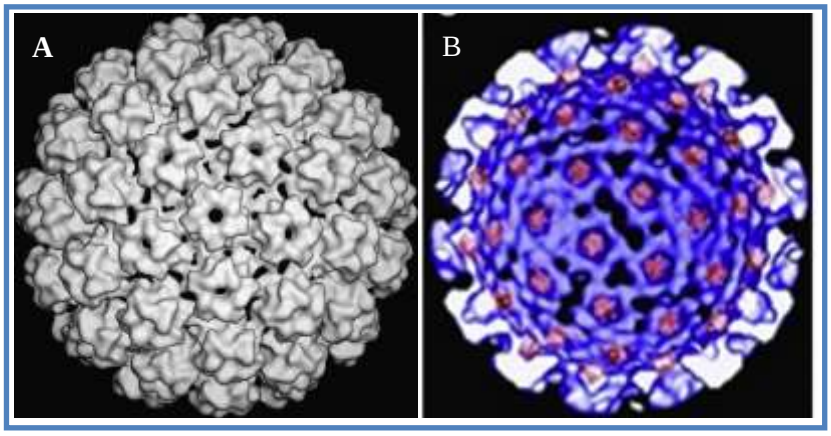

Figura 6 - Reconstrução 3D computadorizada do capsídeo HPV16. (A) Capsídeo HPV16 proteína L1. (B) Capsídeo HPV16 contendo a proteína L1 em azul e a proteína L2 em coloração vermelha. Fonte: Adaptado de Buck et al., 2008.

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).

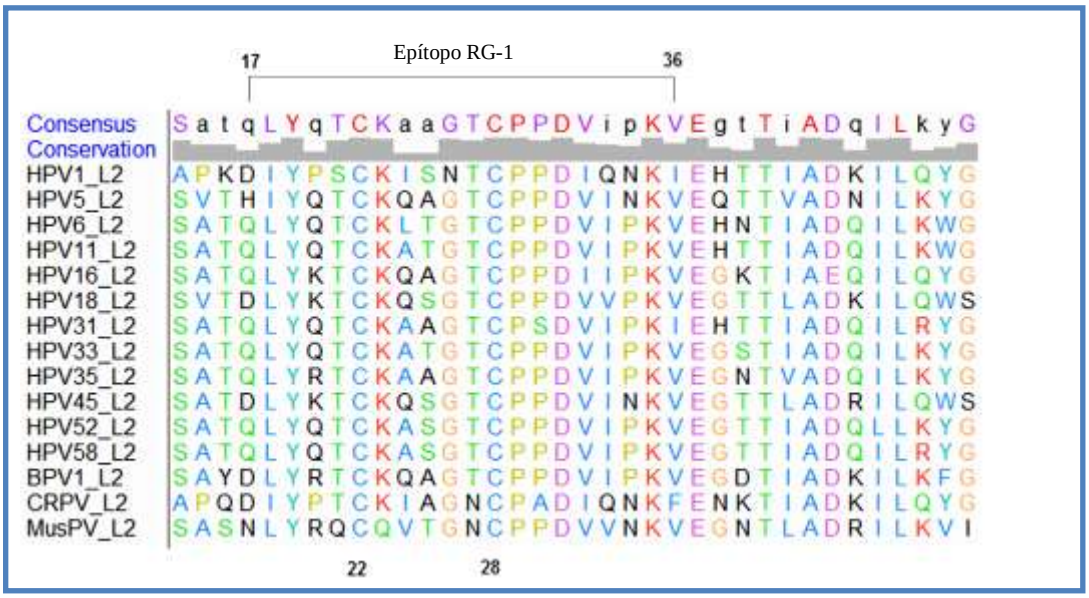

Figura 7 - Sequência conservada da região aa 17-36, presente em diferentes tipos de HPV contendo duas cisteínas (C22 e C28), importantes na infecção e reconhecimento pelo anticorpo monoclonal RG-1. Fonte: Adaptado de Wang e Roden, 2013a.

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 liga-se 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).

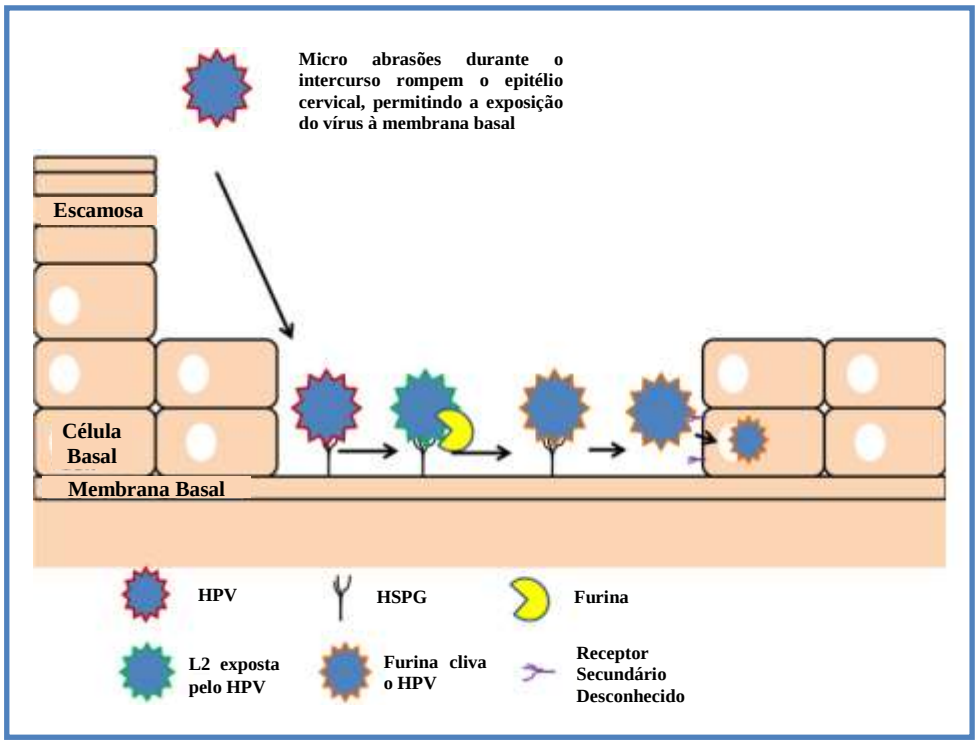

Figura 8 - Modelo de infecção do HPV no epitélio cervical. Acesso do vírus à membrana basal ocorrendo a ligação ao heparan sulfato dos proteoglicanos (HSPG). A interação do HPV com a proteína da célula hospedeira conduz a uma mudança conformacional na superfície do capsídeo, expondo transientemente a 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).

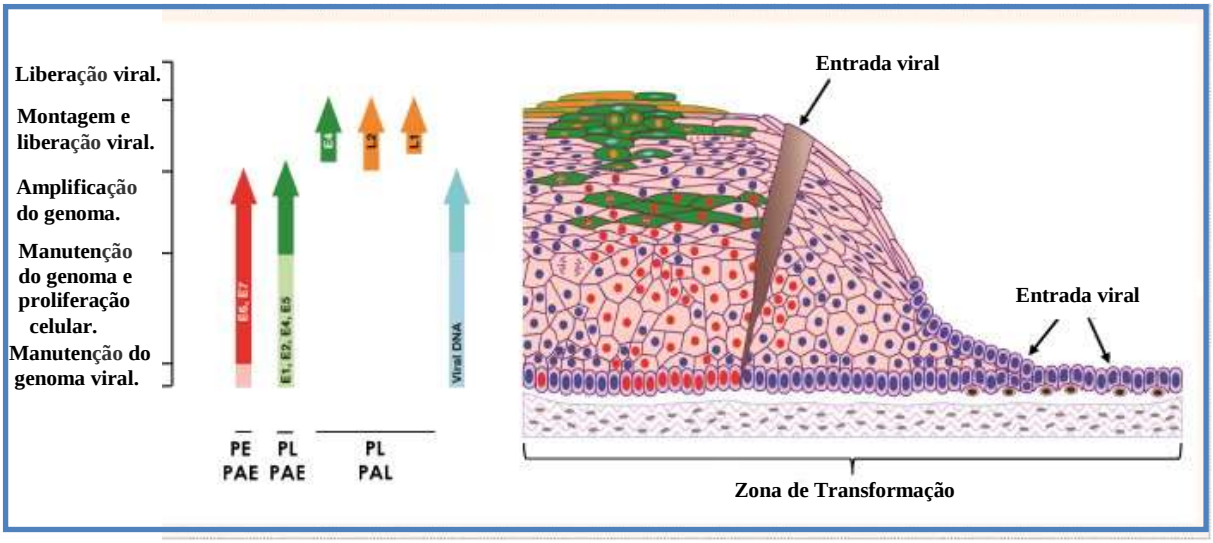

Figura 9 - Ciclo de vida do HPV de alto risco no epitélio cervical. As células infectadas na camada basal formam o reservatório da infecção, com o genoma viral mantido em número baixo de cópias e após a divisão celular, as células filhas migram para a superfície epitelial. Durante a migração são desencadeados 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® 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® 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_4, 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® e Cervarix® 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®, 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® 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).

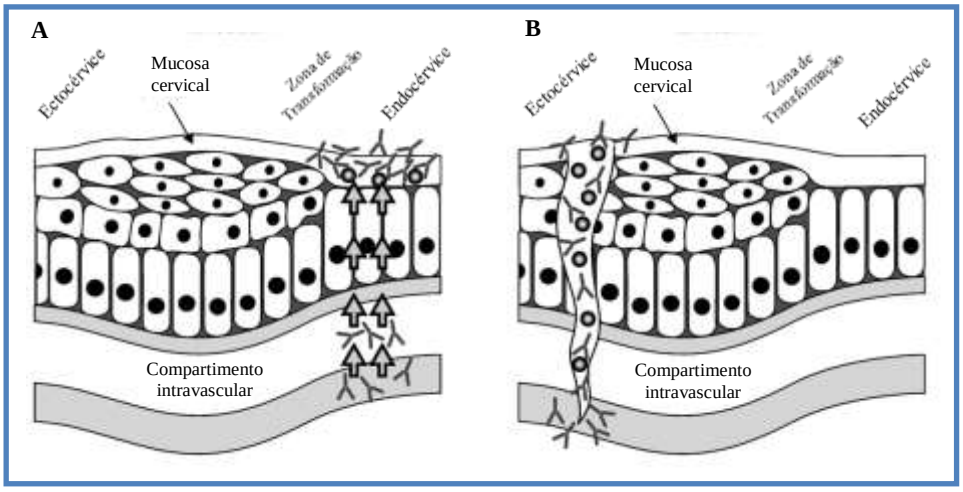

Figura 10 - Processo de transudação e exsudação dos anticorpos para o local de infecção do HPV. (A) Processo de transudação envolve a transferência de IgG intravascular para o trato genital. (B) Processo de exsudação com o escape lento do fluído dos vasos danificados para os locais das microlesões. Fonte: 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® induz uma resposta imune mais elevada, do que a vacina quadrivalente Gardasil® (ROMANOWSKI, 2011). Provavelmente, a resposta imune elevada e os altos níveis de anticorpos neutralizantes obtidos na vacina bivalente Cervarix® sejam devido ao sistema de adjuvante ASO_4 utilizado na formulação da vacina em comparação com a vacina Gardasil®, 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® (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® e Cervarix®, 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 $CD8^+$ 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 terapêutica nos ensaios clínicos de fase 3 randomizados. Até o momento, as vacinas 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 cruzada *in vivo* (GAMBHIRA et al., 2007). Um estudo recente demonstrou que a imunização 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.

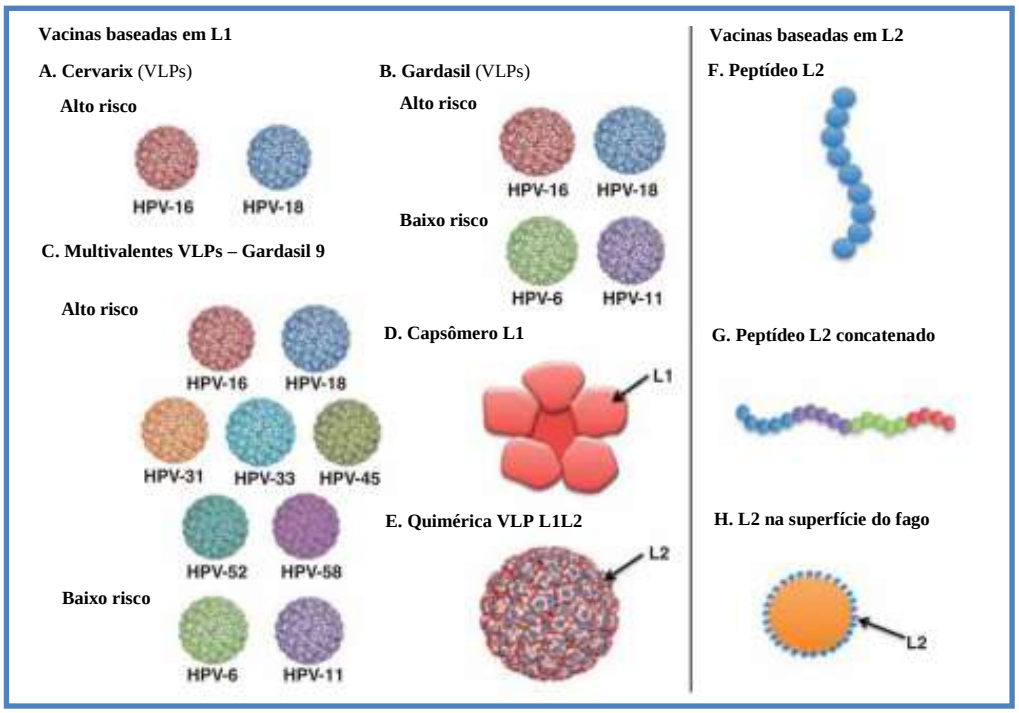

Figura 11 - Representação gráfica das VLPs da Cervarix®, Gardasil® e vacinas profiláticas contra o HPV de futuras gerações, baseadas em proteínas do capsídeo L1 e/ou L2. (A) Cervarix®, formadas pelas VLPs de HPV16 e 18. (B) Gardasil®, compostas por VLPs HPV6, 11, 16 e 18. (C) VLPs multivalentes formadas por VLPs HPV6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58 – Gardasil 9®. (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.

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:
ASSOCIACÃO 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.gov.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™ 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, cross-neutralizing 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: <http:/whqlibdoc.who.int/hq/2008/WHO 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.