



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL

ALLINE SANTOS ARAUJO MACIEL

**PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES PARA OS GENES E5 E L1
DO PAPILOMAVIRUS HUMANO TIPO 16 EM *Leishmania tarentolae***

Recife

2017

ALLINE SANTOS ARAUJO MACIEL

**PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES PARA OS GENES E5 E L1
DO PAPILOMAVIRUS HUMANO TIPO 16 EM *Leishmania tarentolae***

ALLINE SANTOS ARAUJO MACIEL

**PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES PARA OS GENES E5 E L1
DO PAPILOMAVIRUS HUMANO TIPO 16 EM *Leishmania tarentolae***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas

Co-orientador: Dr. Christian Reis

Recife

2017

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Maciel, Aline Santos Araujo

Produção de antígenos recombinantes para os genes E5 e L1 do Papilomavirus humano tipo 16 em *Leishmania tarentolae* / Aline Santos Araujo Maciel - 2017.

61 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Antonio Carlos de Freitas

Coorientador: Christian Reis

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia industrial. Recife, 2017.

Inclui referências e apêndices.

1. Câncer cervical 2. Papilomavirus 3. Vacina

I. Freitas, Antonio Carlos (orient.) II. Reis, Christian (coorient.) III. Título

579.2445

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-304

ALLINE SANTOS ARAUJO MACIEL

**PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES PARA OS GENES E5 E
L1 DO PAPILOMAVIRUS HUMANO TIPO 16 EM *Leishmania tarentolae***

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial.

Aprovada em: 11/08/2017.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas (Orientador)

UFPE

Prof. Dr. Will Barros Pita (Examinador Interno)

UFPE

Prof. Dr. Lindomar José Pena (Examinador Externo)

FIOCRUZ

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que sempre acreditaram que eu era capaz de conquistar meus sonhos e desejos e sempre me apoiaram em todas as minhas decisões.

Ao meu esposo João Pedro, por todo apoio e carinho e que sempre esteve do meu lado em todas as conquistas da minha vida.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas, pela oportunidade, confiança e ensinamentos prestados, durante este processo de pós-graduação.

Ao Prof. Christian Reis, por acreditar em mim e me fazer trilhar por esse caminho da pesquisa, sem ele nada teria acontecido.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro concedido.

Aos colegas do grupo (LEMTE) por todas as contribuições e atenção sempre prestada, principalmente ao Dr. Filipe Mariz pelas inúmeras contribuições para o enriquecimento do trabalho.

Aos amigos de laboratório, Mayara, Thaíse, Jade, Adriana Neuman, Camila, Wagner e Thaís, pela amizade e troca de conhecimento dado durante os experimentos e por tornar a rotina mais prazerosa.

Aos colegas do programa de pós-graduação em Biotecnologia Industrial, pelas aflições e alegrias compartilhadas durante todo o período do curso.

Ao Instituto de Pesquisa Aggeu Magalhães (IAM) pelas condições oferecidas para realização de todos os experimentos necessários para o projeto.

Ao coordenador do programa de pós-graduação em Biotecnologia Industrial, Prof. Dr. Will Barros Pita, pelo apoio e por sempre ser prestativo mediante as necessidades.

“Quanto mais me aprofundo na Ciência,
mais me aproximo de Deus”.

Albert Einstein

RESUMO

A infecção por HPV é considerada um problema de saúde pública sendo a doença sexualmente transmissível mais comum na população. O desenvolvimento do câncer no colo do útero está intimamente associado à presença da infecção por HPV em 95% dos casos, sendo alguns tipos virais classificados de alto risco oncogênico, como o HPV 16. Alguns genes do HPV apresentam um papel muito importante para o estabelecimento da infecção, como os genes L1, L2 e E5. As vacinas disponíveis atualmente (profiláticas) são obtidas a partir da expressão da proteína L1 de tipos oncogênicos do HPV em sistemas heterólogos. A proteína L2, apesar de ser encontrada em menor quantidade, desempenha um papel importante na infecção pelo HPV. Alguns estudos têm sido realizados para expressão da proteína E5 com a finalidade de desenvolvimento de uma vacina terapêutica, entretanto não existe ainda uma vacina deste tipo disponível comercialmente. Neste trabalho, foi proposto utilizar o sistema heterólogo da *Leishmania tarentolae* para expressar as proteínas L1, L2 e E5 de HPV 16. Esse protozoário é de fácil manipulação, utilizando meio simples, com produção de proteínas em maior quantidade em um tempo mais curto (em relação a outros sistemas eucarióticos), e pode ser cultivada em laboratório NB1, possibilitando reduzir custos de produção de vacinas anti-HPV. O vetor de expressão utilizado foi pLEXY-Hyg2 que permite a expressão de proteínas recombinantes por recombinação homóloga no sistema proposto. A expressão das proteínas foi avaliada em amostras de sobrenadante da cultura e pellets lisados de células de *L. tarentolae* por SDS-PAGE e Western Blotting. Contudo, alguns genes não se encontravam na matriz de leitura correta impossibilitando a visualização da expressão e para outro gene foi possível a visualização transitória de uma proteína com tamanho adequado, porém sem a visualização do controle positivo. Tais resultados sugerem análises complementares para contornar os problemas evidenciados durante o estudo.

Palavra Chave: HPV. cervical cancer. Recombinant Proteins. Vaccine.

ABSTRACT

HPV infection is considered a public health problem and the most common sexually transmitted disease in the population. The development of cervical cancer is closely associated with the presence of HPV infection in 95% of cases, and some viral types are classified as high oncogenic risk, such as HPV 16. Some HPV genes play a very important role in establishing such as the L1, L2 and E5 genes. Currently available (prophylactic) vaccines are obtained from the expression of L1 protein of oncogenic types of HPV in heterologous systems. L2 protein, despite being found in lesser amounts, plays an important role in HPV infection. Some studies have been carried out to express E5 protein for the purpose of developing a therapeutic vaccine, however, a commercially available vaccine of this type is not yet available. In this work, it was proposed to use the heterologous system of *Leishmania tarentolae* to express the proteins L1, L2 and E5 of HPV 16. This protozoan is easy to manipulate, using simple medium, producing more proteins in a shorter time (to other eukaryotic systems), and can be grown in laboratory NB1, making it possible to reduce production costs of anti-HPV vaccines. The expression vector used was pLEXSY-Hyg2 which allows the expression of recombinant proteins by homologous recombination in the proposed system. Expression of the proteins was evaluated in culture supernatant and lysed pellets from *L. tarentolae* cells by SDS-PAGE and Western Blotting. However, some genes were not found in the correct reading matrix, making it impossible to visualize the expression and for another gene it was possible to transiently visualize a protein of adequate size, but without visualization of the positive control. These results suggest complementary analyzes to overcome the problems evidenced during the study.

Keywords: HPV. cervical cancer. Recombinant Proteins. Vaccine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Árvore filogenética dos Papilomavírus.....	18
Figura 2 - Organização do genoma do HPV 16	19
Figura 3 - A) Modelo atômico do capsídeo viral do HPV. B) Representação das pontes dissulfeto entre a região C-terminal de um capsômero e a alça h4 do capsômero adjacente necessárias para formação de VLPs.	20
Figura 4 - Mecanismo de infecção pelo Papillomavírus Humano. Processo de formação de novas partículas virais mediante a diferenciação das células do tecido	22
Figura 5 - Progressão da infecção causada pelo HPV.	23
Figura 6 - Mecanismos carcinogênicos do HPV.	24
Figura 7 - Incidência específica de câncer de colo do útero pelo mundo, regiões desenvolvidas e em desenvolvimento e cinco continentes.....	25
Figura 8 - Estimativa de 2012 da mortalidade global decorrente do câncer cervical padronizada por idade (a cada 100 mulheres)	26
Figura 9 - Estimativa para 2016 da incidência de novos casos de câncer segundo o sexo por 100 mil habitantes.....	27
Figura 10 - Padrões de modificações pós traducionais (N-glicosilação) presentes em sistemas de expressão heterólogos.	31
Figura 11 - Morfologia dos tripanossomatídeos.....	33
Figura 12 - Lagarto <i>Tarentola mauritânica</i>	33
Figura 13 - Mapa do sistema de expressão <i>Leishmania</i>	34
Figura 14 - Mapa do vetor pLEXY-hyg2 com os sites de clonagem.....	37
Figura 15 - Desenho esquemático da quimera L2E5m.	43
Figura 16 - Construção da quimera L2E5m por PCR.	43
Figura 17 - Clonagem e subclonagem do gene L2E5m nos vetores pGEM-T easy e pLEXY-Hyg2 respectivamente.	44
Figura 18 - Subclonagem dos fragmentos gênicos L1wt, L1L2, L1E534 no vetor pLEXY-hyg2.	45
Figura 19 - Análise da expressão das proteínas baseadas em L1 de HPV 16 em <i>L. tarentolae</i>	45
Figura 20 - Análise da expressão da proteína L2E5m em <i>L. tarentolae</i>	45
Figura 21 - Repetição do ensaio de western blotting utilizando os extratos utilizados no ensaio anterior.....	45

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Sequências de primers utilizados para amplificação da quimera L2E5m.	39
Tabela 2 - Sequência dos primers utilizados na reação de PCR para confirmação da integração do cassete de expressão.	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Aminoácido
APCs	Células Apresentadoras de Antígenos
Bla	Blasticidina
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DST	Doença Sexualmente Transmissível
HPV	Papilomavírus Humano
Hyg	Higromicina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LB	Luria-bertani
LCR	Longa região de controle (Long Region Control)
LEMTE	Laboratório de estudos moleculares e terapia experimental
MHC – I	Complexo de histocompatibilidade principal classe I (Major Histocompatibility Complex class I)
µL	Microlitro
mg	Miligramas
mL	Mililitro
NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical
ORF	Quadro aberto de leitura (Open Reading Frame)
PVs	Papiloma vírus
Pb	Pares de base
p53	Proteína 53 – Fator de transcrição regulador do ciclo celular
Prb	Proteína do retinoblastoma – supressora de tumor
PCR	Polymerase Reaction Chain
RNA	Ácido Ribonucleico
RPM	Rotação por minuto
SUS	Sistema Único de Saúde
SP	Peptídeo sinal

SFB	Soro Fetal Bovino
UTR	Regiões não traduzidas intergênicas
VLP	Partículas Semelhantes a Virus (Virus-like particles)
WHO	Organização Mundial de Saúde (World Health Organization)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 OBJETIVOS	15
1.1.1 Objetivo Geral	15
1.1.2 Objetivos Específicos	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 ASPECTOS GERAIS DOS PAPILOMAVÍRUS	17
2.2 MORFOLOGIA E ORGANIZAÇÃO DO GENOMA DO HPV	18
2.2.1 Proteína L1	20
2.3 MANIFESTAÇÃO CLÍNICA DO HPV	21
2.3.1 Câncer Cervical	23
2.4 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER CERVICAL.....	25
2.5 IMUNOPATOGENIA DO HPV	27
2.6 VACINAS PROFILÁTICAS CONTRA HPV	28
2.6.1 Vacinas terapêuticas contra HPV	30
2.7 SISTEMAS DE EXPRESSÃO HETERÓLOGOS PARA PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES	30
2.7.1 Sistema de expressão baseado em <i>Leishmania tarentolae</i>	32
3 MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1 CONSTRUÇÃO DOS GENES	36
3.2 SUBCLONAGEM DOS GENES	36
3.2.1 Vetor de Expressão Plexsy- Hyg2.....	36
3.3 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA.....	37
3.4 EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL	38
3.5 CONSTRUÇÃO DA QUIMERA L2E5M PELA TÉCNICA DE PCR	39
3.6 CRESCIMENTO DA LEISHMANIA TARENTOLAE.....	40
3.7 TRANSFECCÃO E SELEÇÃO DAS LINHAGENS RECOMBINANTES	40
3.8 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO E PCR DE CONFIRMAÇÃO DE INTEGRAÇÃO	41
3.9 EXPRESSÃO PROTÉICA POR WESTERN- BLOT	42
4 RESULTADOS	43
4.1 OBTENÇÃO DA QUIMERA L2E5M	43

4.2- CLONAGEM DE L2E5M NO VETOR PGEM-T EASY E SUBCLONAGEM NO VETOR PLEXY-HYG2.....	44
4.3 SUBCLONAGEM DOS GENES L1WT, L1L2 E L1E534 NO VETOR DE EXPRESSÃO PLEXY-HYG2	44
4.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS DE INTERESSE EM <i>L. TARENTOLAE</i>	45
5 DISCUSSÃO	48
6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	51
REFERÊNCIAS	52
APÊNDICE	57
APÊNDICE A- SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DOS GENES L1WT, L1L2, L1E534 E L2E5M.....	57
APÊNDICE B- SEQUENCIAMENTO DA CONSTRUÇÃO L2E5M NO VETOR PLEXY-HYG2.....	61

1 INTRODUÇÃO

O papilomavírus humano (HPV) é um vírus de DNA circular disposto em fita dupla, não envelopado pertencente à família *Papillomaviridae*. O HPV infecta as células da camada basal do epitélio escamoso da pele ou mucosa causando lesões epiteliais hiperproliferativas que podem induzir o desenvolvimento de tumores. A infecção causada pelo papiloma vírus humano (Human Papiloma Virus – HPV) é considerada a doença sexualmente transmissível (DST) mais comum em todo mundo e sua principal consequência é o desenvolvimento do câncer no colo do útero uma vez que os tipos virais de alto risco oncogênico do HPV estão relacionados a 95% dos casos de carcinoma cervical (SILVA et al, 2012). Atualmente, mais de 120 tipos virais foram identificados e entre esses, cerca de 40 tipos infectam o trato genital e são classificados em tipos de alto risco (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82), e baixo risco (6, 11, 42, 44, 51, 81 e 83) com relação ao desenvolvimento do câncer cervical (GURGEL et al, 2013).

Estima-se que cinco milhões de mulheres já estão infectadas com algum tipo de HPV e várias delas podem desenvolver o câncer cervical. Diante desse fato, a prevenção é a melhor opção para combater as doenças relacionadas à infecção pelo papilomavírus (FREITAS et al, 2012). Atualmente existem no mercado duas vacinas profiláticas para proteção contra os HPVs 16 e 18, os mais comuns em casos de câncer cervical, e os HPVs 6 e 11 que são baseadas em partículas semelhantes ao vírus obtidas a partir da produção da principal proteína do capsídeo viral (L1) por engenharia genética através de sistemas de expressão heterólogos. A proteína L1, quando expressa em sistemas de expressão, possibilita a obtenção de uma estrutura semelhante ao capsídeo viral conhecidas como VLPs (*Virus like particles*) que são estruturas idênticas ao vírus, mas não contém o genoma viral (BAZAN, 2007). Ambas as vacinas somente são eficazes quando administradas antes do início de atividade sexual, visto que este tipo de imunização induz apenas proteção humoral contra L1 evitando, de forma profilática, o estabelecimento da infecção. Apesar de essas vacinas apresentarem uma eficácia significativa, existem limitações quanto ao custo elevado de produção e baixo espectro de proteção e para contornar essas limitações, o desenvolvimento de novas estratégias vacinais torna-se necessária.

Para uma intervenção terapêutica, com regressão das lesões provocadas pelo HPV, é importante um fortalecimento da resposta imune celular dirigida contra as proteínas virais superexpressas nas células infectadas/transformadas, e alguns estudos têm mostrado que a

proteína E5 pode ser utilizada com esta finalidade (DOCHEZ et al, 2014 e LIAO et al, 2013). O gene E5 vem recebendo um destaque maior nos estudos em relação à função a qual desempenha no processo da infecção. Ele participa da regulação do crescimento celular sendo expresso em maiores níveis no início da infecção e assim pode ser um alvo para estudos relacionados ao desenvolvimento de vacinas de DNA com caráter terapêutico (LIMA et al, 2013).

Alguns genes do HPV já foram expressos em sistemas procaróticos e eucarióticos, permitindo a obtenção de proteínas recombinantes (SCHILLER et al, 2012, LI et al, 1997). A *Leishmania tarentolae* é um sistema de expressão eucariótico que vem sendo muito utilizado para produção de proteínas recombinantes em função da facilidade, dos baixos custos de utilização comparada à cultura de células eucarióticas tradicionais (mamíferos e células de inseto), da disponibilidade de ferramentas de manipulação genética, do alto rendimento na produção protéica frente a outros modelos de expressão eucarióticos, assim como por efetuar modificações pós-traducionais nas proteínas produzidas. Outra grande vantagem é que a *L. tarentolae* não é patogênica a humanos, podendo ser manipulada em Nível de Biossegurança I. (RAYMOND et al, 2011 e BASILE & PETICCA, 2009).

Diante do exposto, este trabalho tem como objetivo utilizar a *L.tarentolae* para a expressão de quimeras baseadas na proteína L1 de HPV 16, além de desenvolver uma nova quimera a partir da fusão de L2 e E5, com o intuito do desenvolvimento de uma estratégia profilático e profilático-terapêutica contra o HPV16 podendo assim, contribuir com novas alternativas na prevenção e tratamento da infecção por HPV.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar a expressão de candidatos vacinais baseados nas proteínas L1, L2 e E5 de HPV 16 em *Leishmania tarentolae*.

1.1.2 Objetivos Específicos

Construir vetores para expressão dos candidatos vacinais L1wt, L1L2, L1E534 e L2E5m em *L. tarentolae*;

Obter as linhagens recombinantes de *L. tarentolae* com os vetores de expressão;

Analisar a produção dos antígenos recombinantes a partir das linhagens recombinantes obtidas.

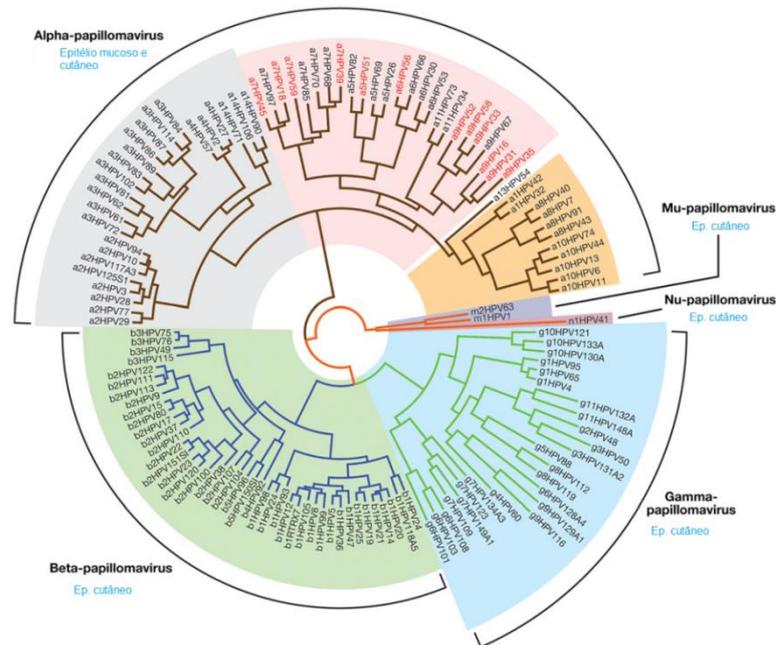
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ASPECTOS GERAIS DOS PAPILOMAVÍRUS

Os papilomavírus (PVs) compreendem um grupo diverso de vírus que podem infectar várias espécies diferentes de mamíferos, como também aves, répteis e marsupiais (DOOBAR et al, 2015). Pertencentes à família *Papillomaviridae*, os papilomavírus são pequenos vírus não envelopados que possui DNA como material genético que se encontra disposto em fita dupla circular (DOOBAR et al. 2012). Até o momento, mais de 200 genótipos de papilomavírus já foram identificados, abrangendo mais de 150 de HPV onde cerca de 40 tipos podem infectar o trato genital. Na maior parte dos indivíduos, a infecção causada pelos papilomavírus humano ocorre precocemente, ainda na infância, e permanecem assintomáticas durante toda vida, porém, essas infecções podem apresentar manifestações clínicas a partir do crescimento de lesões hiperproliferativas auto-limitadas conhecidas como verrugas, que geralmente são benignas e podem ser combatidas pelo sistema imune do hospedeiro, como também apresentar crescimento maligno de células desenvolvendo assim o câncer (DOOBAR et al. 2012, BRAVO; FÉLEZ-SÁNCHEZ, 2015).

Os Pvs humanos são divididos de acordo com o tropismo das células que infectam como também a sua relação com o desenvolvimento de lesões benignas ou malignas. Eles possuem afinidade por queratinócitos da camada basal do epitélio escamoso estratificado cutâneo ou mucoso. As infecções presentes na mucosa oral ou anogenital são geralmente causadas pelos HPVs pertencentes ao gênero *Alphapapillomavirus*, bem como as infecções que se apresenta na pele são geralmente causadas pelos gêneros *Betapapillomavirus*, *Gamapapillomavirus*, *Nupapillomavirus* e *Mupapillomavirus* (DOOBAR et al, 2012) Com relação ao grau das lesões causadas e associação com o desenvolvimento do câncer, os HPVs são classificados em tipos de baixo ou alto risco oncogênico. Entre os HPVs considerados de alto risco tem-se os tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82, e os de baixo risco são os tipos 6, 11, 42, 44, 51, 81 e 83. Dentre os tipos considerados de alto risco o HPV 16 ganha destaque por estar presente em quase todos os casos de câncer cervical sendo assim considerado o principal fator de causa deste tipo de câncer como também de vagina, orofaringe, ânus, vulva e pênis (LI et al, 2011; STEMBERGER-PAPIÉ et al, 2010) (Figura 1).

Figura 1 - Árvore filogenética dos Papilomavírus.



Fonte: Adaptado de DOORBAR et al.(2012).

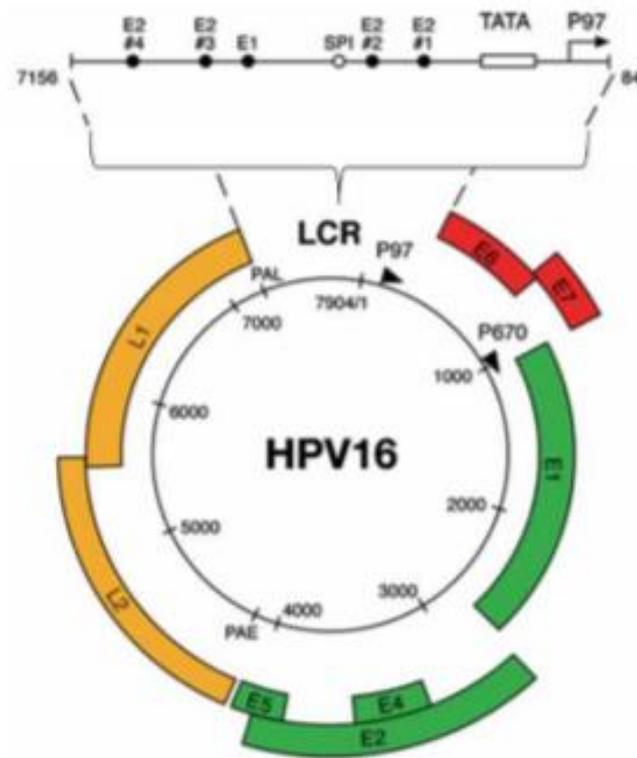
Nessa representação, os HPV do gênero *Alphapapillomavirus* estão subdivididos em baixo risco oncogênico em tecido epitelial cutâneo (cinza), baixo risco oncogênico em regiões de mucosa (laranja) e HPV de alto risco oncogênico (rosa). Tendo como base dados epidemiológicos, os HPV de alto risco escritos em vermelho representam os tipos confirmadamente carcinogênicos para humanos, enquanto os demais são prováveis ou possivelmente oncogênicos.

2.2 MORFOLOGIA E ORGANIZAÇÃO DO GENOMA DO HPV

O HPV consiste em pequenos vírus compostos por um capsídeo icosaédrico não envelopado que mede de 52 a 55nm de diâmetro aproximadamente. Seu material genético é composto de uma única molécula de DNA circular disposto em fita dupla com aproximadamente 8000 pb e seu genoma está organizado em três regiões: a longa região de controle (LCR- *Long Control Region*) que regula a transcrição e replicação viral; a região de expressão precoce E (*Early*) composta por ORFs (*Open Reading Frames ou Quadro Aberto de Leitura*) que contém genes expressos no início da infecção; a região de expressão tardia L

(*Late*) composta pelos genes L1 e L2 que são expressas mais ao final do processo de infecção (STANLEY, 2005) (Figura2).

Figura 2 - Organização do genoma do HPV 16

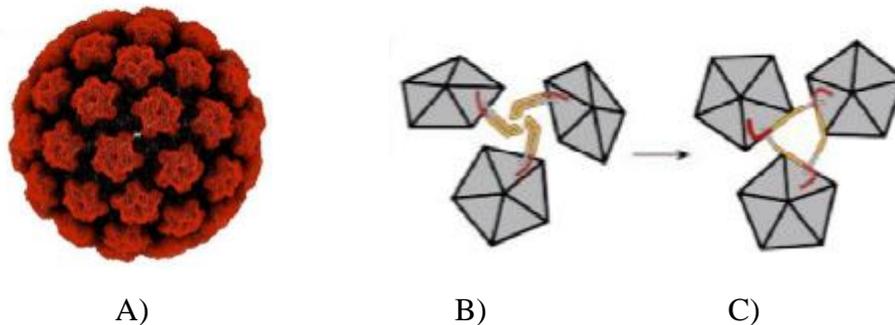


Fonte: Adaptado de Doorbar (2006).

O promotor precoce (P97) e tardio (P670) está representado pelas setas, as ORFs de expressão precoce apresentam-se nas cores verde e vermelho e as ORFs de expressão tardia encontram-se representadas na cor amarelo.

O capsídeo viral é formado por 360 cópias da proteína estrutural L1 e cerca de 72 cópias da proteína L2 (WANG e RODEN, 2013). A proteína L1 é a principal proteína que compõe o capsídeo viral representando aproximadamente 80% da proteína viral total. Seu tamanho corresponde a 55 kDa e é composta por 72 capsômeros que se conformam em um arranjo icosaédrico através de pontes dissulfeto (Figura3A; 3B) (BOLANCA et al, 2010).

Figura 3 - A) Modelo atômico do capsídeo viral do HPV. B) Representação das pontes dissulfeto entre a região C-terminal de um capsômero e a alça h4 do capsômero adjacente necessárias para formação de VLPs.



Fonte: adaptado de Bishop et al (2007) e Modis et al (2002).

As proteínas virais expressas no início do ciclo de vida do vírus podem ser subdivididas em dois genes reguladores envolvidos na replicação e transcrição (E1 e E2), três oncogenes (E5, E6 e E7) e E4 que contribui para a produção de viriões e são expressas mais ao final próximo às proteínas tardias (DOORBAR et al., 2012). A proteína E5 participa da regulação do crescimento celular e é bastante expressa no início da infecção e está sendo bastante estudada como um potencial antígeno vacinal terapêutico (LIMA et al, 2013). Alguns estudos propõem que, em relação ao sistema imune, a proteína E5 bloqueia o transporte do MHC I para a superfície celular regulando de forma negativa esse processo, contribuindo para a eliminação de células infectadas. Diante disso, é proposto o potencial dessa proteína em ser alvo do desenvolvimento de estratégia vacinal terapêutica (KIM et al. 2006).

Os genes virais E6 e E7 são citados em vários estudos por serem responsáveis pelo desenvolvimento do câncer no colo uterino. A proteína codificada pelo gene E6 provoca a destruição da proteína p53, principal gene de supressão tumoral humano, que é responsável pelo processo de apoptose da célula hospedeira, ocasionando um aumento de mutações na célula infectada, já o gene E7 inativa a proteína pRB que provoca o bloqueio do ciclo celular normal. Com a junção desses eventos, a célula perde o controle de sua divisão mitótica e começa a se proliferar de forma desregulada tendo como consequência à formação do câncer (CHAGAS, 2010).

2.2.1 Proteína L1

A proteína L1 já foi utilizada em diversos estudos em que evidenciaram a possibilidade de deletar regiões da proteína (região C-terminal e N-terminal, por exemplo) e inserir partes

de outras proteínas de HPV, obtendo uma construção quimérica capaz de oferecer uma resposta imune mais efetiva. Um estudo feito por Bian et al (2008) camundongos imunizados com uma construção quimérica que envolveu uma deleção da região C-terminal da proteína L1 para fusionar à essa região epítomos da proteína E7 constituindo uma VLP quimérica, produzindo uma resposta mediada por células contra os dois tipos de proteína do HPV 16 (BIAN et al, 2008). Com isso, é possível gerar novas estratégias de respostas imunes para o combate da infecção sendo elas profiláticas e/ou terapêuticas.

Embora seja encontrada em menor quantidade, a proteína L2 desempenha um papel importante na infecção pelo HPV. Ela favorece o encapsidamento do genoma do vírus e é essencial para a infecção viral após a ligação do vírus à superfície celular como também, é a proteína L2 que carrega o DNA viral até o núcleo celular durante a fase inicial da infecção (FAY et al, 2004). A proteína L2 possui regiões conservadas entre os diferentes tipos de HPV. Estudos realizados demonstraram que, devido a essa característica, a proteína L2 seja capaz de desempenhar uma resposta neutralizante cruzada contra diferentes tipos virais (RODEN et al, 2000). Estudos com a proteína L2 mostram a possibilidade de desenvolver uma estratégia vacinal que abranja um amplo espectro de tipos de HPV diferentes.

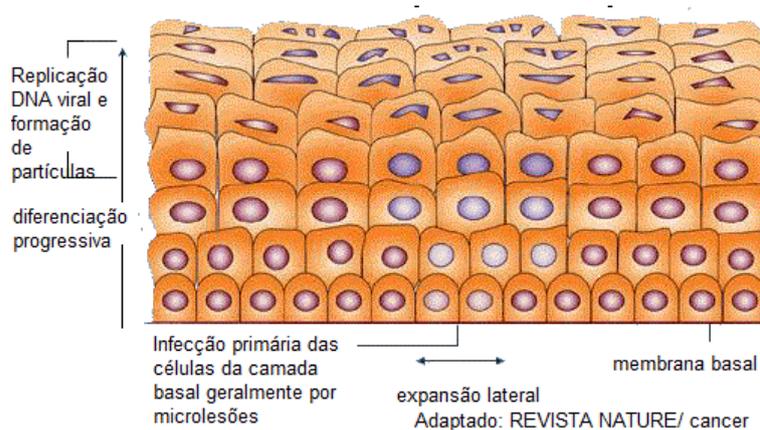
2.3 MANIFESTAÇÃO CLÍNICA DO HPV

Os papilomavírus fazem parte da microbiota de mamíferos e são obtidos durante o início da vida, portanto, um fato bem consolidado é que tanto humanos quanto outros mamíferos são colonizados por PVs que causam infecções na pele ou mucosa geralmente assintomáticas. A infecção por HPV apresenta riscos e sintomas distintos entre os gêneros, onde geralmente em homens ela é assintomática e em mulheres podem causar inflamação no trato reprodutivo (CASTRO-VÁSQUEZ; ARELLANO-GÁLVEZ, 2010). É comum que as infecções causadas pelo HPV proporcionem um perfil benigno e seja eliminada espontaneamente, porém, as infecções persistentes por certos sorotipos de vírus estão relacionadas com o desenvolvimento de câncer. A sintomatologia clínica mais conhecida da infecção pelo HPV são os condilomas ou verrugas genitais, que em 90% dos casos, são causadas pelos subtipos HPV 6 e 11, e mais raramente, pelos tipos 16 e 42. As lesões neoplásicas do trato anogenital, como nos casos da vulva, vagina, pênis e ânus, estão geralmente relacionadas aos HPVs carcinogênicos ou de alto risco oncogênico (PIQUÉ; JOSÉ, 2008).

A infecção pelo HPV ocorre quando o vírus infecta as células da camada basal do epitélio escamoso da pele ou mucosa. Ao passo que as células mais internas do epitélio vão se dividindo, elas migram da camada basal e se tornam pouco a pouco diferenciadas. Com a diferenciação das células epiteliais basais, o vírus amplifica seu material genético e libera novas partículas virais (DOORBAR, 2006). O vírus não provoca a lise das células, as partículas virais infecciosas são produzidas nas camadas mais externas do epitélio e uma vez que estas iniciam a diferenciação, os vírions são eliminados após morte celular sem inflamação (Figura 4) (FERRAZ et al, 2011).

No entanto, nas lesões malignas, ocorre a integração do DNA viral aos cromossomos das células do hospedeiro. Essa inserção se dá pela linearização do DNA circular viral ocasionando a perda da função do gene E2 e como consequência há uma superexpressão dos oncogenes E6 e E7, responsáveis pela proliferação e transformação celular e em decorrência desse fenômeno, a célula perde sua capacidade de controlar seu ciclo normal de divisão celular, diferenciação e apoptose celular, passando a ser controlada pelo vírus (LETO et al., 2011; WILSON, 2002).

Figura 4 - Mecanismo de infecção pelo Papillomavírus Humano. Processo de formação de novas partículas virais mediante a diferenciação das células do tecido



Fonte: Adaptação de Revista Nature

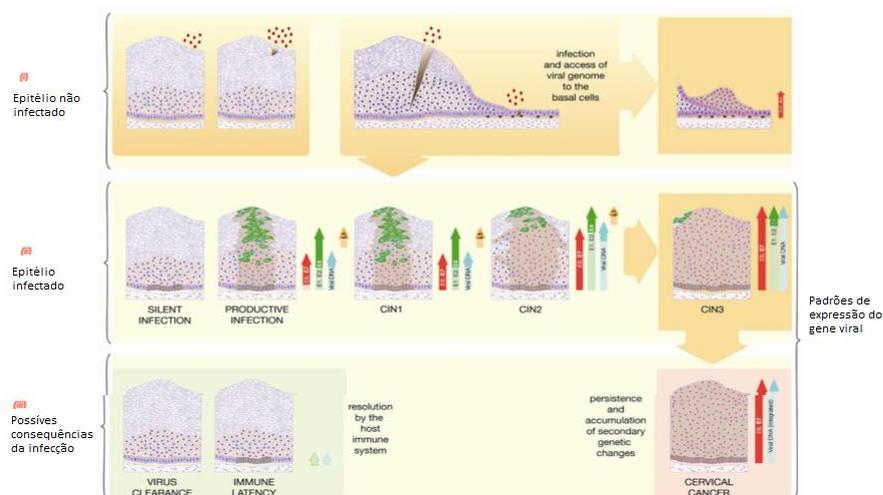
Uma sucessão de eventos faz parte da estabilização da infecção pelo HPV. Os genes virais são expressos através de um complexo que envolve a ativação de promotores virais distintos mediante a cada estágio de diferenciação celular do tecido infectado (DOORBAR et al, 2015). As proteínas E1 e E2 realizam a amplificação inicial do DNA viral, que formam um

complexo e ligando à origem de replicação viral recrutando todos os fatores necessários para a replicação. A proteína E2 ainda atua como um fator de transcrição que tanto ativa quanto inibi os demais genes precoces E (DOORBAR et al, 2012). A função das proteínas E6 e E7 estão geralmente relacionadas aos casos de malignização das células pelo fato delas serem responsáveis por comprometer os mecanismos de proliferação celular levando a uma diferenciação descontrolada (LIMA et al, 2013). Portanto, a infecção crônica causada pelo HPV tem como consequência um crescimento desordenado das células infectadas e danos genéticos que predispõem o desenvolvimento do câncer (MARIZ, 2016).

2.3.1 Câncer Cervical

Quando se fala em infecção persistente pelo HPV relaciona-se imediatamente ao desenvolvimento de câncer e o colo do útero é considerado o melhor modelo para se observar a história natural da infecção pelo papilomavírus humano. O câncer cervical tem como característica as fases progressivas definidas que são conhecidas como neoplasia intraepitelial cervical (NIC) que são classificadas do nível um ao três, levando em consideração aspectos citológicos como também histológicos das células epiteliais (Figura 5) (MOSCICKI et al.,2012).

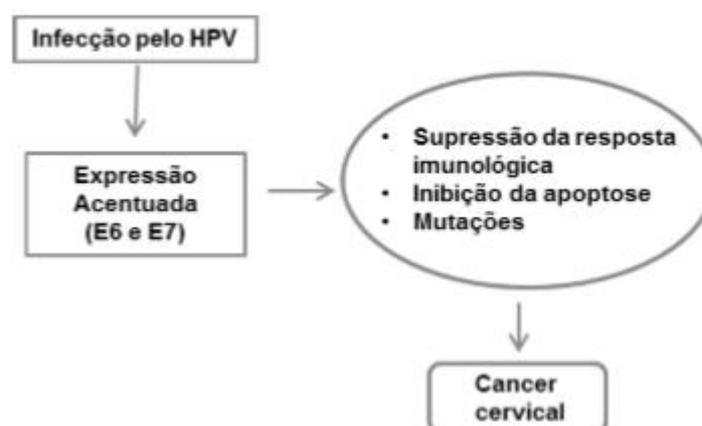
Figura 5 - Progressão da infecção causada pelo HPV.



Em (i) As partículas virais têm acesso as células do epitélio escamoso através de fissuras presentes no tecido infectando células da camada basal. (ii) A infecção pelo HPV de alto risco pode levar a uma infecção "silenciosa" ou assintomática em que os genomas virais persistem na camada basal sem o desenvolvimento de doença ou, alternativamente, ao desenvolvimento de uma lesão produtiva tal como CIN1 em que a expressão genética viral é regulada à medida que as células infectadas se diferenciam. (iii) Em alguns casos, a infecção pode levar a uma neoplasia de grau mais elevado, com expressão genética viral desregulada levando a alterações genéticas secundárias na célula hospedeira e possível integração do genoma viral no cromossoma celular. A expressão gênica desregulada observada nas CIN2 e 3, que são consideradas lesões pré-cancerosas, predisõem ao desenvolvimento de câncer.

No câncer cervical acredita-se que os níveis de expressão dos oncogenes E6 e E7 aumentam conforme a progressão das lesões, levando em consideração as propriedades que estes possuem de alterar os mecanismos de controle do ciclo celular normal. Essa alteração se dá devido as interações que ocorre entre essas proteínas com proteínas supressoras de tumor a p53 e pRB. A proteína p53 que é degradada pela proteína codificada por E6, resulta na incapacidade de reparação de danos ao DNA, aumentando assim a frequência de mutações e rearranjos, como também impede a apoptose celular. Por sua vez, a função alterada da pRB pode resultar numa progressão inadequada do ciclo celular (Figura 6) (DOORBAR et al., 2015).

Figura 6 - Mecanismos carcinogênicos do HPV.



Fonte: Adaptado de YUGAWA e KIYONO (2009).

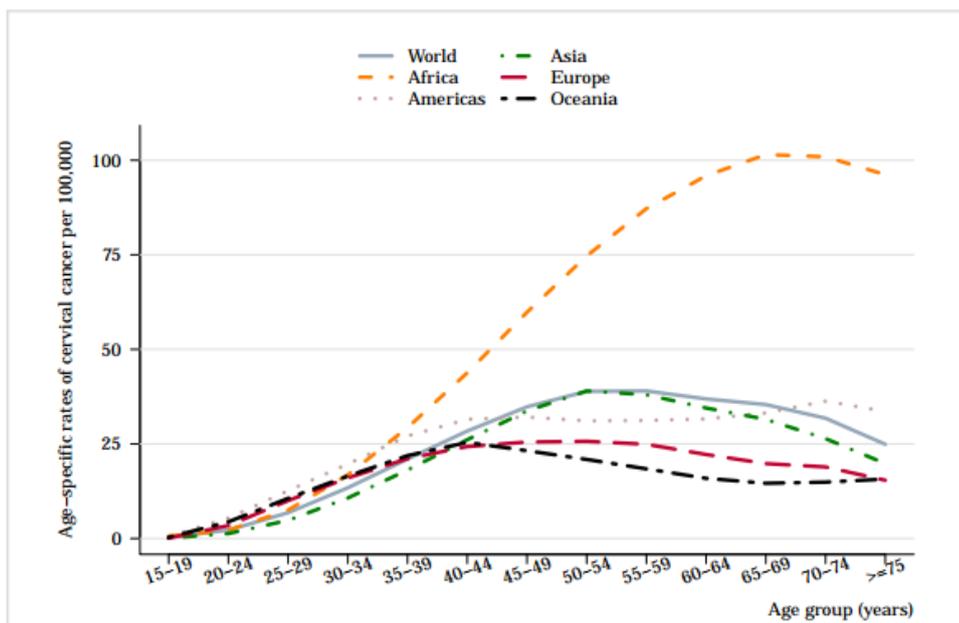
Além das alterações citadas acima, sabe-se que nas lesões malignas o DNA do vírus integra-se ao DNA da célula do hospedeiro (LETO et al, 2011). Essa integração se dá através

da linearização do DNA circular do vírus causando uma quebra na região do gene E2 que conseqüentemente leva a uma superexpressão dos genes E6 e E7 causando a malignização das células (DOORBAR et al., 2012; MUÑOS et al., 2003). Acredita-se que este mecanismo esteja intimamente relacionado com o desenvolvimento do câncer cervical.

2.4 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER CERVICAL

O papel etiológico da infecção pelo HPV entre as mulheres com câncer cervical é um fato bem estabelecido, e há evidências crescentes de seu papel central em outros cânceres anogenitais como também em casos de câncer de cabeça e pescoço (FERLAY et al., 2014). O câncer cervical é um dos tipos de câncer mais freqüente entre mulheres e caracteriza-se como um problema de saúde pública principalmente em países em desenvolvimento (Figura 7). Estima-se que atualmente, cerca de 527.624 mulheres são diagnosticadas com câncer cervical onde dessas, 265.672 morrem da doença (BRUNI et al, 2016).

Figura 7 - Incidência específica de câncer de colo do útero pelo mundo, regiões desenvolvidas e em desenvolvimento e cinco continentes.

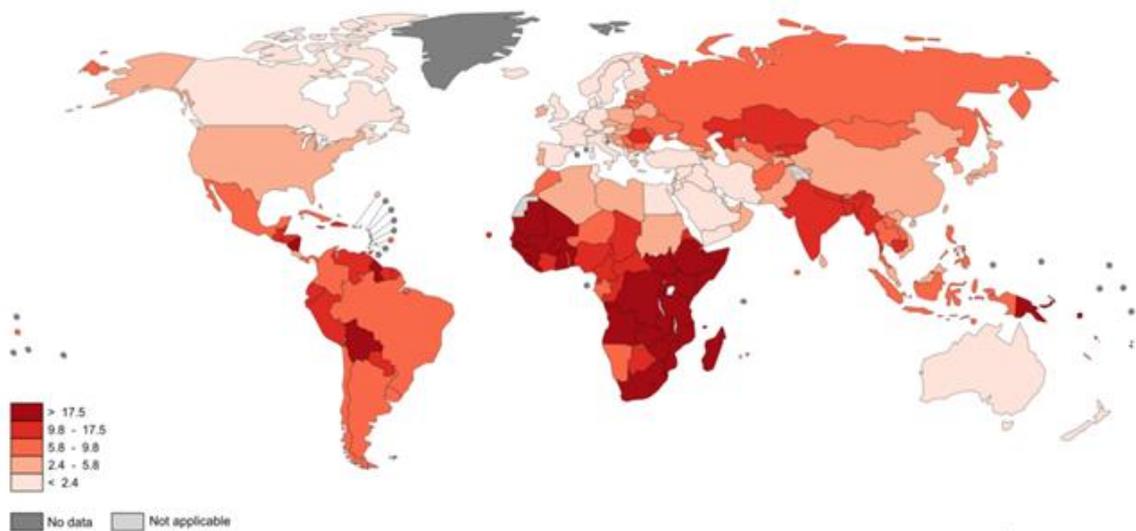


Fonte: Adaptado de Bruni et al (2016).

No cenário mundial é estimado que cerca de 15% da população feminina mundial seja acometida pelo câncer no colo do útero sendo as maiores incidências observadas na África e América Latina estando associado a altos índices de morbidade e mortalidade (Figura 8)

(BRUNI et al., 2015). De acordo com Ferlay et al 2014, nos países desenvolvidos o câncer cervical aparece como o décimo primeiro tipo de câncer mais comum e a sexta causa de morte por câncer na população de modo geral, enquanto que em países em desenvolvimento ele aparece como o segundo tipo mais comum apresentando a mesma posição com relação a causa de morte por câncer.

Figura 8 - Estimativa de 2012 da mortalidade global decorrente do câncer cervical padronizada por idade (a cada 100 mulheres)



Fonte: Adaptado de Bruni et al, (2016).

No Brasil, para o ano de 2016, foram esperados 16.340 novos casos de câncer no colo do útero, com um risco estimado de 15,85 casos a cada 100 mil mulheres (Figura 9). Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), este tipo de câncer é o terceiro mais frequente entre a população feminina ficando atrás apenas do câncer de mama e colorretal e é responsável pela quarta causa de morte de mulheres por câncer no país (INCA 2016).

Figura 9 - Estimativa para 2016 da incidência de novos casos de câncer segundo o sexo por 100 mil habitantes.

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos							
	Homens				Mulheres			
	Estados		Capitais		Estados		Capitais	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	61.200	61,82	13.940	64,93	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	57.960	56,20	18.990	79,37
Colo do Útero	-	-	-	-	16.340	15,85	4.550	19,07
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	17,49	4.430	20,59	10.890	10,54	3.230	13,49
Côlon e Reto	16.660	16,84	5.560	25,80	17.620	17,10	6.210	25,95
Estômago	12.920	13,04	3.130	14,54	7.600	7,37	2.180	9,07
Cavidade Oral	11.140	11,27	2.780	12,95	4.350	4,21	1.230	5,04
Laringe	6.360	6,43	1.600	7,50	990	0,94	320	0,97
Bexiga	7.200	7,26	2.110	9,79	2.470	2,39	830	3,21
Esôfago	7.950	8,04	1.460	6,75	2.860	2,76	610	2,27
Ovário	-	-	-	-	6.150	5,95	2.170	8,92
Linfoma de Hodgkin	1.460	1,46	450	1,74	1.010	0,93	400	1,33
Linfoma não Hodgkin	5.210	5,27	1.550	7,15	5.030	4,88	1.670	7,02
Glândula Tireoide	1.090	1,08	350	1,27	5.870	5,70	1.800	7,46
Sistema Nervoso Central	5.440	5,50	1.290	5,86	4.830	4,68	1.250	5,20
Leucemias	5.540	5,63	1.370	6,38	4.530	4,38	1.180	4,88
Corpo do Útero	-	-	-	-	6.950	6,74	2.530	10,47
Pele Melanoma	3.000	3,03	840	3,86	2.670	2,59	740	2,96
Outras Localizações	51.850	52,38	11.890	55,45	47.840	46,36	11.820	49,33
Subtotal	214.350	216,48	52.750	245,63	205.960	199,57	61.710	257,55
Pele não Melanoma	80.850	81,66	17.370	80,90	94.910	91,98	21.910	91,65
Todas as Neoplasias	295.200	298,13	70.120	326,51	300.870	291,54	83.620	348,99

Fonte: Adaptado INCA (2016).

Apesar de ser considerado o principal fator de risco para desenvolvimento do câncer cervical, a infecção pelo HPV por si só não é suficiente para o aparecimento dessa neoplasia. A associação com outros fatores como tabagismo, sistema imune deficiente (por HIV ou outras causas), apresentam influência no desenvolvimento deste câncer (FREITAS et al, 2012). A incidência do câncer no colo do útero vem decrescendo, ao longo dos últimos anos, na maior parte dos países em processo de transição socioeconômica. Este fato se dá, principalmente, pela implementação de programas de prevenção, onde no país o mapeamento do câncer cervical recomendado pelo Ministério da saúde, se faz pelo exame citopatológico em mulheres de 25 a 64 anos. Se diagnosticado precocemente, o câncer no colo do útero apresenta um alto potencial de prevenção e cura (INCA 2016).

2.5 IMUNOPATOGENIA DO HPV

Na maioria dos casos de infecção por HPV o sistema imune é capaz de produzir uma resposta eficaz, caracterizada por uma resposta celular localizada com produção de anticorpos neutralizantes e regressão da lesão (STANLEY, 2012). Os anticorpos neutralizantes gerados

nesses casos são direcionados contra a proteína L1 do capsídeo e apesar da sua expressão ocorrer de forma lenta em HPV's de alto risco, ainda assim apresentam capacidade de proteção em casos de re-infecção (STANLEY, 2012). Por outro lado, devido ao fato das proteínas L1 e L2 serem expressas em células em diferenciação e ocorrer nas camadas mais externas do epitélio, a resposta neutralizante dos anticorpos gerados não possuem efeito algum sobre as camadas mais internas do epitélio fazendo com que a infecção persista já que é na camada basal que ocorre a replicação viral (SCHILLER, 2012).

Já foi visto também em alguns estudos que regressão espontânea de lesões causadas pelo vírus é dependente de uma resposta linfocitária específica para proteínas precoces, principalmente E5, E6 e E7 (LIMBERGER et al, 2012). Ainda assim, a infecção pelo HPV desencadeia uma resposta imunológica considerada deficiente. Esse fato se dá pelo tipo de ciclo viral que por si só pode ser considerado um mecanismo de evasão ao sistema imune. O acometimento de células epiteliais em diferenciação e a ausência de lise celular são estratégias utilizadas pelo vírus para contornar o sistema imune do hospedeiro (STANLEY, 2012). Além do mais, há uma tendência durante o ciclo, de ocorrer redução nos níveis de expressão das proteínas L1 e L2, e a liberação de novas partículas acontece longe do centro de atuação do sistema imune evitando contato com as células apresentadoras de antígeno (APCs) (EINSTEIN et al., 2009).

É imprescindível a ativação do sistema imune em resposta a agentes infecciosos, pois é constituído o principal mecanismo que impede a disseminação da infecção e em particular a infecção por HPV, o desenvolvimento do câncer. Testes clínicos e estudos sobre vacinas direcionadas aos principais tipos de HPV já vem sendo feitos há alguns anos. Dados os fatos, observa-se que se faz necessário o desenvolvimento, mediante o conhecimento dos mecanismos de escape do vírus, de novas estratégias profiláticas e terapêuticas para controle e tratamento da infecção.

2.6 VACINAS PROFILÁTICAS CONTRA HPV

As vacinas que existem atualmente para a infecção por HPV são do tipo profiláticas, desenvolvidas a partir da proteína L1, através das VLPs (*Virus-like Particles*) que foram produzidas em leveduras e células de insetos. As VLPs são expostas ao sistema imune apresentando uma produção de altos títulos de anticorpos neutralizantes. (SCHILLER et al.

2012; PIQUÉ; JOSÉ, 2008). Foi demonstrado que após um mês da administração da terceira dose da vacina formulada contra os tipos 16 e 18 de HPV, 100% das mulheres com idade entre 15 e 25 anos apresentaram títulos detectáveis de anticorpos para cada tipo de vírus mostrando assim, a eficácia da vacina (HARPER et al, 2006).

Desde o ano de 2006, duas vacinas baseadas em VLPs estão disponíveis no mercado, instituindo as primeiras vacinas desenvolvidas para HPV. A vacina, fabricada pela GlaxoSmithKline (GSK, Bélgica), bivalente Cervarix®, que abrange os tipos virais 16 e 18, conferindo prevenção contra novas infecções e lesões neoplásicas cervicais relacionadas a estes tipos, e a vacina quadrivalente (Gardasil®), fabricada pela Merck & Co. Inc. (Estados Unidos), que além dos tipos 16 e 18, abrange também os tipos virais 6 e 11, prevenindo o surgimento de verrugas genitais e lesões vulvares e vaginais, além das lesões citadas anteriormente (DOCHEZ et al, 2014; PIQUÉ; JOSÉ, 2008).

A administração intramuscular da vacina baseada em VLP tem como resultado uma resposta adaptativa para células T e B neutralizando as infecções seguintes (HARPER et al, 2006). Entretanto, tais vacinas só são eficazes quando não se tem um contato prévio com o vírus, uma vez que este tipo de imunização induz apenas proteção humoral contra L1 não sendo efetiva, portanto para controlar ou prevenir lesões preexistentes (MELLO, 2013). Por este motivo, as alternativas atuais são consideradas limitadas.

Adicionalmente, apesar da eficácia descrita, as duas vacinas apresentam algumas limitações tais como, necessidade de elevados custos para fabricação e distribuição e, por possuir atividade de proteção apenas para quatro tipos virais, apresentam baixo espectro tendo em vista que existem além desses, mais 11 tipos de HPV de alto risco que também estão presentes em casos de câncer cervical (SCHILLER, LOWY, 2012). Portanto, diante do quadro atual com relação a vacinas contra HPV, observa-se a necessidade de novas alternativas vacinais com o intuito de se aumentar o espectro de proteção como também, além de uma ação profilática, seja desenvolvida uma estratégia com ação terapêutica e com relação aos custos, encontrar formas de barateamento dos mesmos.

Uma ação profilática abrangendo um amplo espectro de tipos virais pode ser utilizada como uma estratégia alternativa para contornar os problemas existentes, para isso a proteína L2 do capsídeo viral vem sendo utilizada por possuir regiões conservadas (região N-terminal) entre vários tipos de HPV podendo gerar uma resposta imune do tipo cruzada (WU et al, 2015). Alternativas terapêuticas também já vêm sendo estudada nos últimos tempos, visto o

alto número de pessoas infectadas, o baixo efeito dos tratamentos existentes e a pouca adesão as vacinas profiláticas existentes (SCHILLER; MÜLLER, 2015).

2.6.1 Vacinas terapêuticas contra HPV

As vacinas terapêuticas para HPV têm sido bastante estudadas nos últimos tempos visando combater infecções já existentes atuando na redução das lesões tumorais causadas pelo vírus e assim evitando a progressão dessas lesões para um câncer cervical a partir da ativação de células T CD8+ contra principalmente as oncoproteínas E5, E6 e E7 (LIN et al. 2010). Essas vacinas vêm sendo desenvolvidas a partir de peptídeos ou proteínas recombinantes, vetores virais recombinantes e vacinas de DNA (FREITAS et al, 2012).

Oncoproteínas do HPV que são bastante expressas no início da infecção e que estão relacionadas com a progressão da lesão são considerados alvos promissores no desenvolvimento de vacinas terapêuticas, pois elas têm a capacidade de estimular uma resposta imune celular nas células infectadas. A proteína E5 vem sendo analisada em vários estudos com essa finalidade, pois vem sendo visto que ela é reconhecida pelo sistema imunológico como um antígeno de tumor o que reforça a idéia dela ser um objeto de estudo promissor na elucidação de lesões pré-malignas (FREITAS et al, 2012).

Outra abordagem que vem sendo estudada ultimamente consiste no desenvolvimento de proteínas quiméricas que resultem em ação profilático-terapêutica. Já se tem conhecimento de utilização dessa metodologia, porém não apresentam tantos resultados positivos. Duas estratégias utilizadas com esse objetivo foram citadas por Schiller; Müller, 2015 e Su et al., 2010, em um deles consistia na incorporação de epítomos de E6 e E7 fusionados a L1 e L2 para gerar VLPs com propriedades neutralizantes e de regressão de lesões ativando linfócitos T CD4 e CD8. O outro estudo citado foi a incorporação de epítomos de E6 e E7 fusionados com L2 avaliando uma resposta profilática cruzada com regressão de lesões. Não foram relatadas novas análises clínicas a partir de tais estudos (MARIZ, 2016).

2.7 SISTEMAS DE EXPRESSÃO HETERÓLOGOS PARA PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

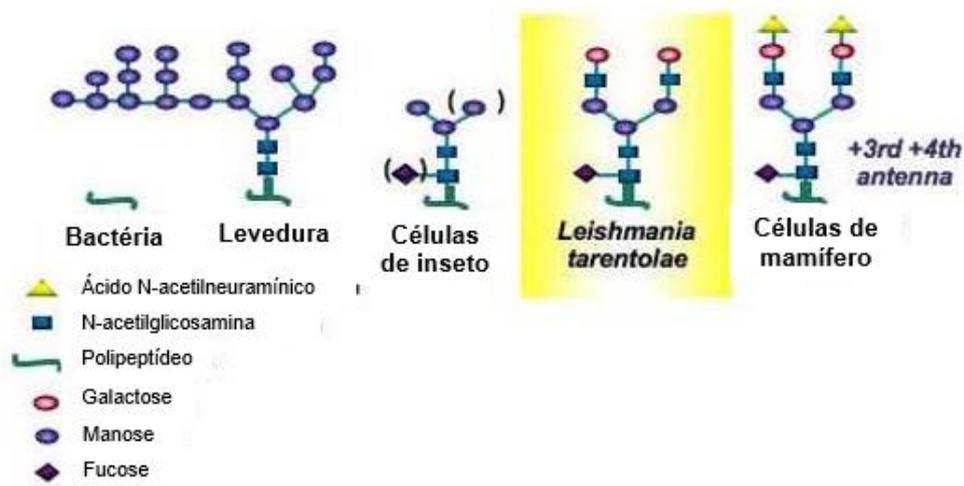
A utilização de microorganismos para expressão de proteínas heterólogas utilizando a tecnologia de recombinação gênica é uma metodologia bastante utilizada na biotecnologia moderna. Esses sistemas possuem características particulares e tem suas vantagens e

desvantagens. O uso potencial de proteínas recombinantes no desenvolvimento de vacinas, fármacos e outros reagentes, vêm crescendo devido ao amplo conhecimento sobre genomas de distintos patógenos e a eficácia observada dos sistemas de expressão para a produção de grandes quantidades de proteínas recombinantes (BREITLING R. et al. 2002).

Alguns genes do HPV podem ser expressos em sistemas procarióticos e eucarióticos permitindo obter proteínas recombinantes (RAYMOND et al, 2012). As vacinas atuais são desenvolvidas em células de levedura e em células de inseto estando esses sistemas bem estabelecidos nesse sentido (SCHILLER et al, 2012). Outro sistema bastante utilizado para produzir proteínas recombinantes é a bactéria *Escherichia coli* que apresenta baixo custo para o cultivo, rápido crescimento, fácil manipulação, vários vetores plasmidiais e diferentes linhagens para expressão de proteínas heterólogas. Entretanto, a *E.coli* é incapaz de sintetizar as VLPs, sendo necessária a utilização de linhagens eucarióticas para esse propósito como também este sistema impossibilita a geração de modificações pós-traducionais, que são necessários por muitas vezes, para a formação correta de estruturas secundárias, terciárias e quaternárias da proteína alvo (GOPAL e KUMAR, 2013).

Em relação aos sistemas eucarióticos, as leveduras apresentam vantagens em comparação com o sistema procariótico, pois as modificações pós traducionais realizados por esse sistema proporcionam uma maior estabilidade da proteína produzida. Porém, quando comparado as células de mamíferos, seu padrão de glicosilação apresenta-se de forma diferente o que também acontece nas células de insetos (Figura 10) (YIN J et al. 2007).

Figura 10 - Padrões de modificações pós traducionais (N-glicosilação) presentes em sistemas de expressão heterólogos.



Fonte: Jenna Bioscience(2012).

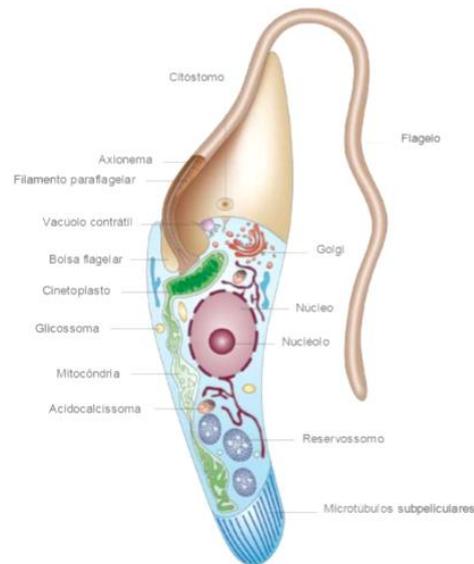
Entretanto, não há um sistema heterólogo ideal que seja utilizado universalmente para produzir proteínas recombinantes de HPV. Todos os sistemas conhecidos apresentam limitações seja, por exemplo, pelo baixo rendimento ou pelo custo elevado de produção entre outros aspectos e cada sistema apresenta características específicas que lhes proporcionam potenciais para desenvolvimento de uma estratégia vacinal (BOLHASSANI et al, 2015).

2.7.1 Sistema de expressão baseado em *Leishmania tarentolae*

Sistemas de expressão baseados em *Leishmania tarentolae* vêm sendo bastante utilizado para produção de proteínas recombinantes devido, segundo alguns autores, a algumas propriedades que ela apresenta como facilidade de manuseio, baixo custo e alto rendimento de produção da proteína alvo quando comparado a outros sistemas eucarióticos (Células de insetos e mamíferos, por exemplo) e capacidade de efetuar modificações pós-traducionais nas proteínas produzidas (RAYMOND et al, 2012; BOLHASSANI et al, 2015; SALEHI et al, 2012). No estudo de Salehi et al, 2012 por exemplo, o sistema de *L. tarentolae* foi utilizado para desenvolver uma vacina viva contra HPV com o uso da proteína E7 fusionada a GFP onde foi avaliado a eficácia desse sistema em relação a produção de resposta imune tanto humoral quanto celular o que se confirmou ao final do estudo.

A *Leishmania tarentolae* faz parte da família Trypanosomatidae e a ordem Kinetoplastida. Nesta ordem são incluídos os protozoários flagelados que apresentam uma única mitocôndria ramificada que abrange todo corpo celular e que se caracteriza pela presença de uma estrutura chamada de kinetoplasto, uma região que contém DNA extranuclear (Figura 11) (SOUSA, 2000).

Figura 11 - Morfologia dos tripanossomatídeos.



Fonte: Adaptado de Do campo et al. (2005).

O tripanossomatídeo *Leishmania tarentolae* é um parasita que não apresenta patogenicidade ao homem e foi isolado do lagarto da espécie *Tarentola mauritânica* (FIGURA 12), possuindo uma rápida proliferação celular e nutrição é relativamente simples (RAYMOND et al 2012). Os membros da família dos Trypanosomatidae se tornaram candidatos a plataformas biotecnológicas devido ao avanço da tecnologia e dos métodos de engenharia genética, em conjunto com as características de modificações pós traducionais que estes organismos apresentam como também, a facilidade do cultivo em larga escala. Outra vantagem que esse sistema de expressão apresenta é a possibilidade de sua manipulação em laboratório de nível de biossegurança I (BREITLING R et al. 2002; RAYMOND et al 2012).

Figura 12 - Lagarto *Tarentola mauritânica*.

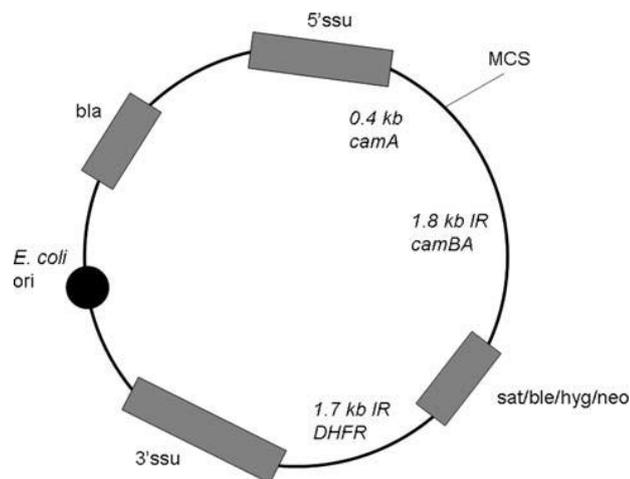


Host: *Tarentola mauritânica*

Fonte Manual da Jenna Bioscience

O sistema da *L. tarentolae* pode ser utilizado para expressar proteínas que vão ser acumuladas no citoplasma da célula intracelularmente, como também as proteínas podem ser secretadas diretamente no meio de cultura a depender das construções genéticas obtidas. Os genes de transcrição da *Leishmania* podem ser ativados por RNA polimerase endógena como também por RNA polimerase heterológa e sua regulação gênica ocorre após a transcrição através de regiões não traduzidas intergênicas (UTRs) (FIGURA 13). São facilmente transformadas por eletroporação e a seleção dessas é feita através da utilização de genes de resistência a antibióticos como, por exemplo, a fosfotransferase de higromicina que confere resistência ao antibiótico higromicina (BASILE & PETICCA, 2009).

Figura 13 - Mapa do sistema de expressão *Leishmania*.



Fonte: Adaptado Basile&Peticca (2009).

Um dos primeiros estudos utilizando a *L. tarentolae* como sistema de expressão foi de Breitling et al (2002) onde foi produzida uma proteína heteróloga da eritropoetina humana. O estudo tinha como objetivo avaliar o potencial desse sistema de expressão avaliando as modificações na proteína como padrões de glicosilação e empacotamento correto da molécula após a tradução. A proteína recombinante produzida se mostrou biologicamente ativa como também foi devidamente secretada para o meio extracelular (BREITLING et al, 2002). Outros trabalhos recentemente realizados confirmam a promissora utilização da *L. tarentolae* como sistema de expressão como, por exemplo, Salehi M et al (2012) que utilizou a *L. tarentolae* para expressar a proteína viral E7 do HPV.

Outro estudo que podemos citar foi realizado recentemente por Mariz (2016) onde ele utilizou o sistema da *L. tarentolae* para expressar a proteína L1 do HPV 16 comparando sua expressão com outro sistema eucariótico, de *Pichia pastoris*. Neste trabalho foram desenvolvidas e avaliadas duas plataformas biotecnológicas, uma baseada em *Pichia pastoris* e outra em *Leishmania tarentolae*, com o objetivo de avaliar a expressão intracelular e formação de VLP's em ambas as plataformas. Com os dados obtidos neste trabalho foi possível demonstrar a expressão satisfatória dos candidatos vacinais em *L. tarentolae* e a capacidade de realizar modificações pós- traducionais semelhantes aos descritos em células de mamíferos, caracterizando assim o sistema como atrativo para produção de proteínas, porém, com relação à formação de VLP's neste sistema, são necessários novos ensaios para definir essa formação.

Ao longo do estudo, também foi construído diferentes candidatos vacinais com base em L1, L2 e E5 de HPV 16. Tais candidatos também foram utilizados no presente estudo para avaliação da sua expressão em um vetor integrativo com o objetivo de auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias vacinais para o HPV.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CONSTRUÇÃO DOS GENES

As construções plasmidiais contendo os genes L1wt, L1L2 (vetor pSP-rRNAp- α NEO) e o gene L1E5₃₄(vetor pSP- α NEO) foram gentilmente disponibilizados pelo Dr. Filipe Mariz, do Laboratório de estudos moleculares e terapia experimental (LEMTE) do Departamento de Genética da Universidade Federal de Pernambuco, no qual seu estudo foi citado anteriormente (3.7.1). Esses plasmídeos foram utilizados para obtenção dos fragmentos de DNA de interesse mediante digestão com as enzimas de restrição *XbaI* / *KpnI* e posteriormente analisados através de eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com Syber® safe (Invitrogen®). Em seguida, os fragmentos foram excisados do gel e purificados utilizando o kit GFX™ PCR DNA and Gel Band purification kit (GE Health care ilustra™) de acordo com instruções do fabricante.

3.2 SUBCLONAGEM DOS GENES

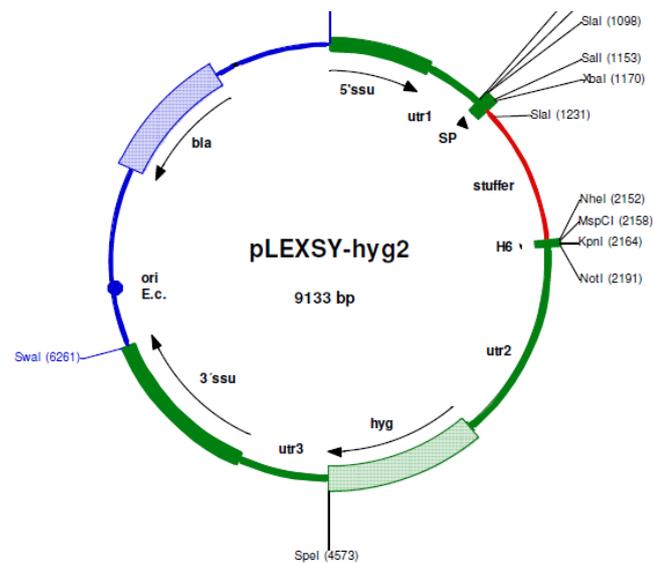
Os fragmentos obtidos por restrição enzimática foram então subclonados no vetor de expressão pLEXSY- Hyg2 (Jenna Bioscience) (figura 14), previamente cortado com as enzimas citadas (4.1), pela utilização da enzima T4 DNA ligase numa reação incubada por um período de 20 h a uma temperatura de 16°C. As construções L1wt/pLEXSY-hyg2, L1L2/pLEXSY-hyg2 e L1E5₃₄/pLEXSY-hyg2 foram transformadas em bactérias *Escherichia coli* cepa TOP10.

3.2.1 Vetor de Expressão Plexsy- Hyg2

O vetor de expressão utilizado nesse estudo foi o pLEXSY –Hyg2(Jenna Bioscience). O mesmo foi utilizado nas etapas de expressão na célula hospedeira *L. tarentolae*. Esse vetor possui os genes de resistência a higromicina (hyg) e para antibióticos β lactâmicos (bla), como também sequências do peptídeo sinal (SP) e para cauda de seis histidinas (H6) adicionadas à proteína. O peptídeo sinal possibilita que a proteína sintetizada possa ser encontrada no meio extracelular o que facilita a purificação da proteína no sobrenadante da

cultura, como também a cauda de histidina, que possibilita a purificação e também a utilização de anticorpos específicos anti-histidina para identificação da proteína. O vetor pLEXSY-Hyg2 foi projetado para ser inserido no gene do RNA ribossomal da *L. tarentolae* pelo fato deste ser altamente transcrito. O vetor possui uma região chamada de *Stuffer* (1000 pb) que serve para dar lugar ao gene que será inserido nesse vetor.

Figura 14 - Mapa do vetor pLEXSY-hyg2 com os sites de clonagem.



Fonte: Adaptado do Manual da Jenna Bioscience

A região Stuffer de 1Kpb deve ser substituída pelo gene de interesse. “5’ssu” e “3’ssu” são as regiões para a recombinação homóloga no gene para a sub-unidade menor (18S) do ribossomo no cromossomo hospedeiro. As regiões utr1, utr2 e utr3 são regiões intergênicas otimizadas não codificantes que servem de sinal para splicing pós transcrição. “SP” representa a região de peptídeo sinal e “H6” é região codificante para a cauda de seis histidinas. A região “oriE.c” representa a origem de replicação de *E. coli* e os marcadores de resistência para os antibióticos higromicina e β -lactâmico são representados como “hyg” e “bla” respectivamente.

3.3 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA

Um volume de 5 μ L da reação de ligação citada no item 4.2 foi acrescido a 50 μ L de célula quimiocompetente de *E. coli* TOP10 e foi incubada no gelo durante 30 minutos. Após esse período, foi passado para o banho-maria a uma temperatura de 37°C por 5 minutos e depois, imediatamente, incubadas no gelo novamente por 5 min. Após essa etapa, 800 μ L de meio SOC estéril foi adicionado e colocado no shaker por 1 hora sob uma temperatura de

30°C com agitação de 180 rpm. Passado o tempo, a cultura foi centrifugada a temperatura ambiente por 10 minutos e em seguida foi retirado 700µL do sobrenadante e o restante do volume foi utilizado para ressuspender o sedimento de células em que foi plaqueado em meio LB sólido contendo ampicilina a 100 mg/mL. As placas foram colocadas em estufa a 30°C por um período de 16-18 horas.

3.4 EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL

Os clones crescidos em placa resultante da transformação foram selecionados para a realização da extração do DNA plasmidial. Em tubos cônicos estéreis de 15 mL foi colocado 5 mL de meio LB (Luria-Bertani) líquido acrescido do antibiótico de seleção ampicilina a 100 mg/mL e uma colônia foi colocada separadamente em cada tubo. Os tubos foram incubados a 30°C por 16 horas sob agitação de 197 rpm. Após o período de incubação, o conteúdo dos tubos foi centrifugado a 6000 rpm por 10 minutos a 4°C, em que ao final, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspense em 100 µL de GTE (EDTA 50mM pH 8,0, Tris-Hcl 25mM pH8,0, Glicose 50mM), e transferido para tubos do tipo eppendorf, em seguida foi adicionado 200 µL de NaOH 0,2 M / 1% SDS e incubados por 5 minutos no gelo.

Durante esta etapa, foi adicionado 150 µL de tampão acetato de potássio (3M CH₃COOK / 2 M CH₃COOH pH 4,8) e permaneceu no gelo por 5 minutos. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12.000 rpm em temperatura ambiente onde o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionou-se 150 µL de NaCl e completou o volume do tubo com etanol 100%. Para otimização da precipitação, as amostras foram incubadas *overnight* a -20°C, para posterior centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de DNA foi ressuspense em 20 µL de água contendo *RNAse* (10 mg/mL) e incubadas a 37°C por 30 minutos.

A clonagem foi confirmada através de digestão por enzimas de restrição *XbaI*/*KpnI* com volume final de 10 µL onde 2 µL foi de DNA plasmidial, 0,5 µL de cada enzima, 1 µL de tampão enzima específico (10x) e água para completar o volume. As reações foram incubadas a 37°C por um período de 10 horas e após esse período foram analisadas em gel de agarose 1% corado com SYBR® Safe (Invitrogen) para visualização da liberação dos fragmentos correspondentes os genes de interesse. Após confirmação dos tamanhos dos insertos por digestão, as amostras selecionadas foram submetidas a seqüenciamento de DNA realizado no equipamento ABI Prism 3100 *GeneticAnalyzer* (*Applied Biosystems*) disponível

no Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) do IAM-FIOCRUZ. O resultado do seqüenciamento foi analisado através do programa SeqMan (DNASar-Lasergene).

3.5 CONSTRUÇÃO DA QUIMERA L2E5M PELA TÉCNICA DE PCR

Paralelamente aos genes L1wt, L1L2 e L1E5₃₄, durante o estudo foi construído também um gene decorrente da fusão de epítomos do gene E5 a uma porção do gene L2. A síntese da quimera L2E5_m foi feita através de *Reação em Cadeia da Polimerase* (PCR) utilizando o genoma de HPV16 previamente clonado em vetor pBR322 (KARLEN; BEARD, 1993) como template e os primers demonstrados na tabela 1, os quais foram desenhados a partir do isolado GI:333031. Os primers foram desenhados para amplificar uma seqüência de DNA codificadora da proteína L2 (11-200aa) para fusionar multi epítomos do gene E5. A reação de PCR foi realizada nas seguintes condições: desnaturaçãoinicial a 98°C por 3min, 30 ciclos de desnaturaçãoa 98°C por 1min, anelamento a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos e extensão final a 72°C por 5min, utilizando a enzima *Platinum® Taq DNA Polymerase* (Invitrogen).

Tabela 1 - Sequências de primers utilizados para amplificação da quimera L2E5m.

Primers L2E5_m	Sequência 5' - 3'
Forward	GAACCATGGCTCTAGACGCCATGAAACGTGCATCGGCTACCCA
Reverse	GAAGGTACCAGCGGGATGTACACGAAGATGATGTAGTACGCCGCC AG CAGCGGGCGGATCAGCAGGCACACGTACGCCGCTGTATCCATAGGA ATTTCTT

TCTAGA; XbaI; **GGTACC**: KpnI; Sítios de restrição a essas enzimas

O produto de PCR foi analisado por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8% e purificado utilizando o kit já citado (4.1). O fragmento da quimera construída foi clonado no vetor de clonagem pGEM-T *easy* de acordo com instruções do fabricante. Essas construções foram transformadas em *E.coli* TOP 10 e as linhagens recombinantes foram submetidas à extração do DNA plasmidial, análise do perfil de restrição enzimática e confirmação, por fim, da clonagem do gene de interesse no plasmídeo a partir da análise dos dados do seqüenciamento de DNA nas amostras realizado no equipamento ABI Prism 3100 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) e analisados através do programa SeqMan (DNASar-Lasergene).

Lasergene). Uma vez confirmado a construção plasmidial pGEM –*Teasy/L2E5_m*, o mesmo foi digerido com as enzimas de restrição XbaI/KpnI para obtenção do fragmento de DNA L2E5_m que foi subclonado no vetor de expressão pLEXSY–Hyg2 conforme descrito no item 4.2.

3.6 CRESCIMENTO DA LEISHMANIA TARENTOLAE

As células de *L. tarentolae* foram mantidas em meio Schneider com pH 7,2, suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB), 0,2 % de hemina e 1 % de penicilina e estreptomicina. O cultivo foi feito a 26°C em garrafas de cultura de 50 ml com 9 mL de meio e 1 mL de célula. Para manter as células, semanalmente foi realizado repiques em tubos cônicos de 15 mL com 3 mL de meio e 50µL da cultura anterior. As células transgênicas, após a transfecção com os genes de interesse, foram cultivadas sob as mesmas condições descritas com a adição do antibiótico higromicina ao meio de cultura.

Para o congelamento das células uma cultura de 10 mL foi monitorada até atingir fase exponencial de crescimento. Em tubos de criopreservação de 2 mL, foi colocado 1mL de meio Schneider's mais DMSO(10%) e 1mL da cultura de células e foram estocadas a -80°C.

3.7 TRANSFECÇÃO E SELEÇÃO DAS LINHAGENS RECOMBINANTES

Para transfecção, o volume de 10 mL de cultura de células *L. tarentolae* com densidade celular de aproximadamente $2,5 \times 10^8$ em 48 horas de cultivo foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos em tubos cônicos de 15 mL. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspense em 1 mL de tampão HEPES-NaCl (21 mM HEPES, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,7 mM Na₂HPO₄, 6 mM glicose e pH 7,05), homogeneizado e centrifugado nas mesmas condições anteriores, sendo o sedimento ressuspense em 400 µL do tampão HEPES-NaCl e transferido para cuvetas de 0,2 mm contendo as construções pLEXSY/L1wt, pLEXSY/L1L2, pLEXSY/L1E5₃₄, pLEXSY/L2E5_m, pLEXSY vazio e a célula selvagem utilizada como controle negativo, ambas linearizadas pela digestão com a enzima *SwaI*. A transfecção foi feita por eletroporação sob as seguintes condições: voltagem 450V; capacitância 500µF e resistência $\infty \Omega$ através do aparelho BioRad Gene Pulser II (BioRad). Após a transfecção, as células foram colocadas em garrafas e cultivadas em 5 mL de meio

Schneider's por 24 horas na ausência de antibiótico. A seguir, as células foram pré-selecionadas com a adição de higromicina (50µg/mL) ao meio de cultura e após 48 horas. Para seleção das células recombinantes, 500µL da cultura da pré-seleção foram transferidas para outra garrafa contendo 4,5mL de meio e a concentração de higromicina foi dobrada (100µg/mL) e incubadas a 26°C novamente.

3.8 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO E PCR DE CONFIRMAÇÃO DE INTEGRAÇÃO

Para avaliar a integração correta do cassete de expressão no cromossomo da célula hospedeira, uma reação de PCR foi realizada. O DNA genômico foi utilizado para esta reação extraído da cultura de células após a seleção. O DNA genômico foi extraído através do reagente DNAzol (Life Technologies Invitrogen®) de acordo com as instruções do fabricante. Os primers utilizados para a reação (Tabela 2) são específicos para clonagens feitas com o vetor pLESXY. Foram feitas duas reações onde na primeira reação utilizaram-se os primers F3001 forward, que hibridiza na região 5`ssu presente apenas no cromossomo da célula hospedeira, e o primer A1715 reverse, que hibridiza na região utr1 presente no cassete de inserção das construções inseridas, gerando um fragmento de 1.000pb. Como controle negativo foi utilizado o DNA genômico extraído da *L. tarentolae* selvagem.

Na outra reação realizada, foi utilizado os primers A3804 forward, que hibridiza na região do gene da hyg presente no cassete de inserção das construções inseridas, e o primer F3002 reverse, hibridiza na região 3`ssu presente no cromossomo da célula hospedeira, formando um fragmento que varia entre 2.100 a 2.900pb. A reação foi realizada sob as seguintes condições: 94°C por 5`, e mais 40 ciclos de 94°C por 45`` para a desnaturação das fitas, 60°C por 30`` para o anelamento dos primers e 72°C por 1` e 30`` para a reação de extensão da polimerase. Mais uma etapa de extensão, de 72°C por 10`, foi realizada ao fim de todos os ciclos e a enzima utilizada foi a *Phusion DNA Polymerase* (New England Biolabs).

Tabela 2 - Sequência dos primers utilizados na reação de PCR para confirmação da integração do cassete de expressão.

<i>Primer</i>	Sequências	Local de hibridização
F3001	5'GATCTGGTTGATTCTGCCAGTAG 3'	Região cromossômica 5'ssu

A1715	5'TATTCGTTGTCAGATGGCGCAC 3'	Região utr1 presente no cassette de inserção
A3804	5'CGATGGCTGTGTAGAAGTACTCG 3'	Gene Hyg do cassette de inserção
F3002	5'CTGCAGGTTACCTACAGCTAC 3'	Região cromossômica 3'ssu

3.9 EXPRESSÃO PROTÉICA POR WESTERN- BLOT

A análise da expressão das proteínas de interesse foi realizada a partir de ensaios de *Western-Blotting*. O *pellet* e sobrenadante da cultura de células foram extraídos por centrifugação a 6000 rpm por 10 min a 4°C. Após a centrifugação, o *pellet* foi ressuspenso em L2X e fervido por 5 min. O sobrenadante foi precipitado com TCA10% + acetona pura e após a precipitação também foi ressuspenso com L2X. O fracionamento dos extratos protéicos foi feito por eletroforese em gel SDS-PAGE 15%. Após a corrida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF (100 mA por 1h) e esta foi submetida a um bloqueio com uma solução de leite desnatado 5% mais solução de TBS (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 7,5) e Tween-20 a 0,05% por uma hora em temperatura ambiente. Após esse processo, a membrana foi incubada com leite sob as mesmas condições citadas acima juntamente com os anticorpos CamVir-1 na concentração de 1:1000 (para as construções contendo a proteína L1) e anti-histidina na concentração de 1:3000 (para a quimera L2E5m) *over night* a 4°C. Após lavar três vezes por 10 min, a membrana foi incubada novamente com o segundo anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase numa concentração de 1:10.000 por uma hora. A visualização das proteínas foi feita por meio de uma reação de quimioluminescência e exposição a filme Biomax Light (Kodak®). Esta reação utiliza uma solução quimioluminescente que consiste em 25 ml de luminol a 1,2mM diluído em solução de Tris-HCl 0,1 M de pH 8,5 mais iodofenol com uma concentração final de 0,4 mM e peróxido de hidrogênio para 0,03%.

4 RESULTADOS

4.1 OBTENÇÃO DA QUIMERA L2E5M

A quimera L2E5m foi construída com o objetivo de gerar um imunógeno capaz de promover uma proteção mais ampla bem como proporcionar um caráter terapêutico no mesmo candidato vacinal. Uma região codificadora do gene L2 (do aminoácido 11 ao 200) foi amplificada e nela foram inseridos epítomos do gene E5 segundo é mostrado na figura 15.

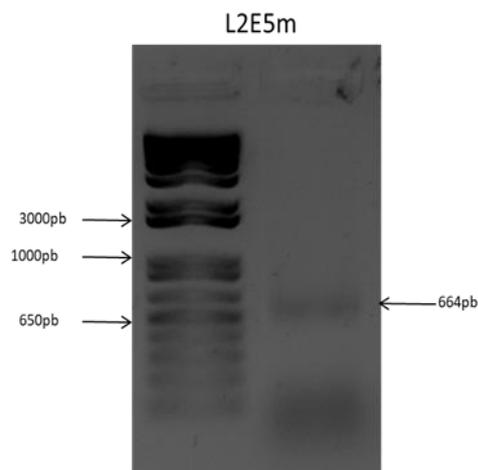
Figura 15 - Desenho esquemático da quimera L2E5m.



O gene possui sítios de restrição para as enzimas XbaI na região 5' e KpnI na região 3' e seu tamanho equivale a 664 pb. Foi amplificado o fragmento que corresponde do aminoácido 11 ao aminoácido 200 do gene L2 e a ele foram fusionados epítomos do gene E5, utilizando o DNA genômico do HPV16 como template.

Na reação de PCR, o DNA genômico do HPV 16 foi utilizado para obtenção da quimera. A figura 16 mostra o produto obtido pela reação gerando um fragmento correspondente a 664pb equivalente ao tamanho predito do gene L2E5m.

Figura 16 - Construção da quimera L2E5m por PCR.

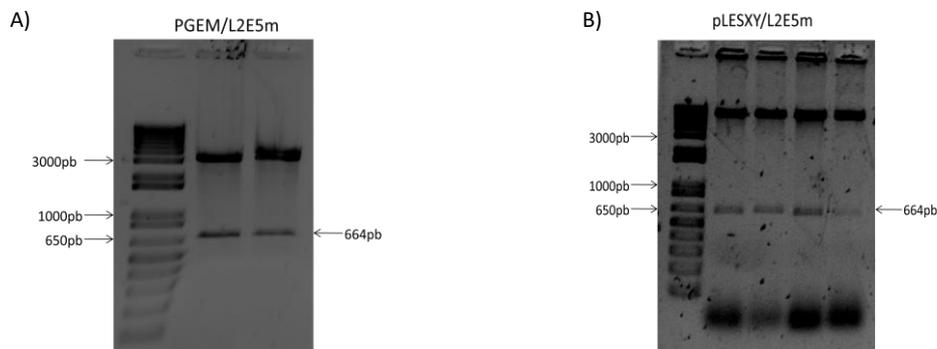


A banda representa o gene amplificado por PCR, no tamanho de 664 pb, analisado com o auxílio do marcador de peso molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen®). Eletroforese em gel de agarose 1%.

4.2- CLONAGEM DE L2E5M NO VETOR PGEM-T EASY E SUBCLONAGEM NO VETOR PLEXXSY-HYG2

Após purificação do fragmento, a quimera foi clonada no vetor pGEM- T *Easy*, foi transformada em *E.coli* TOP10 e os clones selecionados foram submetidos a extração plasmidial, confirmada através da digestão com enzimas de restrição *XbaI/KpnI* conforme mostrado na figura 17a e submetido a seqüenciamento (Anexo II). Após a confirmação, o gene quimérico foi subclonado no vetor de expressão pLEXXSY- Hyg2, cuja confirmação pode ser evidenciada pela digestão dos clones obtidos com as enzimas utilizadas no processo de clonagem como mostrado na figura 17b.

Figura 17 - Clonagem e subclonagem do gene L2E5m nos vetores pGEM-T easy e pLEXXSY-Hyg2 respectivamente.



a) Digestão de confirmação da clonagem no pGEM-T easy;

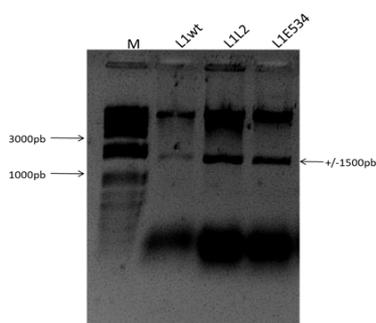
b) Digestão de confirmação da clonagem no pLEXXSY-Hyg2. Os DNAs plasmidiais extraídos foram digeridos com as enzimas *XbaI* e *KpnI* para confirmação por digestão.

4.3 SUBCLONAGEM DOS GENES L1WT, L1L2 E L1E534 NO VETOR DE EXPRESSÃO PLEXXSY-HYG2

Após a digestão enzimática e purificação dos genes, os mesmos foram subclonados no vetor de expressão pLEXXSY-Hyg2 a fim de se obter o cassete para expressão em *L. tarentolae*. Seguinte a reação de ligação, foi feita a transformação em *E.coli* TOP 10, seguido

de extração plasmidial. Foi feito também a digestão enzimática para confirmação da clonagem visualizando a liberação de bandas com os tamanhos correspondentes aos dos insertos que são, 1544pb (L1wt), 1526pb (L1L2) e 1514pb (L1E5₃₄) conforme mostrado na figura 18 e foram conseqüentemente submetidos à seqüenciamento.

Figura 18 - Subclonagem dos fragmentos gênicos L1wt, L1L2, L1E534 no vetor pLEXSY-hyg2.

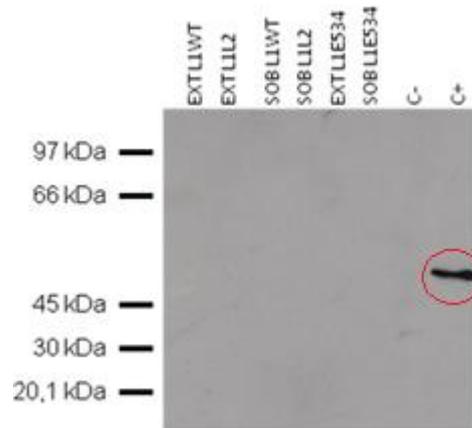


Os fragmentos foram purificados da digestão dos vetores pSP-rRNAp- $\alpha\alpha$ NEO (L1wt; L1L2) e pSP- $\alpha\alpha$ NEO (L1E534) e subclonados em vetor de expressão pLEXSY- hyg2, onde os DNAs plasmidiais extraídos foram digeridos com as enzimas XbaI e KpnI para confirmação por digestão. Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com SYBER SAFE e marcador 1Kb Plus DNA ladder para indicar os tamanhos dos DNAs de interesse.

4.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS DE INTERESSE EM *L. TARENTOLAE*

As análises de expressão foram baseadas em ensaios de *Western Blotting* dos extratos celulares e sobrenadante dos transfectantes e fracionados em gel SDS-PAGE 15%. Como resultado, utilizando o anticorpo CamVir (anti-L1) para as construções pLEXSY-Hyg2/L1wt, pLEXSY-Hyg2/L1L2 e pLEXSY-Hyg2/L1E5₃₄ foi possível visualizar apenas o controle positivo da proteína L1wt em *E.coli* como mostrado na figura 19.

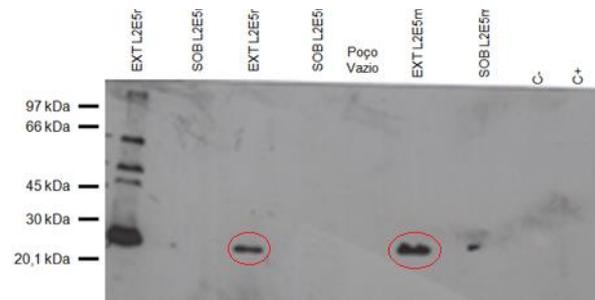
Figura 19 - Análise da expressão das proteínas baseadas em L1 de HPV 16 em *L. tarentolae*.



Extratos e sobrenadante das células transfectadas com o plasmídeo. Foi utilizado como controle negativo o extrato da *L. tarentolae* selvagem e como controle positivo, foi utilizado a proteína L1 wt purificada expressa em *E. coli*. A proteína L1 wt apresenta um tamanho de 55 kDa. O anticorpo utilizado nesse ensaio foi o CamVir, que se trata de um anticorpo monoclonal específico para a proteína L1 de HPV 16.

Com relação à construção pLEXSY-Hyg2/L2E5m, o *Western Blotting* foi feito utilizando o anticorpo anti-histidina e pode se observar a expressão da proteína de interesse, porém não foi possível visualizar a banda correspondente ao controle positivo como mostrado na figura 20.

Figura 20 - Análise da expressão da proteína L2E5m em *L. tarentolae*.

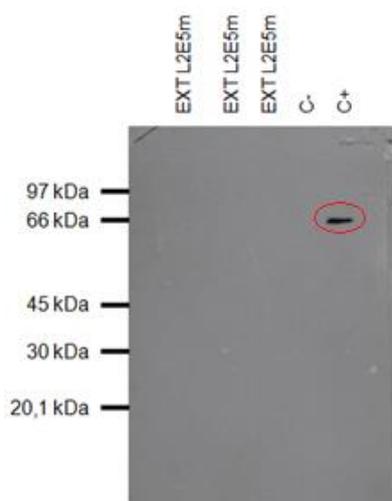


Nesse ensaio foi utilizado extratos feitos em dias diferentes como também o sobrenadante. Como controle negativo foi utilizado a *L. tarentolae* selvagem e como controle positivo, foi utilizado uma proteína purificada produzida em bactéria. O anticorpo utilizado nesse ensaio foi o anti-histidina.

O ensaio de *Western Blotting* foi repetido apenas com os extratos e com o controle negativo e positivo com o intuito de visualizar o controle positivo, porém, neste ensaio, não

foi possível visualizar a possível expressão da proteína de interesse e somente o controle positivo foi visualizado conforme é mostrado na figura 21.

Figura 21 - Repetição do ensaio de western blotting utilizando os extratos utilizados no ensaio anterior.



Assim como no ensaio anterior, foi utilizado como controle negativo o extrato da *L. tarentolae* selvagem e como controle positivo, foi utilizado uma proteína purificada produzida em bactéria.

5 DISCUSSÃO

Diante da alta incidência do câncer cervical, no qual está intimamente relacionado à infecção pelo HPV (MOSCICKI et al, 2012), a importância em se buscar estratégias vacinais alternativas se torna muito evidente. Novas plataformas de produção, aspectos baseados não só na prevenção como também no tratamento de lesões já existentes, baixo custo de produção, são alguns exemplos de novas alternativas que vem sendo estudadas ao longo dos últimos anos (BOLHASSANI et al, 2015; BAZAN, 2007; MARIZ, 2016; KUSHNIR et al ,2005). Em relação a novas plataformas de produção, vários sistemas tanto procarióticos quanto eucarióticos já vêm sendo explorados para tal finalidade.

O sistema utilizando a *Leishmania tarentolae*, desenvolvido por Breton et al, (2007), vem se destacando por oferecer mais vantagens em relação a outros sistemas de expressão, como bactérias, células de mamíferos e de insetos por exemplo, além de outros Tripanossomatídeos utilizados como sistema de expressão como os trypanosomas e leishmanias sp. Esse sistema baseia-se na utilização de um cassete de expressão que se integra ao gene da subunidade menor ribossomal das células de *L. tarentolae* (BRETON et al 2007).

É relatado que esse sistema apresenta uma série de características que o torna interessante para ser utilizado como uma plataforma alternativa para expressão de proteínas recombinantes como, por exemplo, a realização de modificações pós-traducionais nas proteínas produzidas, a facilidade de cultivo, não ser patogênico a mamíferos e pode ser manipulado em laboratórios de nível I de biossegurança (JOHNSTON E ALEXANDROV, 2014).

A utilização de *L. tarentolae* como objeto para estudos bioquímicos e de biologia molecular de Tripanossomatídeos é bem estabelecido, mas apenas recentemente esse protozoário passou a ser explorado como sistema recombinante (BRETON et al. (2007); SOLIEMANI et al. (2007); PADMANABHAN et al. (2012); BAECHILEIN et al. (2013)). Diante desses aspectos, o presente trabalho propôs primeiramente, utilizar esse sistema eucariótico como plataforma de produção de proteínas do HPV16 a partir dos genes deste subtipo viral ou construções quiméricas utilizando os mesmos genes com o objetivo de desenvolver um novo candidato vacinal baseado na inserção de epítomos do gene E5 em uma determinada sequência do gene L2, com o objetivo de gerar uma estratégia diferente de imunização que abrange uma perspectiva terapêutica com amplo espectro de proteção.

Este estudo faz parte de um projeto maior desenvolvido por Mariz (2016) em que foi analisada a expressão epissomal das mesmas proteínas (L1wt, L1L2 e L1E5₃₄) utilizadas aqui como objeto de estudo, utilizando *Pichia Pastoris* como sistema de expressão paralelamente ao sistema de *L. tarentolae*. Tal estratégia originou duas plataformas biotecnológicas de expressão para produção de candidatos vacinais contra HPV e BPV. Entretanto, a utilização de um sistema integrativo é importante para desenvolver plataformas biotecnológicas com fins vacinais, devido à maior estabilidade genética oferecida (MARIZ, 2016). Diante disso, a estratégia abordada nesse estudo foi a utilização de um sistema integrativo para analisar o comportamento das mesmas proteínas estudadas no trabalho anterior.

Contudo, a estratégia de obtenção dos genes L1wt, L1L2 e L1E5₃₄ gerou após uma avaliação mais detalhada das sequências no plasmídeo pLESXY-Hyg2 com os genes que as mesmas não se encontravam na matriz de leitura correta não sendo possível a visualização da expressão dessas proteínas nas células recombinante da *L. tarentolae*. A alternativa para contornar esse problema, é o desenho de novos primers que permitam que as sequências, quando subclonadas no vetor de expressão, apresentem a fase corretamente.

Com relação à construção L2E5m, o gene quimérico foi construído com sucesso por PCR, clonado e subclonado corretamente no vetor de expressão e obtida as células de *L. tarentolae* recombinantes. Porém, não foi possível demonstrar a integração do gene ao genoma da célula através de PCR. Esse fato pode sugerir que, durante o processo de recombinação o gene de resistência permaneceu na célula, mas o gene de interesse não. Entretanto, durante um ensaio para identificação da proteína recombinante produzida foi possível visualizar a expressão de uma proteína no tamanho adequado, porém não foi possível a visualização do controle positivo, fazendo com que este ensaio fosse repetido sob as mesmas condições, utilizando as mesmas amostras, o que nos deu um resultado bastante curioso com a não visualização das bandas da proteína e com a visualização da banda correspondente ao controle positivo.

Os ensaios de expressão foram repetidos exaustivas vezes, mas não obtivemos sucesso. Paralelamente as análises feitas no sistema de *L. tarentolae*, durante os últimos meses de experimentos, iniciou-se juntamente com o auxílio de uma aluna de graduação, a obtenção do gene quimérico L2E5m em vetores de expressão para bactéria (PET e prSET-A) para produzir esta proteína recombinante e anticorpo necessário para sua detecção a fim de analisar o comportamento dessa proteína em um sistema procarioto para futuras análises de comparação com o sistema utilizado neste estudo, visto o ineditismo desta construção.

Embora, a expressão da proteína L2E5m ter sido detectada transitoriamente ou até mesmo não ter sido detectada, podem-se citar vários outros genes que foram expressos com sucesso no sistema proposto para esse trabalho como, por exemplo, a proteína E7 de HPV (SALEHI M et al. 2012), a proteína Gag do HIV (BRETON M et al. 2007) a proteína L1 de HPV (BOLHASSANI et al, 2015) bem como algumas das construções utilizadas nesse estudo (MARIZ, 2016).

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A obtenção de proteínas a partir do sistema *L. tarentolae* apresenta o potencial de diminuir os custos de produção das vacinas anti-HPV, visto a capacidade de cultivo celular em meios simples e os altos níveis de expressão relatados para o sistema recombinante em questão. Além disso, o emprego das quimeras estudadas como imunógenos preencheria uma lacuna essencial, visto que não existem atualmente vacinas terapêuticas contra o HPV. Contudo, com os resultados apresentados no presente trabalho não foi possível avaliar de forma eficaz, a expressão das proteínas heterólogas utilizadas no estudo e com isso avaliar também viabilidade do sistema *L. tarentolae* para essas proteínas.

Com relação às quimeras L1wt, L1L2 e L1E5₃₄, a subclonagem no vetor de expressão pLEXS_Y-Hyg2 não foi eficaz necessitando assim, para contornar o problema apresentado, do desenho de novos primers que possibilite o processo correto de subclonagem o que já foi providenciado para posteriormente as análises serem retomadas. Os resultados referentes à quimera L2E5m construída durante o estudo, também não foram conclusivos em relação à sua expressão através do sistema utilizado. O gene foi amplificado por PCR e clonado no vetor pLEXS_Y-Hyg2 com sucesso assim como as análises de sequenciamento mostraram que o gene não sofreu nenhuma mutação em sua sequência de nucleotídeos que fosse capaz de alterar a sequência de aminoácidos da proteína resultante como demonstrado em análises *in silico* das sequências traduzidas.

Durante o cultivo e manipulação das células recombinantes de *L. tarentolae* todos os indícios levaram a crer que as células teriam adquirido o plasmídeo recombinante devido à seleção feita com antibiótico, porém, durante as análises por *western blotting*, esse fato não pôde ser constatado uma vez que não foi possível a detecção da expressão da proteína referida, o que sugere mais conhecimentos em relação ao sistema utilizado para contornar as dificuldades encontradas uma vez que a utilização deste sistema pode ser considerada ainda nova na comunidade científica como também pelo nosso grupo de pesquisa.

Por fim, apesar dos resultados não terem sido totalmente satisfatórios, um fato deve ser salientado. A construção do gene L2E5m é inédita, apesar de não ser alvo do objetivo central do estudo, é importante evidenciar que a utilização de tal quimera permitirá o desenvolvimento de uma nova estratégia vacinal para a problemática infecção por HPV ainda inexistente.

REFERÊNCIAS

- Bazan S., Expressão da Proteína L1 do Capsídio de HPV-16 em Leveduras Metilotróficas. [Dissertação]. 2007.
- Basile G; Peticca M. Recombinant protein expression in *Leishmania tarentolae*. *Mol Biotechnol.* 43(3): 273-278, 2009.
- Bolanca I.K, Sentija K, Simon S.K, Kukura V, Vranes J. Estimating clinical outcome of HPV induced cervical lesions by combination of capsid protein L1 and p16INK4a protein detection. *Coll. Antropol.* 34 (2010) 1: 31–36.
- Bishop B, Dasgupta J, Chen XS. Structure-based engineering of papillomavirus major capsid 11: controlling particle assembly. *Virology*, 2007; 4:3.
- Bian T, Wang Y, Lu Z, Ye Z, Zhao L, Ren J, Zhang H, Ruan L e Tian H. Human papillomavirus type 16 L1E7 chimeric capsomeres have prophylactic and therapeutic efficacy against papillomavirus in mice. *Mol Cancer Ther.* 7: 2008; 1329-1335.
- Breitling R, Klingner S, Callewaert N, Pietrucha R, Geyer A, Ehrlich G, Hartung R, Müller A, Contreras R, Beverley SM and Alexandrov K. Non-pathogenic trypanosomatid protozoa as platform for protein research and production. *Protein Expr Purif.* 2002 Jul; 25(2): 209-18.
- Baechlein C., Meemken D., Pezzoni G., Engemann C., Grummer B. Expression of a truncated hepatitis E virus capsid protein in the protozoan organism *Leishmania tarentolae* and its application in a serological assay. *Journal of Virological Methods* 193 2013; 238-243.
- Bolhassani A, Taheri T, Taslimi Y, Zamanilui S, Zahedifard F, Seyed N, Torkashvand F, Vaziri B, Rafati S. Fluorescent *Leishmania* species: development of stable GFP expression and its application for in vitro and in vivo studies. *Exp Parasitol.* 2015 Mar; 127(3): 637-45.
- Bruni, L.; Barrionuevo-Rosas, L.; Albero, G.; Aldea, M.; Serrano, B.; Valencia, S.; Brotons, M.; MENA, M.; Cosano, R.; Muñoz, J.; Bosch, F.; De Sanjosé, S.; Castellsagué, X. Human Papillomavirus and Related Diseases in the worldsummary. Report 2015-04-08.
- Bravo, I. G.; Félez-Sánchez, M. Papillomaviruses: Viral evolution, cancer and evolutionary medicine. *Evolution, Medicine, and Public Health*, v. 2015, n. 1, p. 32–51, jan 2015.
- Breton, M.; Zhao, C.; Ouellette, M.; Tremblay, M. J.; Papadopoulou, B. A recombinant non-pathogenic *Leishmania* vaccine expressing human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) Gag elicits cell-mediated immunity in mice and decreases HIV-1 replication in human tonsillar tissue following exposure to HIV-1 infection. *The Journal of general virology*, v. 88, n. Pt 1, p. 217–25, jan. 2007.
- Chagas BS. Avaliação de possível alteração dos genes E6 e E7 do Papillomavirus humano tipos 18 e 31 e sua relação com o polimorfismo do códon 72 do gene TP53 em lesões de colo de útero de pacientes da região nordeste do Brasil. [Dissertação]. Recife: O autor; 2010.

Castro-Vásquez MC, Arellano-Gálvez MC. Acceso a la información de mujeres con VPH, displasia y cancer cervical in situ. *Salud Publica Mex* 2010; 52:207-212.

Dochez C., Bogers J.J., Verhelst R., Rees H. HPV vaccines to prevent cervical cancer and genital warts: an update. *Vaccine* 32 (2014) 1595–1601.

Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci.* (2006) 110: 525–541.

Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, Stanley MA. The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. *Vaccine.* (2012) 30S: F55– F70.

Doorbar J., Egawa N., Griffin H., Kranjec C., Murakami I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Rev. Med. Virol.* 2015; 25:2 –23.

Eisntein M. H., Schiller R. P., Viscidi H. D., Strickler P., Tan N. Clinician’s guide to human papillomavirus immunology: knowns and unknowns. *Lancet Infect Dis.* 2009; 9(6): 347-356.

Fay, A.; Yutzy, W.H. 4th, Roden, R.B.; Moroianu, J. The positively charged termini of L2 minor capsid protein required for bovine papillomavirus infection function separately in nuclear import and DNA binding. *J Virol*, v. 78, p. 13447-13454, 2004.

Freitas A.C.; Mariz F.C.; Coimbra E.C.; Cordeiro M.N.; Jesus A.L.S. Vaccine Strategies against Human Papillomavirus: A Discussion Focused on Developing Countries. *J Clin Cell Immunol.* 2012; S4:004.

Ferlay, J.; Soerjomataram I, I.; Dikshit, R.; Eser, S.; Mathers, C.; Rebelo, M.; Parkin, D. M.; Forman D, D.; Bray, F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, v. 386, 13 set. 2014.

Gurgel A.P.A.D., Chagas B.S., Amaral C.M.M., Albuquerque E.M.B., Serra I.G.S.S., Neto J.C.S., Muniz M.T.C., Freitas A.C. Prevalence and Genetic Variability in Capsid L1 Gene of Rare Human Papillomaviruses (HPV) Found in Cervical Lesions of Women from North-East Brazil. *BioMed Research International* 2013.

Gopal GJ, Kumar A Strategies for the Production of Recombinant Protein in *Escherichia coli*. *Prot J.* (2013) 32: 419–425.

Harper D. M., Franco E. L., Wheeler C. M., Moscicki A. B., Romanowski B., Roteli-Martins C. M, Jenkins D., Schuind A., Clemens S. A. C., Dubin G. Sustained efficacy up to 4·5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial. *Lancet.* 2006; Vol 367.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Tipos de câncer; Colo do útero. 2016. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colo_uterо/definicao>.

Johnston WA, Alexandrov K. Production of eukaryotic cell-free lysate from *Leishmania tarentolae*. In: *Cell-Free Protein Synthesis*. Humana Press, p. 1-15, 2014.

Kim S-W, Yang J-S Human Papillomavirus Type 16 E5 Protein as a Therapeutic Target. *Yonsei Med J.* 2006; 47(1):1-14.

Karlen, S.; Beard, P. Identification and Characterization of Novel Promoters in the Genome of Human Papillomavirus Type 18. *Journal of Virology*, v. 67, n. 7, p. 4296–4306, 1993.

Kushnir, S.; Gase, K.; Breitling, R.; Alexandrov, K. Development of an inducible protein expression system based on the protozoan host *Leishmania tarentolae*. *Protein expression and purification*, v. 42, n. 1, p. 37–46, jul. 2005.

Li M, Cripe TP, Estes PA, Lyon MK, Rose RC, Garcea RL. Expression of the human papillomavirus type 11 L1 capsid protein in *Escherichia coli*: characterization of protein domains involved in DNA binding and capsid assembly. *J Virol.* 1997; 71:2988–2995.

Lima M.A.P., Silva C.G.L., Rabenhors S.H.B., Papel das Proteínas Precoces do Papilomavírus Humano na Carcinogênese. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2013; 59(4): 565-573.

Liao SJ1, Deng DR, Zeng D, Zhang L, Hu XJ, Zhang WN, Li L, Jiang XF, Wang CY, Zhou JF, Wang SX, Zhang HW, Ma D. HPV16 E5 peptide vaccine in treatment of cervical cancer in vitro and in vivo. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2013 Oct;33(5):735-42. doi: 10.1007/s11596-013-1189-5.

Leto MGP, Santos Jr GF, Porro AM, Tomimori J. Infecção pelo papilomavirus humano: etiopatogenia, biologia molecular e manifestações clínicas. *An Bras Dermatol.* 2011; 86(2):306-317.

Lin K, Roosinovich E, Ma B, Hung C-F, Wu T-C. Therapeutic HPV DNA vaccines. *Immunol Res.* (2010) 47:86–112.

Mello C.F., Vaccination against human papillomavirus. *einstein.* 2013; 11(4):547-9.

Mariz F. C., Desenvolvimento de duas plataformas biotecnológicas baseadas em *Pichia pastoris* e *Leishmania tarentolae* para produção de candidatos vacinais contra o HPV e BPV. Tese de doutorado. Recife, 2016.

Moscicki A-B, Schiffman M, Burchell A, Albero G, Giuliano AR, Goodman MT, Kjaer SK, Palefsky J. Updating the Natural History of Human Papillomavirus and Anogenital Cancers. *Vaccine* 30S: (2012) F24– F33.

Modis Y; Trus BL; Harrison SC. Atomic model of the papillomavirus capsid. *The EMBO Journal.* 2002; 21(18): 4754-4762.

Muñoz N., Bosch F., Sanjosé S., Herrero R., Castellsangué X., Shah K. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *N Engl J Med* 2003;348:518-27.

Padmanabhan, P. K.; Dumas, C.; Samant, M.; Rochette, A.; Simard, M. J.; Papadopoulou, B. Novel features of a PIWI-like protein homolog in the parasitic protozoan *Leishmania*. *PLoS One*, v. 7, n. 12, p. e52612, jan. 2012.

Piqué, X. C.; José, F. X. Vacunas frente al virus del papiloma humano. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, Barcelona, v. 26, n. 1, p. 65-77, 2008.

Roden R.B.S., Yutzy W.H., Fallon R., Inglis R., Lowy D.R., Schiller J.T. Minor Capsid Protein of Human Papillomaviruses Contains Subdominant, Cross-Neutralizing Epitopes. *Virology* 270, 254-257 (2000).

Raymond F., Boisvert S., Roy G., Ritt J., Légaré D., Isnard A., Stanke M., Olivier M., Tremblay M.J., Papadopoulou B., Ouellette M., Corbeil J. Genome sequencing of the lizard parasite *Leishmania tarentolae* reveals loss of genes associated to the intracellular stage of human pathogenic species. *Nucleic Acids Res.*40(3):1131-47, 2011.

Silva M.F.P.T.B., Guimarães V., Silva M.A.R., Amaral C.M.M., Beçak W., Stocco R. C., Freitas A.C., Crovella S. Frequency of human papillomavirus types 16, 18, 31, and 33 and sites of cervical lesions in gynecological patients from Recife, Brazil. *Genetics and Molecular Research* 11 (1): 462-466, 2012.

Soleimani, M.; Mahboudi, F.; Davoudi, N.; Amanzadeh, A.; Azizi, M.; Adeli, A.; Rastegar, H.; Barkhordari, F.; Mohajer-Maghari, B. Expression of human tissue plasminogen activator in the trypanosomatid protozoan *Leishmania tarentolae*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 48, n. 1, p. 55–61, 2007.

Su JH,Wu A, Scotney E, Ma B, Monie A, Hung CF, Wu TC. Immunotherapy for cervical cancer: research status and clinical potential. *BioDrugs*. 2010; 24:109–129.

Stanley MA. Human papillomavirus vaccines. *Rev Medl Virol*. 16(3): 139– 149, 2005.

Schiller JT, Castellsague X,Garland SM. A Review of Clinical Trials of Human Papillomavirus Prophylactic Vaccines. 30S: F123– F138, 2012.

Schiller, J. T.; Lowy, D. R. Understanding and learning from the success of prophylactic human papillomavirus vaccines. *Nature Reviews Microbiology*, v. 10, n. 10, p. 681–92, 2012.

Schiller, J.; Müller, M. Next generation prophylactic human papillomavirus vaccines. *The Lancet Oncology*, v. 16, n. 5, p. e217–25, maio 2015.

Sousa MA. Tripanossomatídeos de insetos e plantas: análise do crescimento, diferenciação e divisão celular, biometria e fenômenos sugestivos de sexualidade: valor taxonômico. Tese de Doutorado, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro. 2000.

Salehi M, Taheri T, Mohit E, Zahedifard F, Seyed N, Taslimi Y, Sattari M, Bolhassani A, Rafati S. Recombinant *Leishmania tarentolae* encoding the HPV type 16 E7 gene in tumor mice model. *Immunotherapy*. 2012 Nov; 4(11): 1107-20.

Stemberger- Papié S., Vrdoljak-Mozetié D., Versa Ostojié D., Rubesa-Mihaljevié R., Manestar M. Evaluation of the HPV L1 Capsid Protein in Prognosis of Mild and Moderate Dysplasia of the Cervix Uteri. *Coll. Antropol*. 34; 2010; 2: 419–423.

Wang JW; Roden RBS. L2, the minor capsid protein of papillomavirus. *Virology*. 2013; 445: 175–186.

Wilson VG, West M, Woytek K, Rangasamy D. Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features. *Virus Genes*. 24: 275–290, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer; Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs380/en/>>. Acesso em: 11 ago. 2016. (Summary Report 2016).

Wu W-H, Alkutkar T, Karanam B, Roden RBS, Ketner G, Ibeanu OA. Capsid display of a conserved human papillomavirus L2 peptide in the adenovirus 5 hexon protein: a candidate prophylactic hpv vaccine approach. *Virology*. 2015; 12:140.

Yin J, Li G, Ren X, Herrler G. Select what you need: a comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *J. Biotechnol.* 2007 jan 10; 127(3): 335–47.

APÊNDICE

APÊNDICE A- SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DOS GENES L1WT, L1L2, L1E5₃₄ E L2E5M

L1wt HPV 16

GCGATATCTCTAGAGCCATGTCTCTTTGGCTGCCTAGTGAGGCCACTGTCT
 ACTTGCCTCCTGTCCCAGTATCTAAGGTTGTAAGCACGGATGAATATGTTGCACG
 CACAAACATATATTATCATGCAGGGACATCCAGACTACTTGCAGTTGGACATCCC
 TATTTTCCTATTAACAAAACCTAACATAACAAAATATTAGTTCCTAAAGTATCAG
 GATTACAATACAGGGTATTTAGAATACATTTACCTGACCCCAATAAGTTTGGTTTT
 CCTGACACCTCATTTTATAATCCAGATACACAGCGGCTGGTTTGGGCCTGTGTAG
 GTGTTGAGGTAGGCCGTGGTCAGCCATTAGGTGTGGGCATTAGTGGCCATCCTTT
 ATTAAATAAATTGGATGACACAGAAAATGCTAGTGCTTATGCAGCAAATGCAGGT
 GTGGATAATAGAGAATGTATATCTATGGATTACAAACAAACACAATTGTGTTAA
 TTGGTTGCAAACCACCTATAGGGGAACACTGGGGCAAAGGATCCCCATGTACCA
 ATGTTGCAGTAAATCCAGGTGATTGTCCACCATTAGAGTTAATAAACACAGTTAT
 TCAGGATGGTGATATGGTTGATACTGGCTTTGGTGCTATGGACTTTACTACATTAC
 AGGCTAACAAAAGTGAAGTTCCACTGGATATTTGTACATCTATTTGCAAATATCC
 AGATTATATTAATAATGGTGTGAGAACCATATGGCGACAGCTTATTTTTTTATTTAC
 GGAGGGAACAAATGTTTGTAGACATTTATTTAATAGGGCTGGTGCTGTTGGTGA
 AAATGTACCAGACGATTTATACATTAAAGGCTCTGGGTCTACTGCAAATTTAGCC
 AGTTCAAATATTTTCCTACACCTAGTGGTTCTATGGTTACCTCTGATGCCCAAAT
 ATTCAATAAACCTTATTGGTTACAACGAGCACAGGGCCACAATAATGGCATTGT
 TGGGGTAACCAACTATTTGTTACTGTTGTTGATACTACACGCAGTACAAATATGTC
 ATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAACTACATATAAAAATACTAACTTTAAG
 GAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTTATTTTTCAACTGTGCA
 AAATAACCTTAACTGCAGACGTTATGACATACATACATTCTATGAATCCACTATT
 TTGGAGGACTGGAATTTTGGTCTACAACCTCCCCAGGAGGCACACTAGAAGATA
 CTTATAGGTTTGTAAACATCCCAGGCAATTGCTTGTCAAAAACATACACCTCCAGC
 ACCTAAAGAAGATCCCCTTAAAAAATACACTTTTTGGGAAGTAAATTTAAAGGAA
 AAGTTTTCTGCAGACCTAGATCAGTTTCCTTTAGGACGCAAATTTTTACTACAAGC
 AGGATTGAAGGCCAAACCAAATTTACATTAGGAAAACGAAAAGCTACACCCAC
 CACCTCATCTACCTCTACAACCTGCTAAACGCAAAAACGTAAGCTGTAAAAGCTT
 GGG

L1-L2 HPV 16

GCGATATCTCTAGAGCCATGTCTCTTTGGCTGCCTAGTGAGGCCACTGTCT
ACTTGCCTCCTGTCCCAGTATCTAAGGTTGTAAGCACGGATGAATATGTTGCACG
CACAAACATATATTATCATGCAGGGACATCCAGACTACTTGCAGTTGGACATCCC
TATTTTCCTATTAACAAAACCTAACAAATAACAAAATATTAGTTCCTAAAGTATCAG
GATTACAATACAGGGTATTTAGAAATACATTTACCTGACCCCAATAAGTTTGGTTTT
CCTGACACCTCATTTTATAATCCAGATACACAGCGGCTGGTTTGGGCCTGTGTAG
GTGTTGAGGTAGGCCGTGGTCAGCCATTAGGTGTGGGCATTAGTGGCCATCCTTT
ATTAAATAAATTGGATGACACAGAAAATGCTAGTGCTTATGCAGCAAATGCAGGT
GTGGATAATAGAGAATGTATATCTATGGATTACAAACAAACACAATTGTGTTTAA
TTGGTTGCAAACCACCTATAGGGGAACACTGGGGCAAAGGATCCCCATGTACCA
ATGTTGCAGTAAATCCAGGTGATTGTCCACCATTAGAGTTAATAAACACAGTTAT
TCAGGATGGTGATATGGTTGATACTGGCTTTGGTGCTATGGACTTTACTACATTAC
AGGCTAACAAAAGTGAAGTTCCACTGGATATTTGTACATCTATTTGCAAATATCC
AGATTATATTAATAATGGTGTGAGAACCATATGGCGACAGCTTATTTTTTTATTTAC
GGAGGGAACAAATGTTTGTAGACATTTATTTAATAGGGCTGGTGCTGTTGGTGA
AAATGTACCAGACGATTTATACATTAAAGGCTCTGGGTCTACTGCAAATTTAGCC
AGTTCAAATTATTTTCCTACACCTAGTGGTTCTATGGTTACCTCTGATGCCCAAAT
ATTCAATAAACCTTATTGGTTACAACGAGCACAGGGCCACAATAATGGCATTGT
TGGGGTAACCAACTATTTGTTACTGTTGTTGATACTACACGCAGTACAAATATGTC
ATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAACTACATATAAAAATACTAACTTTAAG
GAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTTATTTTTCAACTGTGCA
AAATAACCTTAACTGCAGACGTTATGACATACATACATTCTATGAATTCCACTATT
TTGGAGGACTGGAATTTTGGTCTACAACCTCCCCAGGAGGCACAGGCGGCCTGG
GCATCGGCACGGGCAGCGGCACGGGCGGCCGCACGGGCTACATCCCGCTGCCCC
TTAAAAAATACTTTTTGGGAAGTAAATTTAAAGGAAAAGTTTTCTGCAGACCT
AGATCAGTTTCCTTTAGGACGCAAATTTTACTACAAGCAGGATTGAAGGCCAAA
CCAAAATTTACATTAGGAAAACGAAAAGCTACACCCACCACCTCATCTACCTCTA
CAACTGCTAAACGCAAAAAACGTAAGCTGTAAAAGCTTGGG

L1-E5₃₄ HPV 16

GCGATATCTCTAGAGCCATGTCTCTTTGGCTGCCTAGTGAGGCCACTGTCT
ACTTGCCTCCTGTCCCAGTATCTAAGGTTGTAAGCACGGATGAATATGTTGCACG
CACAAACATATATTATCATGCAGGGACATCCAGACTACTTGCAGTTGGACATCCC
TATTTTCCTATTAACAAAACCTAACAAATAACAAAATATTAGTTCCTAAAGTATCAG
GATTACAATACAGGGTATTTAGAATACATTTACCTGACCCCAATAAGTTTGGTTTT
CCTGACACCTCATTTTATAATCCAGATACACAGCGGCTGGTTTTGGGCCTGTGTAG
GTGTTGAGGTAGGCCGTGGTCAGCCATTAGGTGTGGGCATTAGTGGCCATCCTTT
ATTAAATAAATTGGATGACACAGAAAATGCTAGTGCTTATGCAGCAAATGCAGGT
GTGGATAATAGAGAATGTATATCTATGGATTACAAACAAACACAATTGTGTTTAA
TTGGTTGCAAACCACCTATAGGGGAACACTGGGGCAAAGGATCCCCATGTACCA
ATGTTGCAGTAAATCCAGGTGATTGTCCACCATTAGAGTTAATAAACACAGTTAT
TCAGGATGGTGATATGGTTGATACTGGCTTTGGTGCTATGGACTTTACTACATTAC
AGGCTAACAAAAGTGAAGTTCCACTGGATATTTGTACATCTATTTGCAAATATCC
AGATTATATTAATAATGGTGTGAGAACCATATGGCGACAGCTTATTTTTTTTATTTAC
GGAGGGAACAAATGTTTGTAGACATTTATTTAATAGGGCTGGTGCTGTTGGTGA
AAATGTACCAGACGATTTATACATTAAAGGCTCTGGGTCTACTGCAAATTTAGCC
AGTTCAAATTATTTTCCTACACCTAGTGGTTCTATGGTTACCTCTGATGCCCAAAT
ATTCAATAAACCTTATTGGTTACAACGAGCACAGGGCCACAATAATGGCATTGT
TGGGGTAACCAACTATTTGTTACTGTTGTTGATACTACACGCAGTACAAATATGTC
ATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAACTACATATAAAAATACTAACTTTAAG
GAGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTTATTTTTCAACTGTGCA
AAATAACCTTAACTGCAGACGTTATGACATACATACATTCTATGAATTCCACTATT
TTGGAGGACTGGAATTTTGGTCTACAACCTCCCCAGGAGGCACACTAGAAGATA
CTTATAGGTTTGTAAACATCCCAGGCAATTGCTTGTCAAAAACATACACCTCCAGC
ACCTAAAGAAGATCCCCTTAAAAAATACACTTTTTTGGGAAGTAAATTTAAAGGAA
AAGTTTTCTGCAGACCTAGATCAGTTTCCTTTAGGACGCAAATTTTTACTACAAGC
GGCGTACGTGTGCCTGCTGATCCGCCCGCTGCTGGCGGCGTACTACATCATCTTC
GTGTACATCCCGCTGTAAAAGCTTGGG

L2 (11-200aa)-E5m HPV 16

GCTCTAGAGCCATGAAACGTGCATCGGCTACCCAAC TTTATAAAAACATGCA
AACAGGCAGGTACATGTCCACCTGACATTATACCTAAGGTTGAAGGCAAAACTAT
TGCTGAACAAATATTACAATATGGAAGTATGGGTGTATTTTTTGGTGGGTTAGGA
ATTGGAACAGGGTCGGGTACAGGCGGACGCACTGGGTATATTCCATTGGGAACA
AGGCCTCCCACAGCTACAGATACACTTGCTCCTGTAAGACCCCCTTTAACAGTAG
ATCCTGTGGGCCCTTCTGATCCTTCTATAGTTTCTTTAGTGGAAGAACTAGTTTT
ATTGATGCTGGTGCACCAACATCTGTACCTTCCATTCCCCAGATGTATCAGGATT
TAGTATTACTACTTCAACTGATACCACACCTGCTATATTAGATATTAATAATACTG
TACTACTGTTACTACACATAATAATCCCACTTTCCTGACCCATCTGTATTGCAG
CCTCCAACACCTGCAGAACTGGAGGGCATTTTACACTTTCATCATCCACTATTA
GTACACATAATTATGAAGAAATTCCTATGGATACAGCGGCGTACGTGTGCCTGCT
GATCCGCCCCTGCTGGCGGCGTACTACATCATCTTCGTGTACATCCCGCTGGGT
ACCC

APÊNDICE B- SEQUENCIAMENTO DA CONSTRUÇÃO L2E5M NO VETOR PLEXY-SY-HYG2

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
Contig L2E5m  GCTGCTCGCACGCTCTTCACGCTCCTGCTTTCTTGTCTGTGCCTTGCCACCAGATCTGCCATGGCCTCGAGGCTCGTCCGTGTGCTGG
L2E5m  -----

      110     120     130     140     150     160     170     180
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
Contig L2E5m  TGGTTGACAGCGGCCGTGTCCGTGACGCTGGCGCCTCTCTAGACGCCATGAAACGTGCATCGGCTACCCAACTTTATAAAACATGCAA
L2E5m  -----CGCCATGAAACGTGCATCGGCTACCCAACTTTATAAAACATGCAA

      210     220     230     240     250     260     270     280
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
Contig L2E5m  ATGTCCACCTGACATTATACCTAAGGTTGAAGGCAAAACTATTGCTGATCAAATATTACAATATGGAAGTATGGGTGTATTTTTTGGT
L2E5m  ATGTCCACCTGACATTATACCTAAGGTTGAAGGCAAAACTATTGCTGATCAAATATTACAATATGGAAGTATGGGTGTATTTTTTGGT

      310     320     330     340     350     360     370     380
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
Contig L2E5m  GGAACAGGGTCGGGTACAGGCGGACGCACCTGGGTATATTCATTGGGAACAAGGCCTCCCACAGCTACAGATACACTTGTCTCCTGTAA
L2E5m  GGAACAGGGTCGGGTACAGGCGGACGCACCTGGGTATATTCATTGGGAACAAGGCCTCCCACAGCTACAGATACACTTGTCTCCTGTAA

      410     420     430     440     450     460     470     480
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
Contig L2E5m  CAGTAGATCCTGTGGGCCCTTCTGATCCTTCTATAGTTTCTTTAGTGAAGAAACTAGTTTTATTGATGCTGGTGCACCAACACTCTGT
L2E5m  CAGTAGATCCTGTGGGCCCTTCTGATCCTTCTATAGTTTCTTTAGTGAAGAAACTAGTTTTATTGATGCTGGTGCACCAACACTCTGT

      510     520     530     540     550     560     570     580
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
Contig L2E5m  CCCAGATGTATCAGGATTTAGTATTACTACTTCAACTGATACCACCTGCTATATTAGATATTAATAAATACTGTACTACTGTTACT
L2E5m  CCCAGATGTATCAGGATTTAGTATTACTACTTCAACTGATACCACCTGCTATATTAGATATTAATAAATACTGTACTACTGTTACT

      610     620     630     640     650     660     670     680
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
Contig L2E5m  CCCACTTTCACTGACCCATCTGTATTGCAGCCTCCAACACCTGCAGAAACTGGAGGGCATTTTACACTTTTCATCATCCACTATTAGTA
L2E5m  CCCACTTTCACTGACCCATCTGTATTGCAGCCTCCAACACCTGCAGAAACTGGAGGGCATTTTACACTTTTCATCATCCACTATTAGTA

      710     720     730     740     750     760     770     780
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
Contig L2E5m  AAGAAATTCCTATGGATACAGCGGCTACGTGTGCCTGCTGATCCGCCCGCTGCTGGCGGCTACTACATCATCTTCGTGTACATCCC
L2E5m  AAGAAATTCCTATGGATACAGCGGCTACGTGTGCCTGCTGATCCGCCCGCTGCTGGCGGCTACTACATCATCTTCGTGTACATCCC

      810     820     830     840     850     860     870     880
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
Contig L2E5m  CCACCATCACCACCTAGGCGGCCCTCCTCCTCTTTCTTGTCTTTTACGTCGCCTTCTCGGTGTAGCTGCAGAC
L2E5m  -----

```