

**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética**

Gabriel Henrique de Arruda Cardozo

**Clonagem e expressão do antígeno sintético E5 multiepítomos 2 de HPV 16 em
*Leishmania tarentolae***

**Recife
2020**

Gabriel Henrique de Arruda Cardozo

**Clonagem e expressão do antígeno sintético E5 multiepítomos 2 de HPV 16 em
*Leishmania tarentolae***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas
Coorientador: Dra. Anna Jéssica Duarte Silva

**Recife
2020**

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Cardozo, Gabriel Henrique de Arruda

Clonagem e expressão do antígeno sintético E5 multiepítopos 2 de HPV 16 em *Leishmania tarentolae* / Gabriel Henrique de Arruda Cardozo. - 2020.

54 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas.

Coorientador: Dra. Anna Jéssica Duarte Silva

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Genética, Recife, 2020. Inclui referências.

1. Útero - Câncer. 2. Papilomavírus. 3. Vacinas. I. Freitas, Antonio Carlos de (orientador). II. Silva, Anna Jéssica Duarte (coorientadora). III. Título.

616.99466

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2021-074

Gabriel Henrique de Arruda Cardozo

**Clonagem e expressão do antígeno sintético E5 multiepítomos 2 de HPV 16 em
*Leishmania tarentolae***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Genética.

Aprovada em: 25/11/2020

Banca Examinadora

Dra. Cristiane Moutinho Lagos de Melo
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Valdir de Queiroz Albino
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Jacinto da Costa Silva Neto
Universidade Federal de Pernambuco

RESUMO

O Papilomavírus humano (HPV) é um vírus de tamanho pequeno, capsídeo icosaédrico, não envelopado e com DNA circular de fita dupla que apresenta tropismo pelo epitélio humano. Sabe-se que a infecção persistente por HPVs de alto risco é condição necessária para o desenvolvimento do câncer de colo uterino, e possui relação com carcinomas genitais, de orofaringe e pulmão. A proteína E5 do HPV 16 está associada ao desenvolvimento do câncer cervical, e contribui para a carcinogênese através de diferentes vias. Devido a expressão de E5 nos estágios iniciais da transformação celular, vacinas terapêuticas direcionadas a essa proteína podem prevenir lesões pré-malignas de progredirem para câncer cervical invasivo. Porém, nenhuma estratégia até então mostrou-se totalmente eficaz contra os tumores associados ao HPV. Dentre os tipos de vacinas existentes, o uso de *Leishmania tarentolae* como vetor vacinal tornou-se uma estratégia promissora, devido sua capacidade imunoestimulante. Nesse sentido, o presente trabalho tem como objetivo a produção da proteína E5 multiepítotos 2 (E5-M2) de HPV 16 em *Leishmania tarentolae*, como parte de uma estratégia vacinal terapêutica contra o câncer cervical. Inicialmente, o gene sintético E5-M2 foi clonado no vetor de expressão pSP-BT1.YNEO α , gerando a construção pSP-BT1.YNEO α _E5-M2. Células de *L. tarentolae* foram então transfectadas por eletroporação com a construção pSP-BT1.YNEO α _E5-M2 e selecionadas em BHI acrescido do antibiótico G418. O extrato protéico proveniente da lise dos protozoários transfectados foi submetido a SDS-PAGE, sendo observada a produção da proteína E5-M2. Posteriormente, as linhagens recombinantes de *Leishmania tarentolae* poderão ser testadas como uma vacina terapêutica contra o câncer cervical em ensaios pré-clínicos *in vivo*.

Palavras-chave: Câncer Cervical; Vacina; HPV; E5; *Leishmania tarentolae*

ABSTRACT

Human Papillomavirus (HPV) is a small-sized virus, icosahedral capsid, non-enveloped and with circular double-stranded DNA that shows tropism through the human epithelium. It is known that persistent infection by high-risk HPVs is the main cause of cervical cancer, in addition to other genital, esophageal and pharyngeal carcinomas. The E5 protein from HPV 16 is associated with the development of cervical cancer, and contributes to carcinogenesis through different pathways. Due to the expression of E5 in the early stages of cell transformation, therapeutic vaccines targeting this protein can prevent pre-malignant lesions from progressing to invasive cervical cancer. However, no strategy has yet been shown to be fully effective against HPV-associated tumors. Among the types of existing vaccines, the use of *Leishmania tarentolae* as a vaccine vector has become a promising strategy, due to its immunostimulatory capacity. In this sense, the present work aims at the production of the E5 multiepitope protein 2 (E5-M2) of HPV 16 in *Leishmania tarentolae*, as part of a therapeutic vaccine strategy against cervical cancer. Initially, the synthetic gene E5-M2 was cloned into the expression vector pSP-BT1.YNEO α , generating the construct pSP-BT1.YNEO α _E5-M2. *L. tarentolae* cells were then transfected by electroporation with the construct pSP-BT1.YNEO α _E5-M2 and selected in BHI with the antibiotic G418. The protein extract from the lysis of the transfected protozoa was submitted to SDS-PAGE, and the production of the E5-M2 protein was observed. Subsequently, *Leishmania tarentolae* recombinant strains may be tested as a therapeutic vaccine against cervical cancer in preclinical in vivo trials.

Key words: Cervical Cancer; Vaccine; HPV; E5; *Leishmania tarentolae*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Distribuição proporcional dos tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 entre mulheres no Brasil	14
Figura 2	Árvore filogenética dos Papilomavírus	16
Figura 3	A organização do genoma do HPV16	18
Figura 4	Ciclo de vida dos HPVs de alto risco no epitélio cervical	20
Figura 5	Classificação filogenética do gênero <i>Leishmania</i> ..	27
Figura 6	N-Glicosilação de proteínas produzidas em diferentes sistemas de expressão	30
Quadro 1	Epítomos e sequências de aminoácidos da proteína E5 e E5 multiepítomos 2 de HPV 16	34
Figura 7	Cassete de expressão do vetor pSP-BT1.YNEO α	35
Quadro 2	Soluções e tampões	37
Figura 8	Obtenção do gene sintético E5-M2 de HPV 16	40
Figura 9	Clonagem do gene sintético E5-M2 no vetor pSP-BT1.YNEO α	41
Figura 10	Curva de crescimento de <i>Leishmania tarentolae</i> ..	42
Figura 11	Transfecção das células de <i>L. tarentolae</i>	43
Figura 12	SDS-PAGE (15%) do extrato protéico de células de <i>Leishmania tarentolae</i> corado com <i>Comassie Blue</i>	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	O Sistema de Classificação de Bethesda para displasia escamosa cervical	22
Tabela 2	Comparação de sistemas de expressão	26
Tabela 3	Parâmetros utilizados para a transfecção de <i>L.</i> <i>tarentolae</i>	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	<i>Antigen-presenting cell</i> (Célula Apresentadora de Antígeno)
BHI	<i>Brain-Heart Infusion</i> (Infusão de Cérebro-Coração)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E1-E7	Genes de expressão tardia
E5-M2	E5 multiepítomos 2
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (Ácido Tetracético Etilenodiamina)
endA1	Mutação do gene endA
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> (Receptor de Fator de Crescimento Epidermal)
gRNA	RNA guia
HA	<i>Human Influenza Hemagglutinin</i>
His-tag	Cauda (tag) de Histidina
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HSPG	Vírus da Hepatite C
HPV	(<i>Human Papillomavirus</i>) Papilomavirus Humano
HSIL	Lesão intraepitelial escamosa de alto grau
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i> (Agência Internacional para Pesquisa em Câncer)
IEDB	<i>Immune Epitope Database</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
Kb	Kilobase
kDNA	<i>Kinetoplast DNA</i> (DNA do cinetoplasto)
L1 e L2	Genes de expressão tardia
LB	Luria-Bertani
LCR	<i>Long Region Control</i> (Região Longa Controladora)
LSIL	Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau
MHC-I	<i>Major Histocompatibility Complex class 1</i> (Complexo de histocompatibilidade principal classe I)
MHC-II	<i>Major Histocompatibility Complex class 2</i> (Complexo de histocompatibilidade principal classe II)
CIN	Neoplasia Intraepitelial Cervical

OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (Quadro aberto de leitura)
p21	Proteína 21
p53	Proteína 53
pb	Pares de base
PCR	<i>Polymerase Reaction Chain</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
PV	Papilomavírus
pRB	Proteína do retinoblastoma
RNA	Ácido Ribonucléico
Rpm	Rotações por minuto
SUS	Sistema Único de Saúde
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i> (Tampão Tris Salino)
Tris	Trisaminometano
UTRs	<i>Untranslated Regions</i> (Regiões Não-traduzidas)
VLP	<i>Virus-like particles</i> (Partículas semelhantes a vírus)
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial de Saúde)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1	EPIDEMIOLOGIA E CÂNCER CERVICAL	15
2.2	TAXONOMIA	15
2.3	GENOMA	16
2.4	ONCOPROTEÍNA E5	17
2.5	PATOGÊNESE	18
2.6	IMUNIZAÇÃO	22
2.6.1	Vacinas terapêuticas baseadas em epítomos ...	23
2.6.2	Imunoterapia associada a quimioterapia	24
2.7	EXPRESSÃO HETERÓLOGA	25
2.8	LEISHMANIA TARENTOLAE	26
2.8.1	Aspectos gerais	26
2.8.2	Genética das leishmanias	27
2.8.3	Expressão heterológica em leishmania tarentolae	29
2.8.4	Leishmania tarentolae como vetor vacinal	31
3	OBJETIVOS	33
3.1	OBJETIVO GERAL	33
3.2	OBJETIVO ESPECÍFICOS	33
4	MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1	MATERIAIS	34
4.1.1	Gene E5 multiepítomos 2	34
4.1.2	Vetor pSP-BT1.YNEOα.....	35
4.1.3	Linhagens de Microorganismos	35
4.1.3.1	E. coli	35
4.1.3.2	Leishmania tarentolae	36
4.1.4	Meio de cultura e condições de cultivo	36
4.1.4.1	E. coli	36

4.1.4.2	Leishmania tarentolae	36
4.1.5	Soluções e tampões	37
4.2	MÉTODOS	38
4.2.1	Clonagem	38
4.2.2	Transfecção	38
4.2.3	SDS-PAGE	39
5	RESULTADOS	40
5.1	OBTENÇÃO DO GENE	40
5.2	CLONAGEM	40
5.3	TRANSFECÇÃO	41
5.4	SDS-PAGE	43
6	DISCUSSÃO	45
7	CONCLUSÕES	48
	REFERÊNCIAS	

1 INTRODUÇÃO

A infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) é considerada uma epidemia, sendo vista como a doença sexualmente transmissível mais freqüente na população mundial. É estabelecido que a infecção persistente pelo HPV é a principal causa do câncer de colo uterino, que configura-se como o quarto tipo de câncer mais prevalente entre as mulheres no mundo.

Os HPVs podem ser classificados, de acordo com o grau de lesões que podem induzir, como de alto ou baixo risco. Os HPVs de alto risco são os agentes etiológicos do câncer cervical, assim como de outros cânceres genitais, e de cabeça e pescoço. Os de tipo 16 e 18 são os mais prevalentes, responsáveis por cerca de 70% dos casos de câncer cervical no Brasil e no mundo. Por sua vez os papilomavírus de baixo risco, exemplificados pelos tipos 6 e 11, não estão associados a câncer, e causam apenas lesões benignas e verrugas genitais.

No Brasil, uma vacina quadrivalente, imunogênica para os tipos 6, 11, 16 e 18 está atualmente licenciada para uso. Produzida por meio de tecnologia recombinante, a vacina quadrivalente baseia-se na produção da proteína L1 do capsídeo viral em sistema de expressão heterólogo para a produção de VLPS (partículas semelhantes a vírus). Com a implementação da vacina quadrivalente pelo SUS em 2014, é esperada uma diminuição na incidência do vírus na população, porém, a mesma não contempla todos os tipos do vírus, e não é destinada a pessoas já infectadas.

Atualmente não existem drogas antivirais contra a infecção pelo vírus, sendo as lesões cervicais tratadas apenas por meio de quimioterapia, radioterapia ou cirurgia. Esses procedimentos possuem altas taxas de recorrência, resultando em um alto nível de mortalidade. Por isso, há a necessidade urgente de desenvolvimento de vacinas terapêuticas que tratem as infecções causadas pelo HPV, assim como as lesões associadas.

As vacinas terapêuticas em desenvolvimento possuem como alvo as proteínas E5, E6 e E7. Algumas delas apresentam resultados promissores, entretanto, nenhuma delas até o momento conseguiu causar regressão total dos tumores induzidos pelo HPV, o que leva a uma busca por aprimorar a resposta

imune contra as proteínas utilizadas. Especificamente, o oncogene E5 codifica proteínas que estão envolvidas com a progressão tumoral. Uma estratégia vacinal contra E5 visa, portanto, impedir a progressão do tumor de um estágio inicial para estágios mais avançados.

Dentre as estratégias vacinais existentes, o protozoário *Leishmania tarentolae* surgiu como um adjuvante imunoestimulador. Esse protozoário é capaz de ativar a maturação de células dendríticas, induzir a proliferação de células T e a produção de interferon gama (IFN- γ). Por isso, a produção de antígenos virais em *L. tarentolae* tem demonstrado resultados promissores quanto ao uso do protozoário como um vetor vacinal.

É disponibilizada comercialmente pela JenaBioscience uma plataforma para produção de proteínas em *L. tarentolae* chamada LESXY, na qual se utiliza o vetor pLEXSY-neo2, geralmente empregado em estudos do gênero. Porém, outros plasmídeos também são utilizados por alguns autores, como o pSP-BT1.YNEO α empregado neste estudo. Esse vetor foi previamente testado em nosso grupo por Mariz (2012), tendo sido capaz de expressar os genes E5 e E5 multiepítomos 1 de HPV 16, assim como o gene E5 do Papilomavírus Bovino (BPV).

Nesse sentido, o presente estudo propõe a clonagem e expressão do antígeno sintético de HPV 16 E5 multiepítomos 2 em células de *Leishmania tarentolae*. Essa estratégia é um passo inicial para o uso de linhagens de *L. tarentolae* na produção de vacinas terapêuticas contra o câncer cervical, visando uma regressão no tamanho dos tumores associados ao HPV 16, assim como o impedimento da progressão tumoral para estágios mais avançados de malignidade.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 EPIDEMIOLOGIA E CÂNCER CERVICAL

O câncer cervical ou câncer de colo do útero é o quarto tipo de câncer mais prevalente entre as mulheres no mundo, com uma estimativa de aproximadamente 570.000 casos e 311.000 mortes ao ano (ARBYN M. et al., 2018). No Brasil, é o terceiro tipo de câncer mais prevalente entre as mulheres (Figura 1), e tem uma estimativa de cerca de 16.590 novos casos ao ano (ESTIMATIVA INCA, 2020). Entretanto, a mortalidade em decorrência da doença apresenta uma redução significativa ao longo do tempo, devido ao estabelecimento de programas de prevenção, diagnóstico e tratamento (YANG et al., 2018).

Figura 1: Distribuição proporcional dos tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 entre



	Localização Primária	Casos	%
Mulheres	Mama feminina	66.280	29,7%
	Côlon e reto	20.470	9,2%
	Colo do útero	16.590	7,4%
	Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
	Glândula tireoide	11.950	5,4%
	Estômago	7.870	3,5%
	Ovário	6.650	3,0%
	Corpo do útero	6.540	2,9%
	Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
	Sistema nervoso central	5.220	2,3%

mulheres no Brasil (ESTIMATIVA INCA, 2020).

É reconhecido que a infecção persistente pelo Papilomavírus Humano é a principal causa do câncer de colo uterino. De fato, em análises de amostras de tumores por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), foi constatado que o HPV está presente em 99,7% dos casos, sendo assim considerado o câncer de causa mais esclarecida (CHAN et al., 2019). O contágio pelo vírus, porém, é considerado como uma causa necessária, mas não suficiente para levar ao surgimento do câncer cervical (SREEDEVI et al., 2015). O HPV também está relacionado, de forma menos restrita, ao desenvolvimento de outras neoplasias, como os carcinomas de orofaringe, esôfago, pênis e ânus (BRIANTI et al., 2017).

Alguns dos fatores de risco para o desenvolvimento do câncer cervical são o alto número de parceiros sexuais; o início precoce da vida sexual; o uso de contraceptivos orais; tabagismo; outras infecções como clamídia e herpes simples; doenças inflamatórias crônicas e condições imunossupressoras, como gravidez e a infecção pelo HIV (BODA et al., 2018).

A infecção pelo HPV é considerada a doença sexualmente transmissível mais frequente na população mundial, e, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), no ano de 2011, mais de 630 milhões de pessoas estavam infectadas ao redor do mundo. No Brasil, é estimado que existam de 9 a 10 milhões de infectados, e que 700 mil novos casos surjam a cada ano, podendo assim a infecção pelo vírus ser considerada uma epidemia. A prevalência do Papilomavírus varia entre 21% a 48% para as mulheres e entre 35% a 72% para os homens. Os tipos mais oncogênicos são o HPV 16 e o HPV 18, que juntos são responsáveis por cerca de 70% dos casos de câncer cervical tanto no Brasil como no mundo (FEDRIZZI, 2011).

No estudo mais recente realizado no Brasil em 2018 foi observado prevalência de infecção por HPV em 53,6% da população, sem diferenças estatísticas observadas entre homens e mulheres. Os tipos mais prevalentes encontrados nos infectados foram o HPV 52 (7,8%), HPV 16 (7,5%), HPV 62 (6,8%), HPV 89 (6,3%) e HPV 61 (6,0%). O HPV 18 esteve presente em 3,8%, e 10,73% foram positivos para HPV 16 e HPV 18 juntos. As coletas das amostras foram realizadas entre 2016 e 2017, sendo assim, em 2020 será feito um novo estudo para analisar o impacto gerado pela implementação da vacina no ano de 2014, assim como mudanças na prevalência do vírus (WENDLAND et al., 2018).

2.2 TAXONOMIA

Os Papilomavirus pertencem à família Papillomaviridae. Mais de 280 tipos distintos já foram isolados em mamíferos, aves e répteis, em um total de 49 gêneros diferentes (ARALDI et al., 2017).

O reconhecimento de um novo tipo de Papilomavírus (PV) pode ser feito somente após o sequenciamento completo do seu genoma, e baseia-se na ORF L1, que é o gene mais conservado no genoma dos papilomavirus. Quando existe

uma diferença maior que 10% na sequência de nucleotídeos da ORF L1 entre um PV e seu par mais próximo na árvore filogenética, um novo tipo é reconhecido. Um subtipo é definido quando há uma diferença entre 2% e 10% de homologia, e uma variante quando diferem em menos de 2% (VILLIERS, 2004). A figura 2 apresenta a árvore filogenética dos papilomavírus:

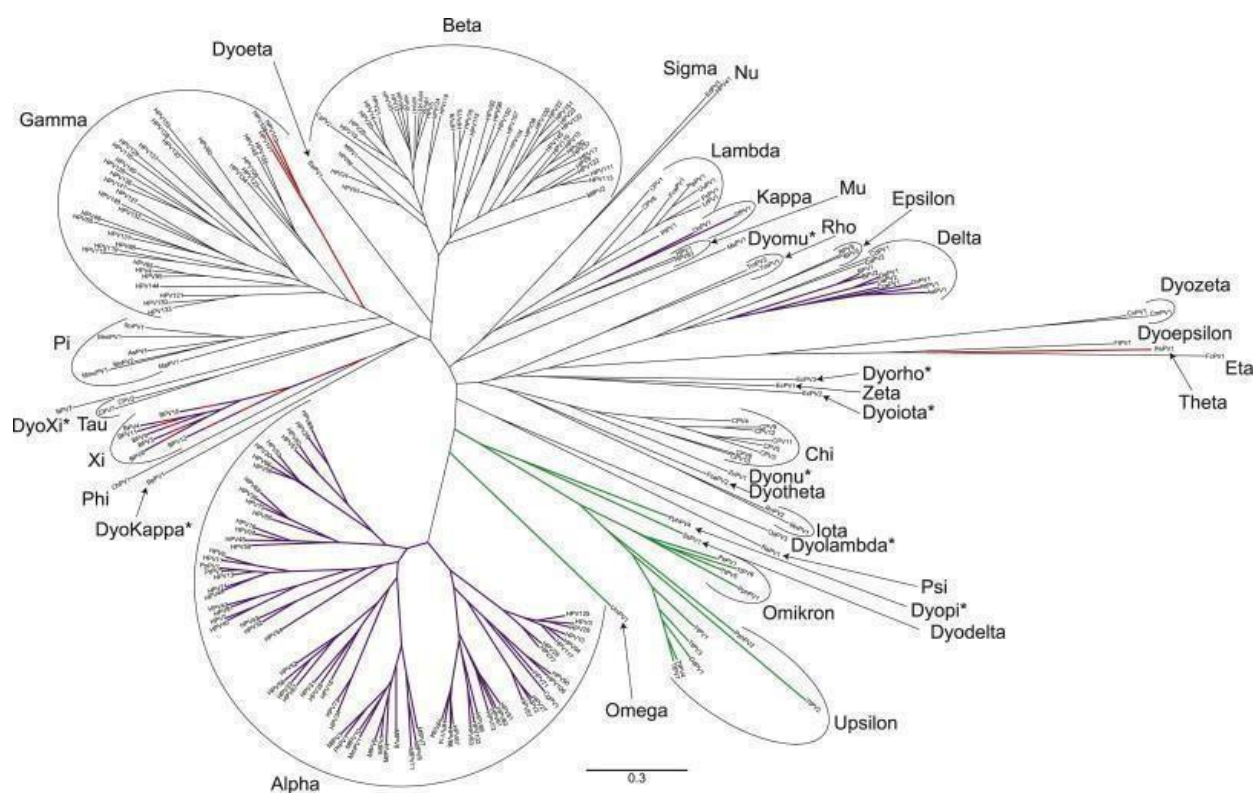


Figura 1: Árvore filogenética dos papilomavírus (DOORSLAER, 2013).

Dentre os PV que causam infecção em humanos, os principais gêneros são o alfa, beta e gama-papilomavirus. Os alfa-papilomavirus são responsáveis pelas infecções em mucosas, além de infecções cutâneas, e são classificados como de alto ou baixo risco. Os HPVs de alto risco são os agentes etiológicos do câncer cervical e de outros cânceres genitais, assim como carcinomas de cabeça e pescoço. Doze tipos foram classificados como sendo de alto risco pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC): HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59 (VIARISIO, 2017). Os alfa-papilomavirus de baixo risco causam lesões benignas ou de baixo grau e verrugas anogenitais (BRIANTI et al., 2017).

Infecções cervicais por HPV são, em sua maioria, assintomáticas, e mais de 90% das infecções detectadas são resolvidas em dois anos. O estabelecimento da neoplasia está associada a persistência do vírus nas células epiteliais da cérvix, sendo mais persistentes os HPVs de alto risco (BODA et al., 2018).

2.3 GENOMA

O material genético do Papilomavírus humano é formado por uma molécula de DNA circular de fita dupla de aproximadamente 8000 pb, dividida em 8 ORFs e associada a proteínas do tipo histona. O vírus é não envelopado e protegido por um capsídeo (BRIANTI et al., 2017)

O genoma do HPV (Figura 3) pode ser dividido em três partes. Primeiro, uma região longa controladora (LCR), que não codifica proteínas e é responsável pela regulação da transcrição das demais ORFs. A outra parte é formada pelos genes precoces: E1, E2, E4, E5, E6 e E7, que são responsáveis pela replicação e transcrição, assim como pela carcinogênese viral. Por fim, os genes tardios L1 e L2 codificam as proteínas do capsídeo (ARALDI et al., 2017). Devido o *splicing* alternativo e a expressão de múltiplos promotores, a quantidade de proteínas produzidas é maior em relação ao número de genes do vírus (DOORBAR et al., 2016).

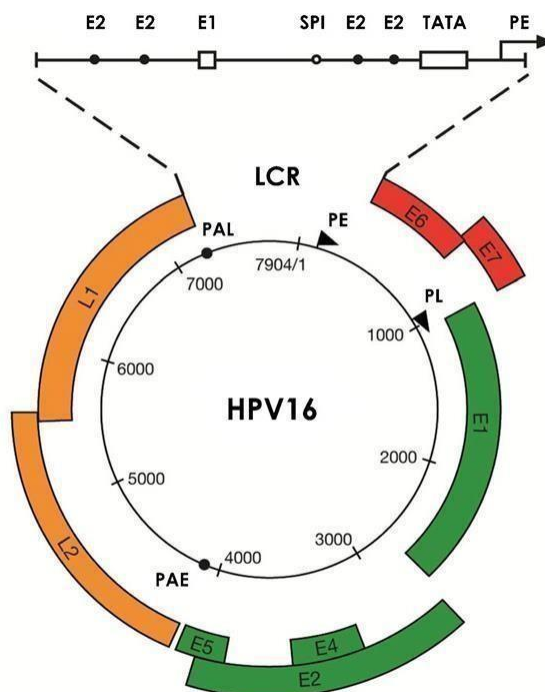


Figura 3: A organização do genoma do HPV 16 (DOORBAR, 2012).

Cada partícula viral é revestida por um capsídeo formado por 360 cópias de L1 e cerca de 12 cópias de L2, organizadas em 72 capsômeros de forma icosaédrica (FERNANDES et al., 2012). A proteína L1 é também um alvo para a produção de vacinas profiláticas, devido a sua elevada imunogenicidade (DOORBAR et al., 2016). Os genes E6 e E7 são os maiores responsáveis pela oncogênese viral, devido principalmente à ligação e degradação das proteínas supressoras tumorais p53 e pRB, respectivamente; E5 causa um aumento da atividade das proteínas E6 e E7 e está associado à progressão tumoral; as demais proteínas estão primordialmente relacionadas com a transcrição e replicação do DNA viral (FERNANDES e FERNANDES et al., 2012).

2.4 A ONCOPROTEÍNA E5

A HPV16 E5 é uma proteína de 83 aminoácidos associada a membrana que se localiza principalmente no retículo endoplasmático e complexo de Golgi da célula (MAUFORT et al., 2010). Enquanto as proteínas E6 e E7 são responsáveis pelo início da transformação celular, E5 aumenta suas atividades e contribui para

a progressão tumoral. E5 não é expressa em todos os tumores positivos para HPV, indicando que a mesma pode contribuir para a formação do tumor, mas não é essencial para a carcinogênese (MÜLLER et al., 2015).

A oncoproteína E5 realiza suas funções por meio da ligação e modulação da atividade de proteínas da célula hospedeira, contribuindo para a carcinogênese por intermédio de: inibição da apoptose, inibição da comunicação célula-célula por junção gap, regulação negativa da expressão das moléculas do MHC classe 1 e 2, redução da transcrição de p21 e também ativação do receptor EGFR, envolvido com a proliferação celular. Dessa forma, E5 contribui por meio de diferentes vias para a progressão tumoral (DIMAIO e PETTI, 2013; MAUFORT et al., 2010).

Para que ocorra a eliminação da infecção pelo HPV, linfócitos T precisam ser ativados mediante apresentação antigênica (MÜLLER et al., 2015). Células que expressam E5 são menos reconhecidas por células T CD8+, indicando que a regulação negativa das moléculas do MHC inibe a apresentação de antígenos virais ao sistema imune, diminuindo assim a resposta contra as células infectadas pelo vírus (DIMAIO e PETTI, 2013). Essa evasão da resposta imune pode aumentar a duração da infecção e contribuir para a transformação das células infectadas (VENUTI, 2011).

Vacinas direcionadas a E5 induzem uma alta atividade em linfócitos T CD4+ circulantes, que são importantes para a geração de resposta CD8+ e de memória imunológica. Devido a expressão de E5 nos estágios iniciais de transformação celular, imunoterapias direcionadas a essa proteína podem prevenir lesões pré-malignas de progredir para o câncer cervical invasivo (PAOLINI et al., 2017).

2.5 PATOGÊNESE

Para ocorrer a infecção, as partículas virais precisam ter acesso à camada basal do epitélio estratificado da cérvix, por intermédio de microlesões causadas por trauma químico ou mecânico. Estudos mostram que a proteína L1 do capsídeo viral é o principal componente requerido para se ligar ao receptor de superfície celular HSPG e, com o auxílio de L2, promover a internalização do vírus na célula (FERNANDES e FERNANDES, 2012).

Após a entrada do HPV nos queratinócitos da camada basal do epitélio, as proteínas E1 e E2 são expressas para manter o DNA viral em um estado episomal. Essas proteínas se ligam a origem de replicação do DNA viral e recrutam DNA polimerases e outras proteínas necessárias para a replicação do DNA, mantendo um número pequeno de cópias do vírus (GEORGESCU et al., 2018). Há assim uma baixa expressão das proteínas virais, contribuindo para a evasão da resposta imune e persistência da infecção (FERNANDES e FERNANDES, 2012).

Na camada suprabasal, as oncoproteínas E5, E6 e E7 também são expressas, causando um aumento na proliferação celular e impedindo as mesmas de se diferenciarem. As oncoproteínas E6 e E7 desregulam o ciclo celular principalmente pela degradação das proteínas p53 e pRb, respectivamente, por ubiquitinação e degradação proteossômica dependente. A inativação das proteínas p53 e pRb leva ao acúmulo de danos no DNA da célula do hospedeiro e, conseqüentemente, à carcinogênese (DOORBAR, 2012).

No estágio final do ciclo do HPV, os genes L1 e L2 são expressos para produzir as proteínas do capsídeo viral, que engloba o genoma do vírus. As partículas virais formadas são posteriormente liberadas das células das camadas superficiais do epitélio (GEORGESCU et al., 2018). A figura 4 esquematiza o ciclo de vida dos HPVs de alto risco:

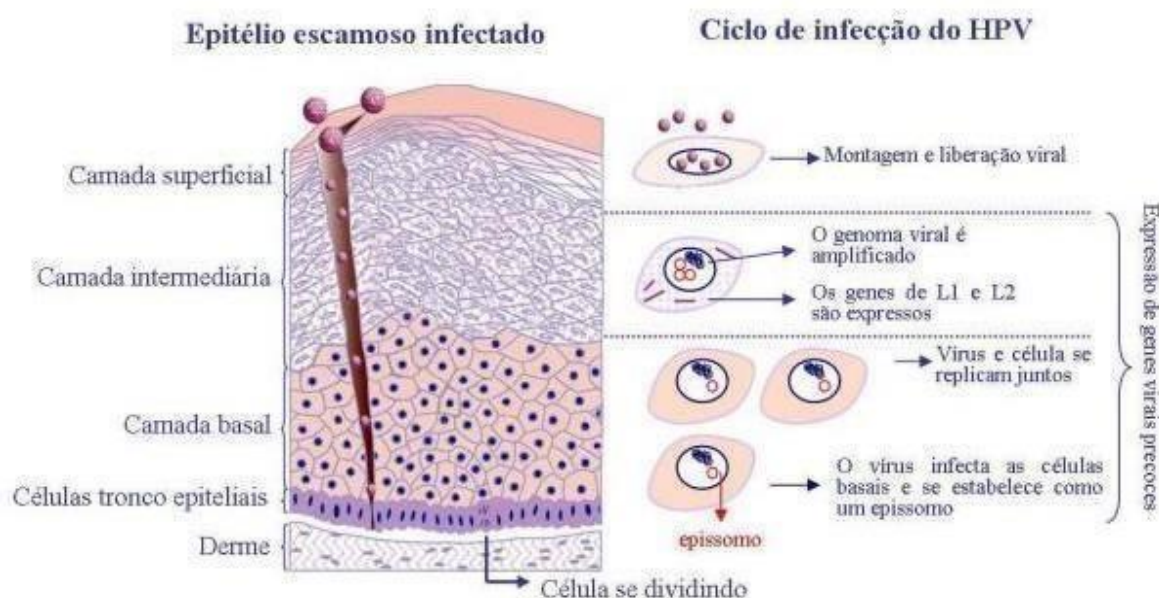


Figura 4: Ciclo de vida dos HPVs de alto risco no epitélio cervical (Adaptado de DOORBAR, 2005)

Normalmente, a infecção pelos HPV de alto risco tem uma duração de cerca de 12 a 24 meses. A infecção persistente ocorre em 10% dos casos, quando o sistema imune não consegue combater a infecção, resultando no desenvolvimento de lesões que podem progredir para malignidade. Essas lesões causadas pela persistência da infecção pelo HPV são classificadas como: Neoplasia intraepitelial cervical de grau 1 (CIN1) ou lesão de baixo grau (LSIL), que pode progredir para CIN2 e CIN3 ou lesão de alto grau (HSIL), os quais compreendem um nível mais severo de neoplasia, e que podem posteriormente seguir para o desenvolvimento de câncer invasivo (SANJOSÉ et al., 2018; DOORBAR, 2016; BURD, 2003).

O exame de Papanicolaou é o teste de triagem utilizado para a investigação de lesões nas células da cérvix, que podem ser causadas pelo HPV e levar ao surgimento do câncer cervical. A tabela 1 apresenta a classificação do Sistema Bethesda para displasia de células escamosas cervicais, em que é atualmente empregado o modelo de 1999, revisado em 2014. Colposcopia e biópsia da lesão são usadas para a confirmação do diagnóstico (NAYAR e WILBUR, 2017; BURD, 2003).

Tabela 1: O Sistema de Classificação de Bethesda para displasia celular escamosa cervical (Adaptado de NAYAR e WILBUR, 2017).

Sistema Bethesda 1999	Sistema CIN	Interpretação
Negativo para lesão intraepitelial ou malignidade	Normal	Ausência de células anormais
ASC-US (células escamosas atípicas de significado indeterminado)	-	Células escamosas com anormalidades maiores que aquelas atribuídas a mudanças reativas, porém, não preenche os critérios para lesão escamosa intraepitelial
ASC-H (células escamosas atípicas, não se pode excluir HSIL)	-	Células escamosas com anormalidades maiores que aquelas atribuídas a mudanças reativas, porém, não preenche os critérios para lesão escamosa intraepitelial
LSIL (lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau)	CIN1	Leves anormalidades celulares; quase sempre devido HPV
HSIL (lesões intraepiteliais escamosas de alto grau)	CIN2/3	Moderadas à graves anormalidades celulares
Carcinoma	Carcinoma invasivo de células escamosas Carcinoma invasivo de células escamosas glandulares (adenocarcinoma)	A possibilidade de câncer é alta o suficiente para avaliação imediata, mas não significa que o paciente definitivamente tem câncer

2.6 IMUNIZAÇÃO

Três vacinas profiláticas estão atualmente licenciadas para uso. Uma vacina quadrivalente, imunogênica para os tipos 6, 11, 16 e 18 (Gardasil); outra bivalente para os tipos 16 e 18 (Cervarix); além de uma nonavalente (Gardasil 9). Todas são produzidas por meio de tecnologia recombinante, utilizando a proteína L1 do capsídeo viral para a produção de VLPs (partículas semelhantes a vírus), e

oferecem mais de 90% de proteção contra infecções persistentes pelo HPV. Apesar disso, a triagem pelo exame de Papanicolaou ainda é requerida, pois as vacinas não eliminam totalmente o risco de infecção pelo vírus, além de não oferecer proteção contra outros tipos virais (BODA et al., 2018; MAILINH e VU, 2018).

No caso de indivíduos infectados, vacinaterapêuticas baseadas nos genes E5, E6 e E7 estão sendo desenvolvidas com o intuito de regredir os tumores associados ao vírus (CORDEIRO et al., 2015; KAWANA et al., 2012). As estratégias baseadas nas oncoproteínas E6 e E7 têm sido exploradas em diferentes plataformas, baseadas em peptídeos, proteínas, DNA/RNA, células dendríticas, além de vetores virais e bacterianos. Porém, nenhuma delas conseguiu erradicar totalmente as lesões causadas pelo HPV. Por isso, estudos também foram iniciados utilizando a oncoproteína E5 como antígeno vacinal, por meio de plataformas baseadas em peptídeos, DNA e vetor viral (YANG et al., 2017).

2.6.1 Vacinas terapêuticas baseadas em epítomos

Durante a infecção pelo HPV, naturalmente, o sistema imune não é capaz de reconhecer todos os epítomos possíveis do patógeno, causando assim uma resposta centrada em apenas um ou poucos deles. Portanto, o uso de vacinas terapêuticas baseadas em epítomos específicos permite a escolha de alvos terapêuticos mais apropriados, aumentando assim a eficácia da resposta imune celular contra as proteínas do vírus (RAJISSA et al., 2019; SETTE e FIKES, 2003).

Essas vacinas são compostas de epítomos imunodominantes de células B e T separados por espaçadores, que auxiliam no processamento e apresentação de antígenos. A falta de sequências espaçadoras para separação dos epítomos resulta na produção de uma nova proteína (LI et al., 2014; NEFAZAT et al., 2014). Estudos demonstram que epítomos de células T CD8⁺ são essenciais para induzir uma forte resposta imune em vacinas. Esses linfócitos reconhecem peptídeos de origem intracelular apresentados pelo MHC I presente nas células apresentadoras de antígeno (APCs) e os elimina. Entretanto, a adição epítomos de células T CD4⁺ pode aumentar significativamente a potência e a duração da resposta, por meio da produção de citocinas e geração de células T de memória.

Por sua vez, epítomos de células B se ligam ao receptor de superfície dos

linfócitos B, que se transformam em plasmócitos. Estes secretam anticorpos e geram células B de memória, que permanecem ativas no organismo (PANAHI et al., 2018; NEFAZAT et al., 2014).

A identificação dos epítomos é realizada por meio de *softwares* de predição, que analisa as regiões de uma determinada proteína que podem ser reconhecidas pelo sistema imune. Estudos *in silico* demonstram evidência de que epítomos de E5 podem ser úteis como estratégia terapêutica. Kumar et al. (2015) identificou 11 epítomos da proteína de E5 de HPV 16 capazes de estimular células B e T e interagir com as moléculas do MHC. Esse estudo identificou os epítomos com maior probabilidade de eficácia como vacina, porém, testes *in vitro* e *in vivo* precisam ser realizados para avaliar os seus efeitos (PANAHI et al., 2020; FREITAS et al., 2017).

Epítomos de E5 de HPV 16 presentes em uma construção denominada E5-multiepítomos foram testados em camundongos por meio de uma vacina de DNA, na qual se obteve uma grande redução no tamanho dos tumores a partir da ação de células T CD8+, similar a induzida por vacinas de DNA com os genes E6 e E7 (CORDEIRO et al., 2015). Em outro estudo, os genes E5 e E5-multiepítomos foram fusionados à sequência da proteína do capsídeo do vírus de planta Potato virus X (PVX), conhecido por induzir forte resposta imunológica em vacinas de DNA. Essa estratégia vacinal também conseguiu causar redução dos tumores, sendo detectada atividade de células T CD4+ e CD8+, além da produção de IFN- γ (PAOLINI et al., 2017). Recentemente, duas vacinas (DNA e peptídeo) compostas de epítomos de E5, E6 e E7 causou regressão completa dos tumores em camundongos. Essa estratégia levou à produção de Interleucina 5 (IL-5), interleucina 10 (IL-10), e anticorpos IgG (PANAHI et al., 2020).

2.6.2 Imunoterapia associada a quimioterapia

Tumores podem ser alvos difíceis para a imunoterapia, pois possuem múltiplas vias de escape da vigilância imunológica e podem causar imunossupressão. Por isso, existe a possibilidade de combinar vacinas contra câncer com outras terapias, como quimioterapia. Apesar de a quimioterapia ser considerada imunossupressora, evidências sugerem que alguns agentes quimioterápicos podem aumentar a atividade antitumoral de agentes

imunoterapêuticos. Além disso, enquanto as drogas quimioterápicas são metabolizadas e eliminadas, a imunidade induzida por uma vacina terapêutica permanece ativa e pode persistir por muito tempo após a vacinação, tendo assim potencial para prevenir a recorrência do tumor (ARDIANI et al., 2010).

2.7 EXPRESSÃO HETERÓLOGA

Para a produção de proteínas recombinantes, é necessária a clonagem do gene correspondente à proteína de interesse em um plasmídeo sob controle de um promotor induzível forte (JIA e JEON, 2016). Em seguida, faz-se a transformação em um organismo hospedeiro e induz-se a expressão do gene clonado, com posterior purificação e caracterização da proteína produzida (ROSANO e CECCARELLI, 2014).

O hospedeiro é escolhido entre células de bactérias, leveduras, protozoários, insetos, mamíferos, entre outros, de acordo com a proteína a ser produzida (NIIMI, 2012). O organismo utilizado deve ser capaz de promover todas as modificações necessárias para gerar um polipeptídeo ativo. Por exemplo, um sistema procarioto não é viável para a produção de uma proteína que necessita de modificações pós-translacionais eucarióticas (ROSANO e CECCARELLI, 2014).

Os vetores utilizados são derivados de múltiplas combinações de diferentes promotores, replicons, marcadores de seleção, sítios de restrição e marcadores de fusão (ROSANO e CECCARELLI, 2014). O uso de *tags* de fusão é útil para a purificação da proteína, além de prevenir proteólise e aumentar a produção e solubilidade do polipeptídeo produzido (COSTA et al., 2014).

Os sistemas de expressão são escolhidos com base em fatores como níveis de expressão, modificações pós-traducionais, custo de produção, disponibilidade de sistemas genéticos, entre outros. Por isso, é importante compreender as vantagens e desvantagens dos diferentes sistemas de expressão, para que se possa selecionar aquele que mais se adequa a produção da proteína desejada (NIIMI, 2012). A tabela 2 compara as características de diferentes organismos:

Tabela 2: Comparação de sistemas de expressão (Adaptado de TRIPHATI e SHRIVASTAVA, 2019).

Sistema	Crescimento	Produtividade	Glicosilação	Dobramento protéico	Disponibilidade de sistemas genéticos	Custo
Bactéria	Muito rápido	Média	-	Pobre	Muito boa	Baixo
Levedura	Rápido	Alta	Simples	Razoável	Boa	Baixo
<i>L. tarentolae</i>	Médio	Alta	Semelhante a mamíferos	Bom	Razoável	Médio
Células de insetos	Lento	Alta	Não- semelhante a mamíferos	Muito bom	Razoável	Alto
Células de mamíferos	Lento	Média-Alta	Sim	Muito bom	Razoável	Alto

Em relação a concentração de proteínas recombinantes obtidas, a *E. coli* produz em torno de 30 mg/L, podendo chegar a mais de 180 mg/L (LEONE et al., 2015); *Pichia pastoris* produz aproximadamente entre 2mg/L a 3g/L (WERTEN et al., 2017); *Leishmania tarentolae* pode ultrapassar 500 mg/L e células de mamíferos chegam a 5 g/L. A produtividade das células de mamíferos aumentou em mais de cem vezes em cerca de 25 anos. Para a *L. tarentolae*, um aumento similar é esperado dentro de alguns anos (KLATT et al., 2019).

2.7 LEISHMANIA TARENTOLAE

2.7.1 Aspectos gerais

A família Trypanosomatidae abrange organismos unicelulares que possuem um flagelo único e uma organela rica em DNA, semelhante a mitocôndria, chamada cinetoplasto. Membros desse grupo incluem os protozoários dos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma*, agentes causadores de doenças de alta mortalidade e morbidade em humanos e animais (NIIMI, 2012).

Para completar seu ciclo de vida, os parasitos do gênero *Leishmania* alternam entre um hospedeiro vertebrado, onde são encontrados na forma

promastigota, e outro invertebrado, na forma amastigota. As formas amastigotas são pequenas e arredondadas, com um flagelo rudimentar, encontradas no sangue; promastigotas são fusiformes e monoflageladas, de maior tamanho, encontradas em células fagocíticas mononucleares (mais comumente em macrófagos). Os mosquitos dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomya* são os principais hospedeiros invertebrados, enquanto os hospedeiros vertebrados abrangem uma variedade de mamíferos e répteis (KLATT et al., 2019).

Desde sua primeira descrição em 1903-1904, mais de 50 espécies foram descobertas em diversas partes do mundo. Destas, 20 espécies são patogênicas para humanos, causando leishmaniose visceral, leishmaniose cutânea e leishmaniose mucocutânea (AKHOUNDI et al., 2016). A figura 5 apresenta a classificação filogenética do gênero *Leishmania*.

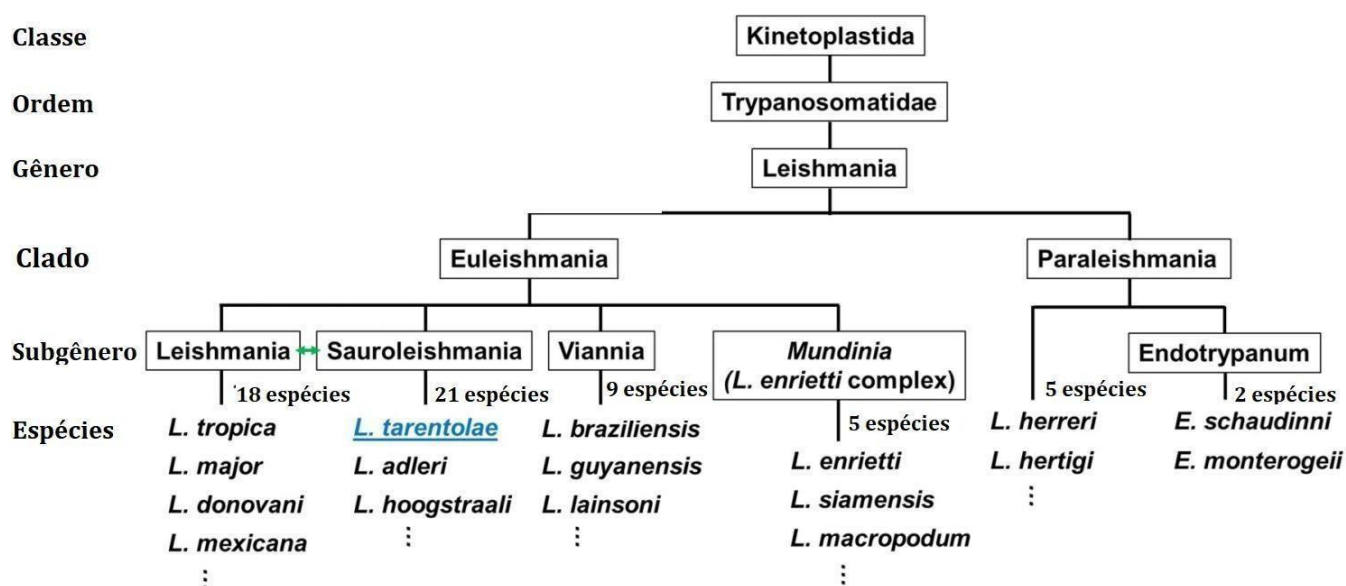


Figura 5: Classificação filogenética do gênero *Leishmania* (Adaptado de Klatt et al., 2019).

2.7.2 Genética das *leishmanias*

O genoma das leishmanias consiste em cromossomos e DNA epissomal presentes no núcleo celular, além de moléculas de DNA no cinetoplasto (kDNA) que se replicam de forma independente (KAZEMI, 2011). O kDNA consiste em pequenas moléculas de DNA circulares chamadas minicírculos e outras moléculas de maior tamanho chamadas maxicírculos, todas combinadas em uma

rede bidimensional. Os maxicírculos são equivalentes ao DNA mitocondrial encontrado em eucariotos (KLATT et al., 2019).

Em cinetoplastídeos, a transcrição de genes codificantes é feita pela RNA polimerase I, enquanto o mesmo processo em eucariotos é realizado pela RNA polimerase II. A regulação da expressão gênica ocorre predominantemente de forma pós-transcricional, controlada por regiões gênicas não traduzidas (UTRs) (NIIMI, 2012).

Os genes desses protozoários são transcritos em RNAs policistrônicos, que são convertidos em mRNAs monocistrômicos através de transsplicing, um processo semelhante ao splicing dos eucariotos acrescido de poliadenilação (PADMANABHAN et al., 2012).

Além das modificações citadas, a expressão é regulada também por edição de DNA. A extensão dessa edição é variável entre os genes e espécies de cinetoplastídeos; nos casos mais extremos, são necessárias centenas de edições para gerar um mRNA traduzível (pan-edição). As edições de RNA são realizadas por RNAs guias (gRNAs), que orientam a maquinaria enzimática celular a produzir inserções ou deleções de uracilas no mRNA, a fim de torná-lo complementar ao gRNA. A edição ocorre do terminal 3' ao terminal 5' do mRNA por múltiplos gRNAs. Estes são codificados pelo kDNA, e estão presentes em maior quantidade nos minicírculos (KLATT et al., 2019).

O transsplicing é necessário para o transporte de RNA, estabilidade e eficiência da tradução (NIIMI, 2012). Os elementos envolvidos no transsplicing são: um nucleotídeo A; um trecho de 5 a 100 nucleotídeos formado por polipirimidina e ocasionais bases purínicas; um espaçador e um sítio AG. Para permitir as modificações pós-transcricionais necessárias à produção da proteína de interesse, esses elementos precisam estar presentes no cassete de expressão (PADMANABHAN et al., 2012).

Os vetores de expressão utilizados em *Leishmania* são controlados por promotores ativados por RNA polimerase I ou II, ou RNA polimerases heterólogas. A RNA polimerase do bacteriófago T7 pode ser utilizada em sistema de expressão indutivo, controlado por um elemento repressor responsivo a tetraciclina. Como a regulação transcricional desses organismos é controlada

predominantemente por UTRs, a escolha dessas regiões é essencial para a construção de um vetor de expressão eficiente (BASILE e PETTICA, 2009).

Células de leishmania podem ser transfectadas com plasmídeo de expressão, que pode ser linearizado e integrado ao genoma ou permanecer como um episomo (GAGOSKI et al., 2016). Os vetores possuem genes de resistência a antibióticos, sendo possível a seleção dos clones recombinantes através do uso de antimicrobianos. Também é possível realizar sucessivas transfecções com cópias adicionais dos genes para aumentar seus níveis de expressão (GAZDAG et al., 2010).

Para permitir a integração ao genoma do hospeiro, a construção deve ser flanqueada por dois fragmentos de recombinação homóloga. O cassete de expressão pode ser inserido no locus rRNA 18S do genoma da *L. tarentole*, o qual possui uma alta taxa de transcrição pela RNA polimerase I. Outra opção é o locus da ornitina descaborsilase, transcrito pela polimerase II (KLATT et al., 2019).

2.7.3 Expressão heteróloga em *Leishmania tarentolae*

A *Leishmania tarentolae* é não-patogênica para humanos, produz uma quantidade satisfatória de proteína recombinante, e é relativamente econômica e de fácil cultivo, além de realizar modificações pós-transcricionais semelhantes às dos eucariotos superiores (KLATT et al., 2019).

Diferente de outras espécies, como *L. amazonenses*, *L. donovani* e *L. major*, a *Leishmania tarentolae* é capaz de tolerar altas densidades celulares em cultura e de se dividir de forma rápida, além de produzir maiores quantidades de proteínas recombinantes (TAHERI et al., 2016). Entre as modificações pós-transcricionais realizadas estão o processamento de sequências sinais, dobramento protéico, formação de pontes dissulfeto e glicosilação (NIIMI, 2012).

A glicosilação é essencial para a atividade de muitas proteínas. Ela auxilia no dobramento protéico, aumenta a meia-vida e regula a interação de proteínas com receptores celulares (KLATT et al., 2019). As estruturas dos oligossacarídeos das glicoproteínas de *L. tarentolae* são semelhantes às dos mamíferos, provavelmente devido ao estilo de vida parasitário do protozoário. A figura 6 compara a glicosilação entre diferentes hospedeiros, demonstrando a semelhança deste processo entre *Leishmania* e mamíferos (BASILE e PETTICA, 2009).

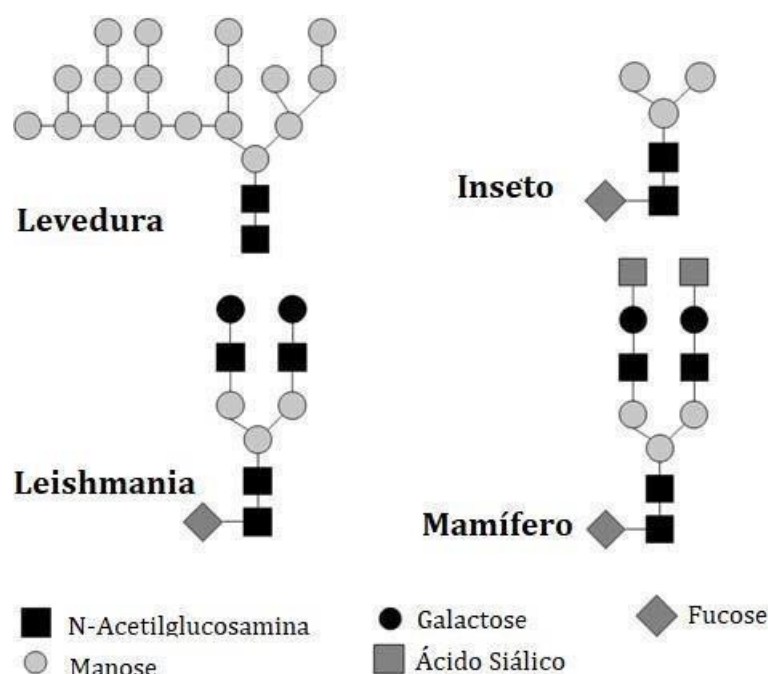


Figura 6: N-Glicosilação de proteínas produzidas em diferentes sistemas de expressão (Adaptado de BASILE e PETICCA, 2009).

A capacidade de realizar modificações pós-traducionais semelhantes aos mamíferos é a maior vantagem do uso de *L. tarentolae* em expressão heteróloga. Portanto, nos casos em que há dificuldade na produção protéica, utilização desse sistema de expressão pode ser uma alternativa ao uso de células de mamíferos. Além disso, a leishmania também pode ser empregada nos casos em que houver dificuldades para a expressão em bactérias ou leveduras (NIIMI, 2012).

Diferentes polipeptídeos já foram produzidos em *L. tarentolae*, como Amilase, Ativador de Plasminogênio Tecidual, Eritropoetina, *Green Fluorescent Protein* (GFP), Interferon-gama, Laminina-322, Luciferase, *Red Fluorescent Protein*, Receptor G de ácido retinóico, RNA polimerase T7, entre outros (BOLHASSANI et al., 2014). Além disso, o protozoário tem sido usado como vetor vacinal para carregamento de antígenos, provocando resposta imune humoral e celular em camundongos (SALEHI et al., 2012; HOSSEINZADEH et al., 2013).

L. tarentolae pode produzir proteínas recombinantes de forma intracelular ou secretada no meio (LEGASTELOIS, 2017). Para realizar secreção, uma sequência sinal precisa ser fusionada ao polipeptídeo. Devido os baixos níveis de proteínas presentes no meio de cultura, além da pouca excreção de proteínas

endógenas, a secreção pelo protozoário pode funcionar como um primeiro passo para a purificação, pois separa a proteína recombinante das demais proteínas citoplasmáticas (NIIMI, 2012; BASILE e PETTICA, 2009).

Diferentes meios de cultura contendo soro ou outros nutrientes de origem animal podem ser utilizados para o crescimento de espécies de *Leishmania*. Dentre esses, o mais utilizado tem sido o meio BHI suplementado com Hemina, uma molécula derivada do grupo heme. Outros meios quimicamente definidos têm sido descritos, porém apenas o BHI permite obter uma elevada densidade de espécies de *Leishmania*. O cultivo sem nutrientes de origem animal ainda não está disponível, por isso os meios para crescimento de *Leishmania* têm custo relativamente altos (BASILE e PETTICA, 2009).

As *Leishmanias* são cultivadas em culturas sob condições aeróbicas à 25-27C°. As mesmas se dividem a cada 4-6 horas por fissão única e têm a taxa de crescimento dependente do suprimento de oxigênio (KLATT et al., 2019).

2.7.4 *Leishmania tarentolae* como vetor vacinal

Apesar do êxito obtido até então, as vacinas utilizadas atualmente possuem algumas desvantagens. Vacinas convencionais requerem adjuvantes e múltiplas doses para a indução de uma resposta imune satisfatória (KUMAR e KUMAR, 2019). Além disso, a administração de organismos patogênicos vivos ou atenuados gera risco de patogenicidade em caso de reversão do organismo para estado de virulência, especialmente em indivíduos imunocomprometidos (RUBIN et al., 2014). Existe também risco de reações de hipersensibilidade em alguns indivíduos após vacinação. Por isso, existe a necessidade de desenvolvimento de novos tipos de vacina, destacando-se aqui as estratégias baseadas no carreamento de antígenos por *Leishmania tarentolae* (KUMAR e KUMAR, 2019).

L. tarentolae foi introduzida como um vetor vacinal por Breton et al. (2005), que testou o protozoário não-patogênico para humanos como uma vacina contra leishmaniose visceral em camundongos (SHABASI et al., 2015). No estudo, foi demonstrado que *L. tarentolae* pode ativar a maturação de células dendríticas, além de induzir a proliferação de células T e a produção de IFN- γ . Esses

resultados sugeriram a possibilidade de uso do protozoário para aumentar a eficácia das vacinas contra infecções por leishmania, e possivelmente também contra outros patógenos intracelulares que necessitam de uma resposta de células T para desenvolver uma imunidade protetiva (BRETON et al., 2005).

A capacidade da *L. tarentolae* de estimular células apresentadoras de antígenos (APCs) pode aumentar a exposição de antígenos mediante moléculas do MHC I e MHC II. Essa atividade induz uma maior resposta de células T CD4+ e CD8+, que são essenciais para o controle de infecções virais. Essas características permitem o uso do protozoário como um potente adjuvante imunoestimulador, através da produção de antígenos de diversos patógenos. (ANSARI et al., 2019)

Entretanto, existem poucos estudos relacionados ao uso de *L. tarentolae* como vetor vacinal. Sua utilização tem demonstrado eficiência no aumento de IFN- γ , resposta Th1 e proteção contra a infecção por leishmania em camundongos e cães (ABDOSSAMADI et al., 2017; SHAHBAZI et al., 2015). Em outros organismos, estudos indicam indução de imunidade celular gerada por linhagens de *L. Tarentolae* produtoras de HIV-1gag (BRETON et al., 2007) e HCV PT-NT (gp96) (ANSARI et al., 2019).

Uma estratégia vacinal realizada com o gene E7 de HPV 16 clonado no vetor pLESXY-neo2 (Jena Bioscience) levou a produção de anticorpos, IFN- γ e IL-5. No estudo, foi obtida redução no tamanho dos tumores em camundongos, porém, esse resultado não foi estatisticamente significativo. Essa vacina pode ser um candidato apropriado, porém, alguns pontos podem ser aperfeiçoados. A adição de adjuvantes no *design* da vacina poderá aumentar sua eficiência (SALEHI et al., 2012).

Outro estudo realizado com o gene L1 de HPV 16 clonado no vetor pLESXY-neo2 (Jena Bioscience) gerou anticorpos específicos para L1 e resposta celular, porém, não protegeu os camundongos contra os tumores. O uso de citocinas e outros potenciadores do sistema imunológico poderá aumentar a eficácia da vacina (BOLHASSANI et al., 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do trabalho consiste na clonagem e expressão do antígeno sintético de HPV 16 E5-multiepítomos 2 em células de *Leishmania tarentolae*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter o antígeno sintético E5 multiepítomos 2 (E5-M2);
- Construir o cassete de expressão pSP-BT1.YNEO α _E5-M2;
- Confirmar produção de E5-M2 em células de *L. tarentolae*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Gene E5 multiepítomos 2

O gene E5 multiepítomos 2, de 374pb, foi sintetizado a partir de epítomos do gene E5 de HPV 16. A seleção dos epítomos foi baseada nas instruções de Kumar et al. (2015) utilizando o servidor IEDB (Immune Epitope Database) para predição de epítomos de células B e T. Dois espaçadores foram adicionados entre os epítomos, HEYGAEALERAG e AAY. O primeiro serve como alvo para os sistemas de degradação proteossomal e lisossomal; o segundo espaçador, após clivagem, permite a ligação do fragmento C-terminal gerado ao transportador TAP (Transporter Associated with Antigen Processing), que tem um importante papel na apresentação de antígenos (Nefazat et al., 2014). Sítios de restrição para as enzimas *Bam*HI e *Hind*III, presentes também no vetor de expressão pSP-BT1.YNEO α , foram adicionados ao gene por meio de PCR para permitir a clonagem.

O quadro 1 apresenta a estrutura das proteínas E5 selvagem e E5 multiepítomos, destacando os epítomos e espaçadores utilizados.

Quadro 1: Epítomos e sequências de aminoácidos da proteína E5 e E5 multiepítomos 2 de HPV 16. A) Sequência de aminoácidos da proteína E5 de HPV 16. B) Epítomos utilizados na construção E5-multiepítomos 2. Epítomo I (azul), Epítomo II (verde), Epítomo III (roxo).

A) Proteína E5 selvagem (83 a.a.):

MTNLDTASTTLLACFLLCFCVLLCVCLLIRPLLSVSTYTSIILVLLWITAASAFRC
FIVYIIFVYIPLFLIHTHARFLIT

B) Epítomos da proteína E5 de HPV 16

- I - FCVLLCVCLLIRPL - Região do gene E5 (65-96)
- II - LSVSTYTSIILVL - Região do gene E5 (100-141)
- III - FIVYIIFVYIPLF - Região do gene E5 (178-215)

4.1.2 Vetor pSP-BT1.YNEO α

O vetor pSP-BT1.YNEO α , apresentado na figura 7, foi utilizado para expressar o gene de interesse.



Figura 7: Cassete de expressão do vetor pSP-BT1.YNEO α .

No fragmento YNEO α , o Y refere-se a um trato de polipirimidina de 92pb; NEO é o gene neomicina fosfotransferase de resistência ao antibiótico geneticina; e α representa uma região intergênica do gene alfa-tubulina de *L. enriettii*. O vetor é flanqueado pela ORF BT1 de *L. tarentolae*, podendo assim realizar recombinação homóloga com o genoma do hospedeiro. A tag HA (Human Influenza Hemagglutinin) na região C-terminal é útil em experimentos de purificação, assim como na detecção da proteína recombinante por meio do uso de anticorpos anti-HA. Assim como no vetor pSP72 (Promega), usado como arcabouço para desenvolver o pSP-BT1.YNEO α , a transcrição pode ser controlada pelos promotores T7 ou SP6.

4.1.3 Linhagens de Microorganismos

4.1.3.1 *E. coli*

Foi utilizada a linhagem DH5 α de *Escherichia coli* para os experimentos de clonagem. Essa linhagem possui mutação no gene *endA*, que codifica a endonuclease I. Dessa forma, elimina-se a atividade inespecífica de endonuclease, resultando em um aumento da quantidade de plasmídeos por célula. Detém também mutações no sistema de metilação e restrição, responsável por permitir a essas bactérias o reconhecimento de DNA como estranho. Por isso,

torna-se possível a transformação eficiente de DNA gerado por reações de PCR. Uma modificação no gene *recA* previne a recombinação do DNA introduzido como DNA hospedeiro, contribuindo assim para uma maior estabilidade dos insertos.

4.1.3.2 *Leishmania tarentolae*

A linhagem selvagem Tar II ATCC 30267 de *L. tarentolae* foi utilizada para os experimentos de transfecção e avaliação da produção protéica.

4.1.4 Meio de Cultura e Condições de Cultivo

4.1.4.1 *E.coli*

As células de *E.coli* foram cultivadas a 37°C em agitador orbital (120rpm). Durante as etapas dos experimentos de clonagem foi utilizado o meio LB (Luria-Bertani), composto de: triptona 1%, extrato de levedura 0.5% e NaCl 1%, adicionado de 100 µg/mL de Ampicilina. Para meio sólido, foram acrescentados 1,5% de ágar.

4.1.4.2 *Leishmania tarentolae*

As células de *L. Tarentolae* foram cultivadas a 26°C, sem agitação, em meio BHI (Brain Heart Infusion), composto de: Mistura de Peptona (15,0g/l); Infusão de coração de vaca (10,0 g/l); Infusão de cérebro de vitela (7,5g/l); Dextrose (2,0g/l); Fosfato dissódico (2,5g/l); Cloreto de Sódio (5,0g/l) e Ágar Bacteriológico (15,0g/l). O meio foi suplementado com Hemina (5µg/ml).

4.1.5 Soluções e Tampões

Quadro 2: Soluções e tampões

Soluções	Componentes
Tampão de corrida para SDS-PAGE (10x, pH 6.8):	Tris 25mM, SDS 0.1%, Glicina 192mM
Tampão de amostra 2x (Laemmli)	Tris-HCl (pH 6.8, 0.5M), Azul de bromofenol, Glicerol 100%, SDS 10%, 2-Mercaptoetanol
Comassie Brilliant Blue	Azul de Coomassie blue C-250 (0.05%), Metanol (45%), Ácido acético (10%)
Solução descorante	Metanol (45%), Ácido acético (10%)
Tampão de corrida para eletroforese de DNA	TAE 10x, Tris base 400mM, EDTA 10mM pH 7.6, Ácido acético 190mM
Tampão de transformação	Tris-HCl 5mM pH 7.4, MgCl ₂ 5mM
Tampão de transfecção	HEPES 1M

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Clonagem

De acordo com a análise da sequência de nucleotídeos dos sítios de restrição do vetor pSP-BT1.YNEO α , as enzimas de restrição mais adequadas para realizar a clonagem foram *Bam*HI e *Hind*III (Promega). O vetor foi digerido com essas enzimas e, posteriormente, purificado. Os mesmos sítios de restrição foram adicionados ao gene sintético E5 multiepítomos 2 mediante PCR da construção pVAX_E5-M2, seguida de digestão com as referidas enzimas de restrição.

Em seguida, foi feita a inserção do gene E5-M2 no vetor pSP-BT1.YNEO α por meio de ligação com a enzima T4 DNA ligase (Promega), conforme instruções do fabricante. Após o período de incubação, os plasmídeos resultantes da reação foram transformados em *Escherichia coli* (DH5 α), conforme metodologia de clonagem molecular descrita por Sambrook et al. (2001). As colônias obtidas foram selecionadas para realização de PCR de colônia e mini extração plasmidial para verificar a clonagem do gene.

A mini extração plasmidial foi realizada de acordo com o método descrito por Maniatis et al. (1989). O material obtido a partir da extração foi analisado por reação de digestão com as enzimas *Bam*HI e *Hind*III para verificar a liberação do fragmento clonado no vetor.

4.2.2 Transfecção

As células de *L. tarentolae* foram cultivadas a 26°C em meio BHI (10mL) suplementado com Hemina (5 μ g/mL), e tiveram suas concentrações calculadas após contagem de células em Câmara de Neubauer. Curvas de crescimento foram realizadas em triplicata a partir de inóculos de 10⁶ células/mL. O crescimento das células nos três cultivos foi calculado diariamente durante 7 dias, para se observar as fases de crescimento dos protozoários e determinar o período mais propício para a realização da transfecção.

Em seguida, os protozoários foram cultivados em concentração inicial de 10^6 células/mL por 4 dias. Passado esse período, uma quantidade de células suficiente para promover a transfecção (25×10^7) foi obtida. Após isso, 10 µg da construção pSP-BT1.YNEOα_E5M2, assim como de seus respectivos controles, foram adicionados cada um a 25×10^7 células em 450µl de HEPES, armazenados em gelo por 15 minutos e eletroporados a 1,5kV e 36µF (ECM 399 Electroporation System, BTX). Posteriormente, as promastigotas foram incubadas a 26°C por 24h em meio BHI suplementado sem antibiótico e depois crescidas em meio com 20 µg/ml de G418 para realizar a pré-seleção das linhagens recombinantes (Papadopoulos et al., 1992). Após um dia, as linhagens foram propagadas em meio BHI líquido suplementado com o dobro da concentração de G418 (40 µg/ml).

Células de *L. tarentolae* foram transfectadas também com as construções pSP-BT1.YNEOα (vetor vazio) e pSP-BT1.YNEOα_BPVE5, além de uma transfecção realizada sem adição de DNA. Elas servem como controles para avaliar transfecção e, posteriormente, a produção de proteínas.

4.2.3 SDS-PAGE

Após cultivo durante 4 dias, 3mL e 1mL de cada cultura foram centrifugados separadamente a 3000 RPMs por 10 minutos, com posterior descarte dos sobrenadantes. As células foram então ressuspensas e lisadas em 100µL de tampão de amostra L2x. Os extratos proteicos obtidos foram então aquecidos e aplicados (10µL) em gel de poliacrilamida (15%). As corridas eletroforéticas foram realizadas em 3 horas (35mA), e os geis resultantes foram corados com *Coomassie Brilliant Blue* para permitir a visualização das bandas de proteínas.

5 RESULTADOS

5.1 OBTENÇÃO DO GENE

O gene sintético E5 multiepítomos 2 encontrava-se inicialmente clonado no vetor pVAX, por isso, foi realizada uma amplificação por PCR para obtê-lo. Durante a amplificação do gene E5-M2 foram adicionados sítios de restrição para as enzimas BamHI e HindIII, os quais também estão presentes no vetor pSP-BT1.YNEO α . A figura 8 apresenta a eletroforese em gel de agarose realizada após a amplificação do gene a partir da construção pVAX_E5-M2.

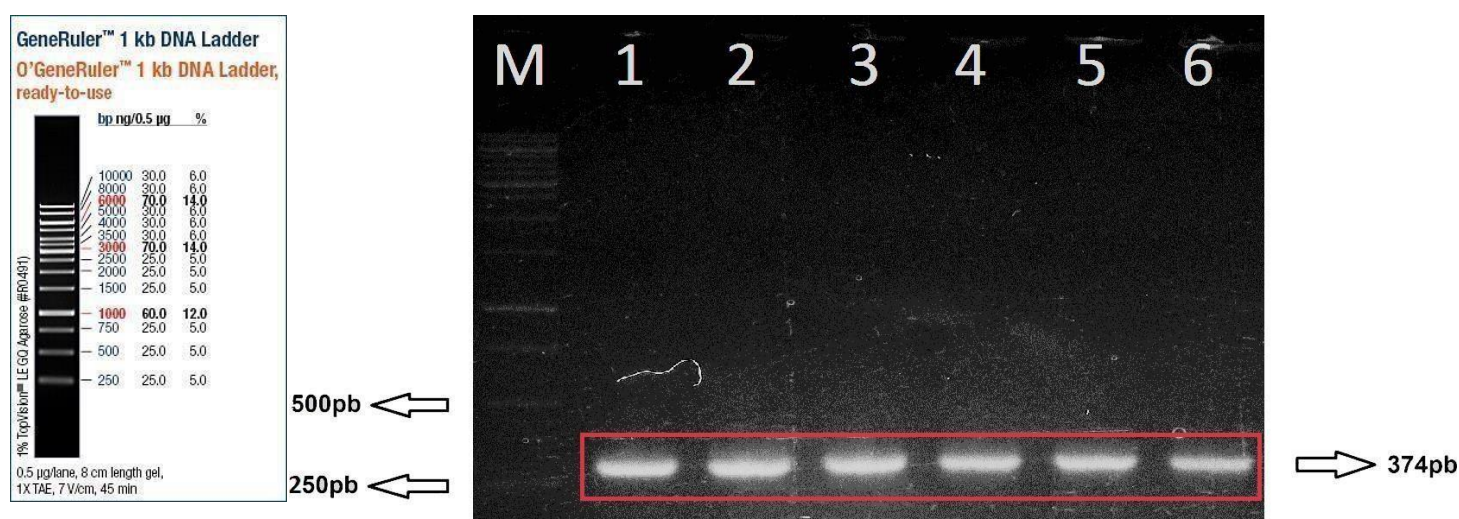


Figura 8: Obtenção do gene sintético E5-M2 de HPV 16. Eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE. M – Marcador Ladder GeneRuler 1Kb ThermoScientific; 1 a 6 -PCR do gene E5 multiepítomos 2, a partir da construção pVAX_E5-M2, apresentando o fragmento de 374pb correspondente ao gene.

5.2 CLONAGEM

A clonagem foi possível após a adição dos sítios de restrição para as enzimas *Bam*HI e *Hind*III ao gene E5 multiepítomos 2, que também estão presentes no vetor pSP-BT1.YNEO α . Gene e vetor foram submetidos a digestão com as referidas enzimas e, posteriormente, purificados. Dessa forma, ambos passaram a apresentar terminais coesivos, possibilitando assim a obtenção da construção pSP-BT1.YNEO α _E5M2, por meio de reação de ligação com a enzima T4 ligase.

Análises de restrição foram realizadas para verificar a presença do inserto no vetor. A figura 9 apresenta o resultado da reação de digestão da construção pSP-BT1.YNEO α _E5M2. Na imagem pode-se observar duas bandas, uma correspondente ao vetor pSP-BT1.YNEO α , de cerca de 6kb, e outra correspondente ao gene E5-M2, com 374pb. O resultado confirma a clonagem do gene E5 multiepítotos 2 no vetor de expressão pSP-BT1.YNEO α .

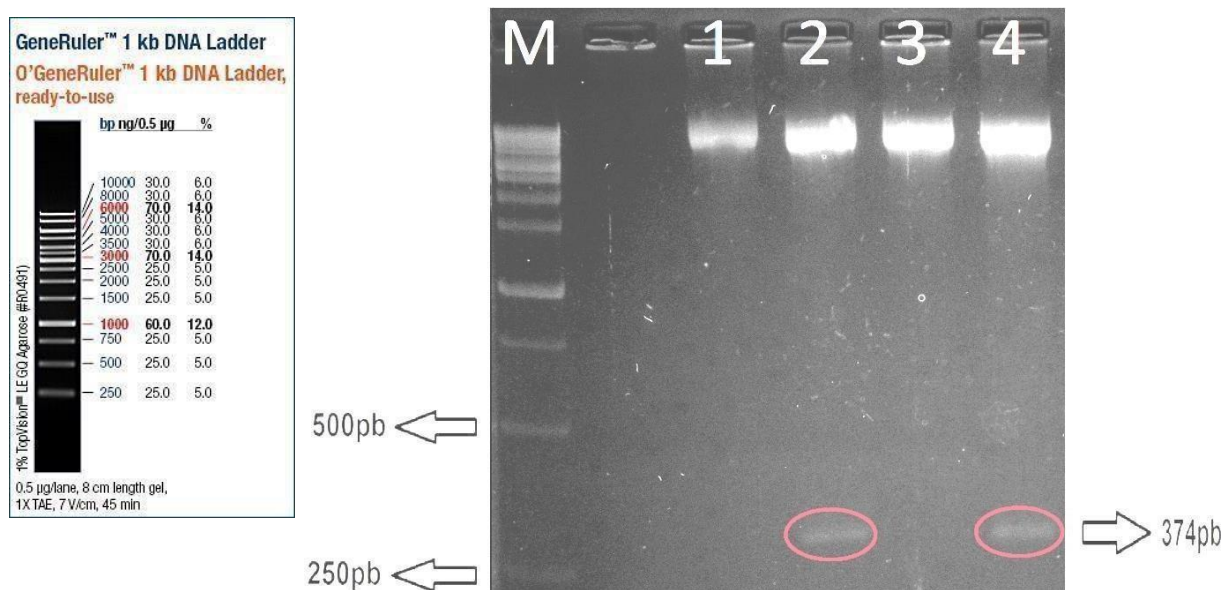


Figura 9: Clonagem do gene sintético E5-M2 de HPV 16 no vetor pSP-BT1.YNEO α . Digestão do gene E5-M2 com as enzimas *Bam*HI e *Hind*III. Eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE. M – Marcador Ladder GeneRuler 1Kb ThermoScientific; 1 - digestão do vetor pSP-BT1.YNEO α vazio com as enzimas de restrição *Bam*HI/*Hind*III; 2, 3 e 4 - digestão da construção pSP- BT1.YNEO α _E5-M2 com as enzimas *Bam*HI/*Hind*III, apresentando em 2 e 4, o vetor pSP-BT1.YNEO α vazio (~6kb) eo fragmento de 374pb correspondente ao gene E5-M2.

5.3 TRANSFEÇÃO

O desenvolvimento das células de leishmania foi observado por meio da realização de uma curva de crescimento (figura 10). Constatou-se que as células

permaneceram em fase log de crescimento até o dia 5, com um maior concentração entre os dias 4 e 5, sendo esse o momento propício para a realização da transfecção.

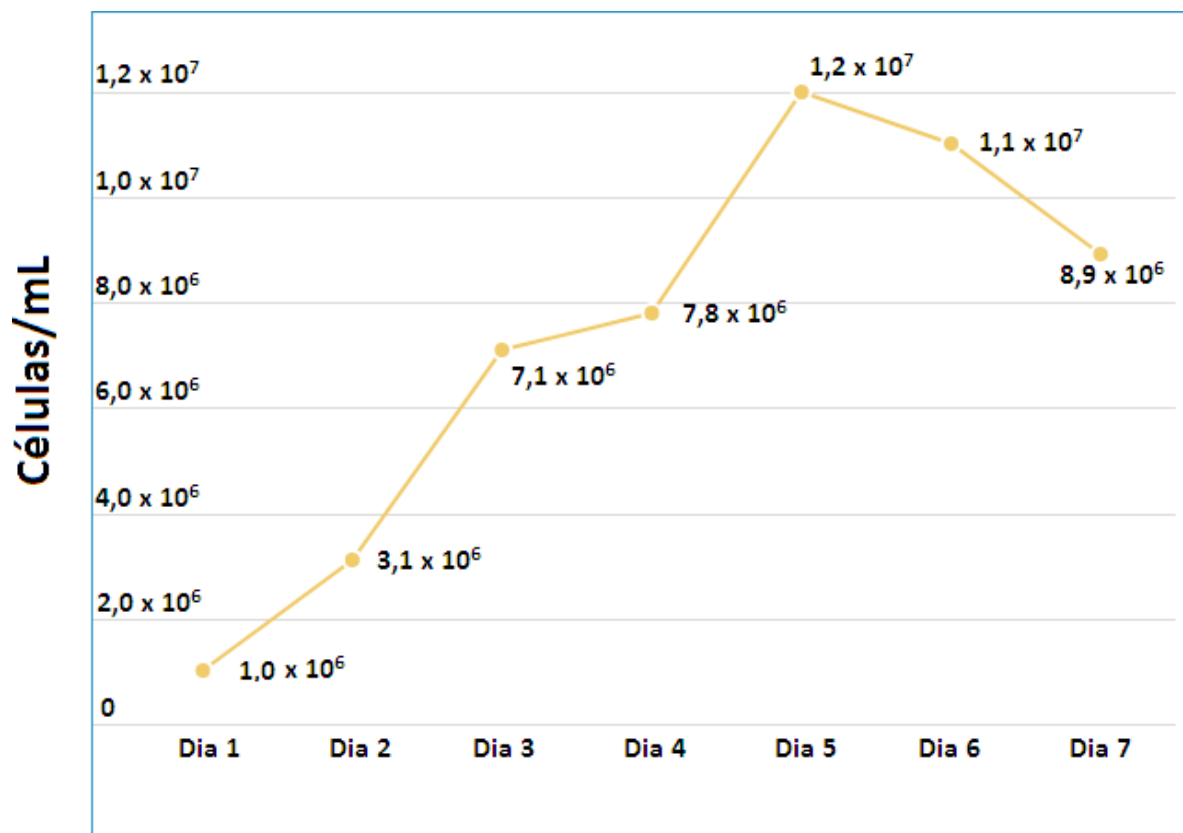


Figura 10: Curva de crescimento de *Leishmania tarentolae*. Dados obtidos a partir da concentração celular média de três cultivos de *L. tarentolae* no período de 7 dias, em meio BHI suplementado com hemina.

Após um cultivo de 4 dias, as células de *L. tarentolae* foram transfectadas com a construção pSP-BT1.YNEO α _E5-M2. Como controle do experimento, também foram cultivadas leishmanias de tipo selvagem, assim como células transfectadas como vetor vazio e com a construção pSP-BT1.YNEO α _E5BPV.

Realizado o cultivo após a transfecção, foi possível observar turbidez nos meios de cultura em que as leishmanias foram eletroporadas com as construções, enquanto a cultura transfectada sem o vetor se apresentou translúcida (figura 11). Foram constatadas contaminações por bactérias nas culturas eletroporadas com as construções.

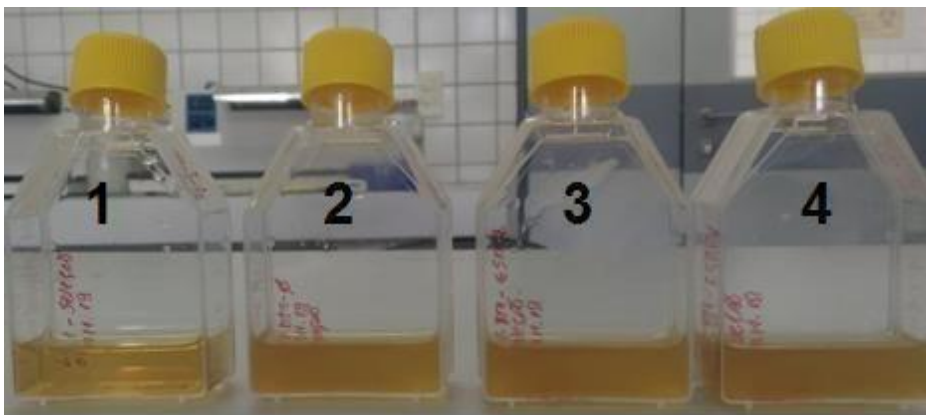


Figura 11: Transfecção das células de *L. tarentolae*. Cultivo dos protozoários em meio BHI suplementado acrescido do antibiótico G418 (20 µg/ml). Garrafas com culturas de 10mL 1 - Cultivo de *L. tarentolae* selvagem. 2 - Cultivo de leishmania transfectadas com pSP-BT1.YNEOα (vetor vazio). 3 - Cultivo das leishmanias transfectadas com a construção pSP-BT1.YNEOα_E5-M. 4 - Cultivo das leishmanias transfectadas com a construção pSP-BT1.YNEOα_E5BPV.

5.4 SDS-PAGE

As leishmanias recombinantes foram cultivadas em garrafas com 10mL de meio BHI. Após 4 dias de cultivo, as células de cada cultura foram centrifugadas e posteriormente lisadas separadamente, a partir de volumes de 1mL e 3mL. Os extratos protéicos obtidos das células transfectadas foi submetido a corrida eletroforética em gel de poliacrilamida. Na figura 12 é possível observar uma banda correspondente a proteína E5-M2 (14.6KDa) no extrato das leishmanias recombinantes para a construção PSP-BT1.YNEOα_E5-M2, proveniente do maior volume de cultura. Não foi possível detectar a presença da proteína no extrato obtido a partir do menor volume.

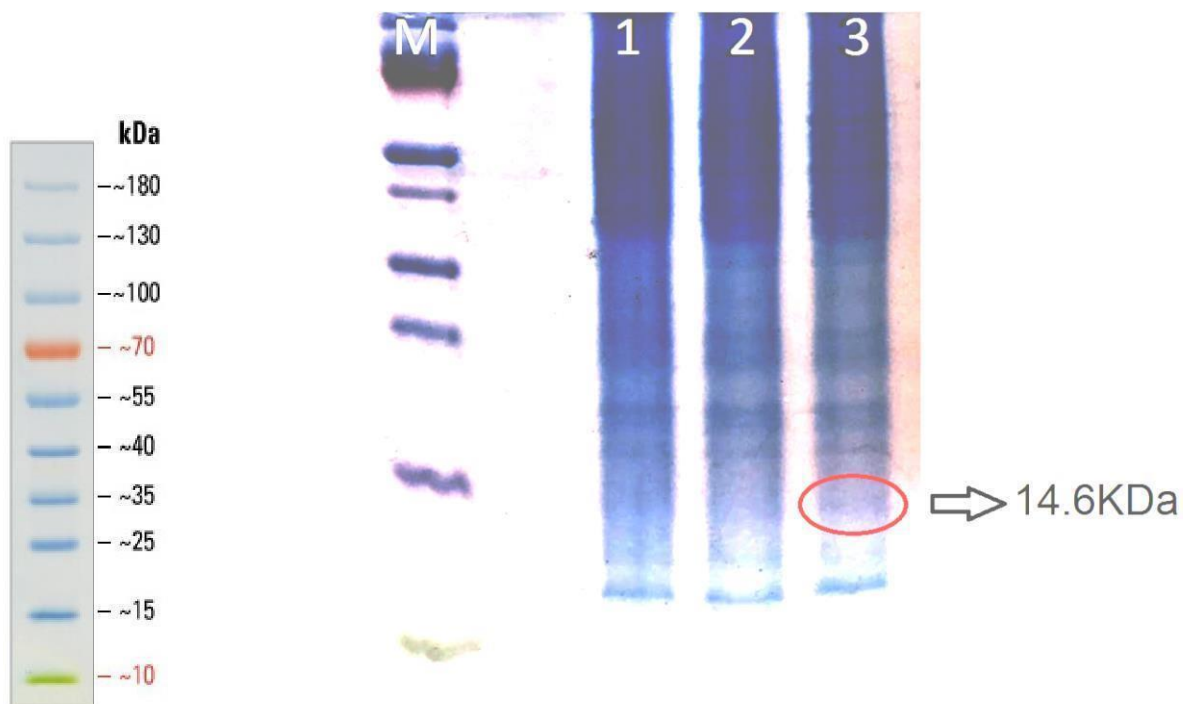


Figura12: SDS-PAGE (15%) do extrato proteico da cultura de células (3mL) de *Leishmania tarentolae* corado com *Coomassie Blue*. M – marcador de peso molecular pré-corado PageRuler™ (ThermoScientific); 1 – extrato proteico de *L. tarentolae* portando o plasmídeo pSP-BT1.YNEO α ; 2 - extrato proteico de *L. tarentolae* portando a construção pSP-BT1.YNEO α _BPVE5; 3 - extrato proteico de *L. tarentolae* portando a construção pSP-BT1.YNEO α _E5-M2, indicando a produção da proteína E5-M2, de 14.6KDa.

6 DISCUSSÃO

Extratos protéicos foram obtidos a partir da lise de volumes de 3mL e 1mL de cada cultura, visando chegar ao volume necessário para a detecção da proteína E5 multiepítomos 2. Após SDS-PAGE, não foi possível observar produção da proteína de interesse no extrato obtido a partir do menor volume de cultura. Entretanto, foi detectada a presença da proteína E5-M2 no extrato protéico obtido a partir do maior volume de cultura (3mL) (figura 12). Essa diferença nos resultados pode ser explicada devido a uma concentração inferior de proteínas presentes na cultura de 1mL, insuficiente para ser observada no gel de poliacrilamida.

Considerando que culturas contaminadas resultam na morte das células em cultivo (STACEY, 2011), a contaminação das culturas de leishmanias pode ter levado a uma menor produção das proteínas recombinantes. Entretanto, como descrito no protocolo de Lebowitz (1995), quantidades detectáveis de proteínas podem ser obtidas a partir de um dia após a transfecção das construções. Sendo assim, mesmo havendo morte celular devido à contaminação, proteínas foram produzidas em quantidade suficiente para serem detectadas por SDS-PAGE. Entretanto, em virtude da baixa concentração, não foi possível detectar sua presença por meio de *Western-Blot*. Novas transfecções devem ser realizadas para se obter uma maior produção protéica e permitir uma detecção mais precisa da proteína.

Os experimentos realizados foram baseados em estudos semelhantes, nos quais transfecções foram feitas para promover a produção de proteínas recombinantes em *L. tarentolae*. A tabela 3 apresenta os parâmetros utilizados para a transfecção nesses estudos, demonstrando que os mesmos estão em acordo com os experimentos realizados neste trabalho.

Tabela 3: Parâmetros utilizados para a transfecção de *L. tarentolae* em diferentes estudos. Destaca-se o uso de um diferente vetor (PSP-BT1.YNEO α) e maior concentração celular (25×10^7 cel/mL) neste estudo.

Autor	Proteína	Método	Vetor	Células	DNA	Antibiótico	Linhagem celular
Breton et al. (2007)	HPV 16 L1	Papadopoulou (1992)	pNEO-Gag	4×10^7 cel/mL	10-15 μ g	G418	Tar II (ATCC 30267)
Salehi et al. (2012)	A2-CPA-CPB	Papadopoulou (1992)	pLEXSY-neo2	4×10^7 cel/mL	5 μ g	G418	Tar II (ATCC 30267)
Bolhassani et al. (2014)	HIV-1 Gag	Papadopoulou (1992)	pLEXSY-neo2	4×10^7 cel/mL	5-6 μ g	G418	Tar II (ATCC 30267)
Shabazi et al. (2015)	HPV 16 E7	Papadopoulou (1992)	pLEXSY-neo2	4×10^7 cel/mL	15 μ g	G418	Tar II (ATCC 30267)
Abdossamadi et al. (2017)	HNP1	Papadopoulou (1992)	pLEXSY-neo2	4×10^7 cel/mL	20 μ g	G418	Tar II (ATCC 30267)
Ansari et al. (2019)	HCV PTNT gp96	Papadopoulou (1992)	pLEXSY-neo2	4×10^7 cel/mL	2 μ g	G418	Tar II (ATCC 30267)
Cardozo (2020)	HPV 16 E5-M2	Papadopoulou (1992)	pSP-BT1.YNEOα	25×10^7 cel/mL	10 μ g	G418	Tar II (ATCC 30267)

Uma plataforma para produção de proteínas em *L. tarentolae* chamada LESXY é disponibilizada comercialmente pela JenaBioscience, favorecendo a realização de experimentos como esses. Por isso, estudos desse gênero geralmente utilizam o vetor pLEXSY-neo2, como observado na tabela 3.

Entretanto, alguns autores também utilizam ou constroem novos vetores, como visto em Breton et al. (2007) e Padmanabhan et al. (2012). Maiores concentrações de células também podem ser empregadas (ESPIAU et al., 2017; LYDA et al., 2015). O vetor pSP-BT1.YNEO α utilizado neste trabalho foi desenvolvido por Padmanabhan et al. (2012) por meio da adição de elementos regulatórios ao arcabouço do vetor pSP72 (Promega), visando obter um elevado nível de expressão gênica. O mesmo vetor foi utilizado em nosso grupo por Mariz (2012), que foi capaz de expressar os genes E5 e E5 multiepítomos 1 de HPV 16, assim como E5 de BPV1.

Em relação à detecção, a proteína E5 é extremamente hidrofóbica, estando presente em membranas do retículo endoplasmático, complexo de Golgi e envelope nuclear. Devido sua elevada afinidade por membranas e hidrofobicidade, a sua detecção pode se tornar bastante dificultosa. Além disso, devido a interações hidrofóbicas, as proteínas E5 produzidas podem se agregar entre si, formando os chamados corpúsculos de inclusão, que também dificultam a detecção da proteína (VENUTI et al., 2011). Em tal caso, uma etapa de solubilização pode ser necessária para permitir a sua identificação (WINGFIELD, 2016)

Estudos demonstram que a proteína E5 pode ser purificada através de imunoprecipitação para facilitar a sua detecção. Esse procedimento desprende as proteínas das membranas celulares, isolando as mesmas para permitir a sua identificação (LIRA, 2010; SUPRYNOWICZ et al., 2005). Sendo assim, experimentos de purificação também poderão ser realizados para auxiliar a determinação da proteína E5 multiepítomos 2.

7 CONCLUSÕES

Ao fim dos experimentos, obteve-se o antígeno sintético E5 multiepítopos 2 e o cassete de expressão pSP-BT1.YNEO α _E5-M2. A produção de E5-M2 por *Leishmania tarentolae* foi observada por meio de SDS-PAGE, porém, a proteína não foi detectada por *Western Blot*. Novas transfecções e ensaios de purificação poderão auxiliar na detecção mais precisa da proteína. Posteriormente, as leishmanias recombinantes poderão ser testadas em ensaios pré-clínicos quanto ao potencial terapêutico como uma estratégia vacinal contra o câncer cervical.

REFERÊNCIAS

- Abdossamadi Z, Taheri T, Seyed N, Montakhab-Yeganeh H, Zahedifard F, Taslimi Y, Habibzadeh S, Gholami E, Gharibzadeh S, Rafati S (2017) Live *Leishmania tarentolae* secreting HNP1 as an immunotherapeutic tool against *Leishmania* infection in BALB/c mice. *Immunotherapy* 9(13):1089-1102.
- Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votypka J, Marty P, Delaunay P, Sereno D (2016) A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. *PLoS Neglected Tropical Disease* 10:3.
- Ansari N, Rafati S, Taheri T, Roohvand F, Farahmand M, Hajikhezri Z, Keshavarz A, Samimi-Rad K (2019) A non-pathogenic *Leishmania tarentolae* vector based-HCV polytope DNA vaccine elicits potent and long lasting Th1 and CTL responses in BALB/c mice model. *Molecular Immunology* 111:152-161.
- Araldi RP, Assaf SMR, de Carvalho RF, Souza JM, de Carvalho MACR, de Souza JM, Magnelli RF, Módolo DG, Roperto FP, Stocco R de C, et al. (2017) Papillomaviruses: a systematic review. *Genetics and Molecular Biology* 40:1-21.
- Arbyn M, Weiderpass E, Bruni L, Sanjosé S, Saraiya M, Ferlay J, Bray F (2018) Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: a worldwide analysis. *The Lancet Global Health* 8(2):191-203.
- Ardiani A, Higgins JP, Hodge JW (2010) Vaccines based on whole recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Cells. *FEMS Yeast Research* 10:1060-1069.
- Basile G, Peticca M (2009) Recombinant Protein Expression in *Leishmania tarentolae*. *Molecular Biotechnology* 43:273-278.
- Breton M, Tremblay MJ, Ouellette M, Papadopolou B (2005) Live Nonpathogenic Parasitic Vector as a Candidate Vaccine against Visceral Leishmaniasis. *Infection and Immunity* 73:6372-6382.
- Breton M, Zhao C, Ouellette M, Tremblay MJ and Papadopolou B (2007) 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. *Journal of General Virology* 88:217-225.
- Brianti P, Flammineis E, Mercuri SR (2017) Review of HPV-related diseases and cancers. *New Microbiologica*, 40, 2, 80-85, ISN1121-7138.
- Burd EM (2003) Human papillomavirus and cervical cancer. *Clinical Microbiology Reviews* 33:1-17.
- Boda D, Docea OA, Calina D, Ilie MA, Caruntu C, Zurac S, Neagu M, Constantin C, Branisteanu DE, Voiculescu V, Moulakis ND, Tzanakakis G, Spandidos DA, Drakoulis N, Tsatsakis A (2018) Human papillomavirus: Apprehending the link with carcinogenesis and unveiling new research avenues (Review) *International Journal of Oncology* 52:637-655.
- Bolhassani A, Shirbaghaee Z, Agi E, Davoudi N (2015) VLP production

Leishmania tarentolae: A novel expression system for purification and assembly of HPV 16 L1. *Protein Expression and Purification* 116:7-11.

Chan CK, Aimagambetova G, Ukybassova T, Kongrtay K, Azizan A (2019) Human Papillomavirus Infection and Cervical Cancer: Epidemiology, Screening, and Vaccination—Review of Current Perspectives. *Journal of Oncology* 1-11.

Cordeiro MN, Paolini F, Massa S, Curzio G, Illiano E, Silva AJD, Franconi R, Bissa M, Morghen CM, Freitas AC, Venuti A (2015) Anti-tumor effects of genetic vaccines against HPV major oncogenes. *Human Vaccine & Immunotherapy* 11:1-8.

Costa S, Almeida A, Castro A, Domingues L (2014) Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in *Escherichia coli*: the novel Fh8 system. *Frontiers in Microbiology* 5:63.

Harper DM, DeMars LR (2017) HPV vaccines - A review of the first decade. *Gynecologic Oncology* 146:196-204.

De Smet R, Allais L, Cuvelier CA (2014) Recent advances in oral vaccine development, *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 10:1309-1318.

De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, Zur H (2004) Classification of papillomaviruses. *Virology* 324:17-27.

De Freitas AC, De Oliveira THA, Barros, MR, Venuti A (2017) hrHPV E5 oncoprotein: immune evasion and related immunotherapies. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 36:71.

Dimaio D; Petti LM (2013) The E5 proteins. *Virology* 445:99-114. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. Instituto Nacional De Câncer José Alencar Gomes Da Silva (INCA)/ Ministério da Saúde, Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: INCA, 2020. 126 p., ISBN 978-85-7318-389-4.

Doorbar J. (2005) The Papillomavirus Life Cycle. *Journal of Clinical Virology* 32:7-15.

Doorslaer KV (2013) Evolution of the Papillomaviridae. *Virology* 445:11-20.

Doorbar J, Lawrence WQ (2012) The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine* 30:55-70.

Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, Murakamil (2016) Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Reviews in Medical Virology* 25:2- 23.

Doorslaer KV (2013) Evolution of the Papillomaviridae. *Virology* 445:11-20. Espiau B, Vilhena V, Cuvillier A, Barral A, Merlin G (2017) Phenotypic diversity and selection maintain *Leishmania amazonensis* infectivity in BALB/c mouse model *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 112(1):44-52.

Fernandes JV; Fernandes TAAM (2012) Human Papillomavirus: Biology and Pathogenesis. *Human Papillomavirus and Related Diseases - From Bench to Bedside* 34 - A Clinical Perspective. ISBN:978-953-307-860-1, InTech, Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/human-papillomavirus-and->

related-diseases-from-bench-to-bedside-a-clinical-perspective/human-papillomavirus-biology-and-pathogenesis.

Francesca P, Gianfranca C, Cordeiro MN, Massa S, Mariani L, Pimpinelli F, Freitas AC, Franconi R, Venuti A (2017) HPV 16 E5 oncoprotein is expressed in early stage carcinogenesis and can be a target of immunotherapy. *Human Vaccines and Immunotherapeutics* 13:291-297.

Fedrizzi EM (2011) Epidemiology of the genital HPV infection. *Revista Brasileira de Patologia do Trato Genital Inferior* 1:3-8.

Gagoski D, Polinkovsky ME, Mureev S, Kunert A, Johnston W, Gambin Y (2016) Performance benchmarking of four cell-free protein expression systems. *Biotechnology and Bioengineering* 113(2):292-300.

Georgescu SR, Mitran CJ, Mitran MI, Caruntu MC, Sarbu MI, Matei C, Nicolae I, Tocut SM, Popa MI, Tampa M (2018) New Insights in the Pathogenesis of HPV Infection and the Associated Carcinogenic Processes: The Role of Chronic Inflammation and Oxidative Stress. *Journal of Immunology Research* 1-10.

Gazdag EM, Cirstea IC, Breitling R, Lukes J, Blankenfeldt W, Alexandrov K (2010) Purification and crystallization of human Cu/Zn superoxide dismutase recombinantly produced in the protozoan *Leishmania tarentolae*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 66:871-877.

Hosseinzadeh S, Bolhassani A, Rafati S, Taheri T, Zahedifard F, Daemi A, Memarnejadian A (2013) A non-pathogenic live vector as an efficient delivery system in vaccine design for the prevention of HPV16 E7-overexpressing cancers. *Drug Delivery* 20(3-4):190-198.

Jia B, Jeon CO (2016) High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives. *Open Biology* 6:160-196.

Lebowitz JH (1994) Transfection experiments with *Leishmania*. *Methods in Cell Biology*. Vol. 45. Cambridge: Academic Press.

Leone S, Sannino F, Tutino ML, Parrilli E, Picone D (2015) Acetate: friend or foe? Efficient production of a sweet protein in *Escherichia coli* BL21 using acetate as a carbon source. *Microbial Cell Factories* 14(1).

Lira RCD. Desenvolvimento de uma construção vacinal baseada no gene E5 de BPV usando "codon usage" aplicada em imunização genética. Dissertação (Mestrado em Genética). Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2010.

Liao S, Deng D, Zeng D, Zhang L, Hu X, Zhang W, Li L, Jiang X, Wang C, Zhou J, Wang S, Zhang H, Ma D (2013) HPV16 E5 Peptide Vaccine in Treatment of Cervical Cancer In Vitro and In Vivo. *Journal of Huazhong University of Science and Technology - Medical Science* 33(5):735-742.

Lyda TD, Joshi MB, Andersen JF, Kelada AY, Owings JP, Bates PA (2015) A unique, highly conserved secretory invertase is differentially expressed by promastigote developmental forms of all species of the human pathogen, *Leishmania*. *Molecular and Cellular Biochemistry* 404(0):53-77.

Kazemi B (2011) Genomic Organization of *Leishmania* Species. *Iranian Journal of*

Parasitology 6:1-18.

Kawana K, Adachi K, Kojima S, Kozuma S e Fujii T (2012) Therapeutic human papillomavirus (HPV) vaccines: a novel approach. *The Open Virology Journal* 6:264-269.

Klatt S, Simpson L, Maslov DA, Konthur Z (2019) *Leishmania tarentolae*: Taxonomic classification and its application as a promising biotechnological expression host. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 13:7.

Legastelois I, Buffin S, Peubez I, Mignon C, Sodoyer R, Werle B (2017) Non conventional expression systems for the production of vaccine proteins and immunotherapeutic molecules. *Human Vaccines and Immunotherapeutics* 13:947-961.

Mailinh VU, Jim YU, Olutosin AA, Chuang L (2018) Cervical Cancer Worldwide. *Current Problems in Cancer* Doi: 10.1016/j.currproblcancer.2018.06.003.
Mariz FC. Desenvolvimento de duas plataformas biotecnológicas baseadas em *Pichia pastoris* e *Leishmania tarentola* para produção de candidatos vacinais contra os Papilomavírus humano (HPV) e bovino BPV). Tese (Doutorado em Inovação Terapêutica – Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2016.

Maufort JP, Shai A, Pitot H, Lambert PF (2010) A Role for HPV 16 E5 in Cervical Carcinogenesis. *Cancer Research* 70:2924-2931.

Müller M, Prescott EL, Wasson CW, Macdonald A (2015) Human papillomavirus E5 oncoprotein: function and potential target for antiviral therapeutics. *Future Virology* 10:27-39.

Nayar R, Wibur DC (2017) The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology: A Historical Perspective. *Acta Cytologica* 61:359-372.

Nezafat N, Ghasemi Y, Javadi G, Khoshnoud MJ, Omidinia E (2014) A novel multi-epitope peptide vaccine against cancer: An in silico approach. *Journal of Theoretical Biology* 349:121-134.

Niimi T (2012) Recombinant Protein Production in the Eukaryotic Protozoan Parasite *Leishmania tarentolae*: A Review. Argelia Lorence (ed.), *Recombinant Gene Expression: Reviews and Protocols*, Third Edition, *Methods in Molecular Biology*, vol. 824, DOI 10.1007/978-1-61779-433-9_15.

Paolini F, Gianfranca C, Cordeiro MN, Massa S, Mariani L, Pimpinelli F, de Freitas AC, Franconi R, Venuti A (2017) HPV 16 E5 oncoprotein is expressed in early stage carcinogenesis and can be a target of immunotherapy. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 13:291-297.

Padmanabhan PK, Dumas C, Samant M, Rochette A, Simard MJ, et al. (2012) Novel Features of a PIWI-Like Protein Homolog in the Parasitic Protozoan *Leishmania*. *PLOS ONE* 7:12.

Panahi H A, Bolhassani A, Javadi G, Noormohammadi Z, Agi E (2020) Development of multi-epitope therapeutic vaccines against the most prevalent high-risk human papillomaviruses. *Immunotherapy* 12(7):459-479.

Rojas-Sánchez S, Figueroa-Ángulo E, Moreno-Campos R, Florencio-Martínez LE,

Manning-Cela RG, Martínez-Calvillo S (2016) Transcription of *Leishmania major* U2 small nuclear RNA gene is directed by extragenic sequences located within a tRNA-like and a tRNA-Ala gene. *Parasites & Vectors* 9:401.

Rosano GL, Ceccarelli EA (2014) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology* 5:172.

Rubin LG, Levin ML, Ljungman P, Davies GE, Avery R, Tomblyn M, Bousvaros A, Dhanireddy S, Sung L, Keyserling H, Kangl (2014) Clinical Practice Guideline for Vaccination of the Immunocompromised Host. *Clinical Infectious Disease* 59:309-318.

Salehi M, Taheri T, Mohit E, Zahedifard F, Seyed N, Taslimi Y, Sattari M, Bolhassani A, Rafati S (2012) Recombinant *Leishmania tarentolae* encoding the HPV type 16 E7 gene in tumor mice model. *Immunotherapy* 4(11):1107- 1120.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press 800.

Sanjose S, Brotons M, Pavon MA (2018) The natural history of human papillomavirus infection. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology* 47:2-13

Serrano B, Brotons M, Bosch FX, Bruni L (2017) Epidemiology and burden of HPV related disease. *Clinical Obstetrics & Gynaecology* S1521-6934(17)30124-4.

Sette A e Fikes J. Epitope-based vaccines: an update on epitope identification, vaccine design and delivery (2003) *Current Opinion in Immunology* 15:461- 470.

Shahbazi M, Zahedifard F, Taheri T, Taslimi Y, Jamshidi S, Shirian S (2015) Evaluation of Live Recombinant Nonpathogenic *Leishmania tarentolae* Expressing Cysteine Proteinase and A2 Genes as a Candidate Vaccine against Experimental Canine Visceral Leishmaniasis. *PLOS*. Disponível em <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0132794> doi:10.1371/journal.pone.0132794.

Smith SM (2011) Strategies for the Purification of Membrane Proteins. *Methods in Molecular Biology* 681:485-96.

Sreedevi A, Javed R, Dinesh A (2015) Epidemiology of cervical cancer with special focus on India. *International Journal of Women's Health*. *International Journal of Women's Health* 7:405-414.

Stacey GN (2011) Cell Culture Contamination. *Cancer Cell Culture*. In: Cree IA, *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*, 2. ed. New York: Springer Science.

Suprynowicz FA, Disbrow GL, Simic V, Schlegel R (2005) Are transforming properties of the bovine papillomavirus E5 protein shared by E5 from high-risk human papillomavirus type 16. *Virology* 332:102-113.

Tripathi NK e Shrivastava A (2019) Recent developments in recombinant protein production. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 7:420.

Venuti A, Paolini F, Nasir L, Corteggio A, Roperto S, Campo MS, Borzacchiello G (2011) Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions.

Molecular Cancer 10:140.

Viarisio D, Gissmann L, Tommasino M (2017) Human papillomaviruses and carcinogenesis: well established and novel models. *Current Opinion in Virology* 26:56-62.

Wendland EM, Caierão J, Domingues C, Maranhão AGK, Souza FMA, Hammes LS, Falavigna M, Hilgert JB, Hugo FN, Bessel M, Villa LL, Benzaken AS (2018) POP-Brazil study protocol: a nationwide cross-sectional evaluation of the prevalence and genotype distribution of human papillomavirus (HPV) in Brazil. *British Medical Journal Open*. Disponível em <https://bmjopen.bmj.com/content/bmjopen/8/6/e021170.full.pdf>
doi:10.1136/bmjopen-2017-021170.

Werten MWT, Eggink G, Stuart MAC (2019) Production of protein-based polymers in *Pichia pastoris*. *Biotechnology Advances* 37(5):642-666.

Wingfield P T (2016) Overview of the Purification of Recombinant Proteins. *Current Protocols in Protein Science*. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25829302/doi:10.1002/0471140864.ps0601s> 80.

Yang A, Farmer E, Lina J, Wua TC, Hunga C (2017) The current state of therapeutic and T cell-based vaccines against human papillomaviruses. *Virus Research* 231:148-165.

Yang DX, Soulos PR, Davis B, Gross CP, James BY (2018) Impact of widespread cervical cancer screening: number of cancers prevented and changes in race-specific incidence. *American Journal of Clinical Oncology* 41(3): 289- 294.