

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

**Avaliação do uso de células da levedura *Pichia*
pastoris para expressão do gene L1 do
Papilomavírus Humano tipo 16**

ELIANE CAMPOS COIMBRA

Recife, PE
Setembro, 2007

ELIANE CAMPOS COIMBRA

Avaliação do uso de células da levedura *Pichia pastoris* para expressão do gene L1 do Papilomavírus Humano tipo 16

Dissertação apresentada ao Programa de **Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco**, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de **Mestre em Genética**.

Orientador: **Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas**, Depto. de Genética, Centro de Ciências Biológicas, UFPE.

Co-Orientador: **Prof. Dr. José Ferreira dos Santos**, Depto. de Genética, Centro de Ciências Biológicas, UFPE.

Recife, PE
Setembro, 2007

Coimbra, Eliane Campos

Avaliação do uso de células da levedura *Pichia pastoris* para expressão do gene L1 do Papilomavírus Humano tipo 16 / Eliane Campos Coimbra. – Recife: O Autor, 2007.

103 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Genética, 2007.

Inclui bibliografia e anexo.

1. Doenças sexualmente transmissíveis 2. Levedura – *Pichia pastoris* 3. Papilomavírus Humano I. Título.

**616.97
616.95**

**CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)**

**UFPE
CCB – 2007-138**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

PARECER DA COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE

ELIANE CAMPOS COIMBRA

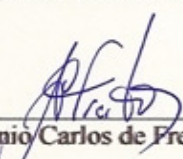
**"AVALIAÇÃO DO USO DAS CÉLULAS DE *PICHA PASTORIS* PARA
EXPRESSÃO DO GENE L1 DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO TIPO 16"**

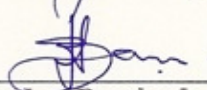
Área de concentração: **BIOLOGIA MOLECULAR**

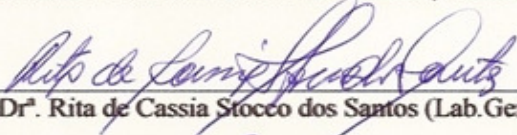
A comissão examinadora, composta pelos professores abaixo, sob a presidência do primeiro considera a candidata:

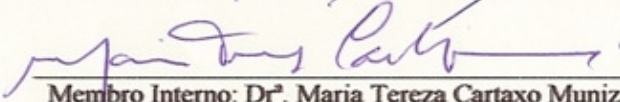
ELIANE CAMPOS COIMBRA como APROVADA

Recife, 20 de Setembro de 2007.

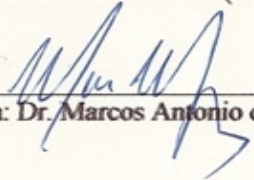

Orientador: Dr. Antonio Carlos de Freitas (Genética-UFPE)


Co-Orientador: Dr. José Ferreira dos Santos (Genética-UFPE)


Membro Interno: Dr.ª Rita de Cassia Stocco dos Santos (Lab. Genética-BUTANTAN)


Membro Interno: Dr.ª Maria Tereza Cartaxo Muniz (CEON-UPE)


Membro Externo: Dr. Giovani Rota Bertani (Bioquímica-UFPE)


Coordenador do Programa: Dr. Marcos Antonio de Moraes Júnior

**Dedico este trabalho aquelas
pessoas que um dia poderão ser
beneficiadas com os futuros
frutos do mesmo.**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me proporcionar tantas oportunidades de aprendizado e por colocar pessoas tão especiais e fundamentais para a minha caminhada.

Ao meu pai Estevão, a minha mãe Teresa e ao meu irmão Rafael, por serem meus exemplos de vida, pelo carinho, amor e conforto, e principalmente, por constituírem a base para meu progresso moral e profissional.

À minha tia-avó, Helena Campos (*in memoriam*), que também é um grande exemplo para mim e que tenho certeza, sempre me apóia do lugar onde ela está.

A Dolores Netto Maia, pela amizade sincera que me levanta sempre que preciso.

Ao meu namorado, Murilo Reis, pela paciência, atenção e apoio, mas principalmente pelo seu amor, que torna ainda mais belo e único cada momento da minha vida.

Ao meu orientador, Antonio Carlos de Freitas que confiou nas minhas capacidades. Agradeço todo o tempo dedicado a este trabalho, o incentivo, a atenção, a paciência e os ensinamentos.

Ao meu amigo de mestrado e de projeto, Helder Melo de Souza, que compartilhou cada etapa deste projeto e foi fundamental para a realização deste, com seu apoio intelectual e moral. Muito obrigada pela confiança, incentivo, atenção, amizade e descontração.

Aos companheiros e amigos do Laboratório de Genética de Microorganismos que sempre estiveram dispostos a ajudar e que tornavam os dias de trabalho mais agradáveis, são eles: Anna Carla, Fernanda, Rochane, Brígida, Humberto, Elainy, Rute, Hélio, Meiriana, Teresa, Carol e Marcílio.

Aos amigos do grupo de pesquisas vacinais contra o papilomavírus: Renato, Mirela, Júlia, André, Felipe, Angélica, Cybelle, Marcelo, Janaíne, Rafaelle e Isabelle, pelo apoio, generosidade e companheirismo

A Ceça (Maria da Conceição Gomes Leitão), do laboratório de imunologia do LIKA, que apareceu como uma luz no meu caminho, em determinado momento deste projeto e não só dedicou enorme parte de seu tempo para ensinar e ajudar como também se tornou uma grande amiga.

A Esteban Espinosa Vidal, do Laboratório de Genética de Microorganismos, pela atenção e grande ajuda com as extrações de RNA.

Ao meu co-orientador, Dr. José Ferreira e ao Dr. Marcos Morais pela colaboração e participação no projeto.

À amiga, Danona (Danielle Moura), do Lab. de Microbiologia do AGGEU, que ajudou muito com seus conhecimentos e sempre se mostrou bastante prestativa e atenciosa.

Aos que fazem parte do grupo HPV do LIKA, do Setor de Biologia molecular que se tornaram amigos por dividir comigo uma boa parte da realização deste projeto, trabalhando de forma interativa e divertida: Monique Ferraz, Elaine Souza, Máira Mafra e André Nunes.

Aos companheiros que fazem parte do Setor de Biologia molecular do LIKA, que contribuíram de forma direta ou indireta neste projeto, como os Professores: Gandhi Rádis e Giovani Bertani, e as amigas: Nathália de Alencar e Elba Carvalho.

À Dra. Danyelly Bruneska Gondim Martins e ao Dr. José Luís de Lima Filho, pela dedicação, atenção e apoio para o desenvolvimento deste projeto.

À Dra. Rita de Cassia Stocco dos Santos, do Laboratório de Genética (Instituto Butantan) e ao Dr. Willy Beçak, do Laboratório de Genética (Instituto Butantan) e do Dept. de Genética (UFPE) que contribuíram de forma significativa para a realização deste projeto.

Ao Dr. Fernando Araripe Gonçalves Torres e a Dra. Lídia Maria Pepe de Moraes, da UnB, pela parceria e disponibilidade que muito auxiliaram no andamento deste trabalho.

A todos os funcionários do Dept de Genética e do LIKA, que ajudaram de alguma forma no andamento deste, como D. Zizi (genética), Seu Romildo (genética), Verinha (LIKA) e Robson (LIKA).

SUMÁRIO

	Página
<i>Lista de Figuras</i>	i
<i>Lista de Tabelas</i>	iii
<i>Lista de Abreviações</i>	iv
Resumo	1
1. Introdução	2
2. Revisão bibliográfica:	4
2.1. Papilomavírus humano (<i>Human PapilomaVirus</i> - HPV)	4
2.2. Biologia molecular do HPV	7
2.3. Ciclo de infecção do HPV	8
2.4. HPV e Transformação Celular	10
2.5. HPV x Câncer cervical	14
2.6. Resposta imune ao HPV	18
2.7. Vacina Profilática contra o HPV: VLP - <i>Virus-Like Particle</i>	24
2.8. Sistemas Heterólogos de expressão	27
2.9. <i>Pichia Pastoris</i> : Sistema Heterólogo de expressão	30
2.10. Justificativas deste trabalho	34
2.11. Objetivos deste trabalho	35
3. Referências Bibliográficas	36
4. Artigo Científico em publicação	57
5. Informações complementares	67
6. Conclusões	91
7. Anexos	92
7.1. Instruções para autores <i>Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology</i>	93
7.2. Carta de aceite do artigo	97
7.3. Instruções para autores – <i>Genetics and Molecular Biology</i>	101

LISTA DE FIGURAS

	Página
Revisão da Literatura	
Figura 1. Morfologia do papilomavírus	4
Figura 2. (A) Papilomas no trato genital feminino	5
(B) Papilomas na região peniana	5
(C) Colo do útero com lesão	5
(D) Verrugas cutâneas	5
Figura 3. Genoma do HPV	7
Figura 4. Ciclo de infecção do HPV	9
Figura 5. (A) Atuação de p53 na célula	12
(B) Complexo E6AP-E6	12
Figura 6. (A) Associação de pRB com fator E2F	13
(B) Complexo pRB-E7	13
Figura 7. (A) Expansão da infecção no tecido epitelial cervical	16
(B) Esquema do colo uterino com neoplasia intraepitelial cervical	16
Figura 8. Apresentação de antígeno pelas células de Langerhan	21
Figura 9. Esquema de mecanismos de evasão imune do HPV	23
Figura 10. (A) Pentâmero de L1	24
(B) Organização da estrutura viral	24
Figura 11. Virus-like particle de HPV	25
 Artigo Científico em publicação	
Figura 1. Construct of the <i>P.pastoris</i> expression vector: pPICZLIH16	62
Figura 2. Screening of GS115 transformants (GS115/pPICZL1H16)	63
Figura 3. Analysis of GS115/pPICZL1H16 phenotype	63
Figura 4. RT-PCR of the GS115/ pPICZL1H16 clones	64
Figura 5. (a) SDS- PAGE staining with silver nitrate of the GS115/ pPICZL1H16 clones samples and GS115 wild type	64
(b) Dot blot using anti-His tag was performed to verify the expression of L1 protein	64

Informações complementares

Figura 1. Extração e digestão de plasmídio PBR322H16	69
Figura 2. Esquema da PCR do gene L1	71
Figura 3. Descrição esquemática do problema da não amplificação de L1	72
Figura 4. Estratégia para amplificação do gene L1 de HPV-16	73
Figura 5. Genoma do HPV-16 purificado	73
Figura 6. Extração, digestão e PCR de pGEML1H16	75
Figura 7. Dot blot de proteína com cauda poli-His (controle positivo) e anticorpo primário anti-tetra-His	80
Figura 8. Dot blot de proteína com cauda poli-His (controle positivo) e anticorpo primário anti-penta-His	81
Figura 9. Dot blot de proteína total intracelular de clone 1 com anticorpo primário anti-penta-His	82
Figura 10. Dot blot de proteína total intracelular de clone 1 com anticorpo primário anti-tetra-His	82
Figura 11. Dot blot de proteína total intracelular de clone 1 diluído	84
Figura 12. Dot blot de proteína total intracelular do controle negativo GS115	84
Figura 13. Dot blot de proteína poli-His, controle positivo, em maiores concentrações	85
Figura 14. Dot blot de clone 1 e GS115 com ausência de anticorpo primário, controle negativo	86
Figura 15. Dot blot de clones 1, 2 e 3, e GS115 purificados por coluna de níquel	88
Figura 16. Dot blot de clones 1, 2 e 3, e GS115 com anticorpo primário conjugado	89
Figura 17. Western blot de proteína total intracelular do clone 1	90

LISTA DE TABELAS

	Página
Informações complementares	
Tabela 1. Sequência de nucleotídeos dos primers para amplificação do gene L1	70
Tabela 2. Localização do sítio de BamHI no genoma de HPV-16	71
Tabela 3. Composição da reação de ligação do genoma de HPV-16	74
Tabela 4. Reação de PCR direta de colônia	76
Tabela 5. Primers para amplificação da região <i>AOX</i>	77

LISTA DE ABREVIACÕES

AOX1 e AOX2	gene que codifica para álcool oxidase isoformas 1 ou 2
AP-1	proteína ativadora-1
APC	célula apresentadora de antígeno
BPV	papilomavírus bovino
<i>c-jun / c-fos</i>	fatores de transcrição nucleares ativados por transdução de sinal
CIN e NIC	carcinoma intraepitelial cervical
CL	célula de Langerhan
CMI	resposta imune celular
COPV	papillomavirus oral canino
CRPV	papilomavírus de coelho
CSF	fator estimulador de colônia
DNA	ácido desoxirribonucleico
DO ₆₀₀	densidade ótica a 600 nm
<i>E</i>	gene que codifica proteína Early ou imediata
E2F	fator de transcrição E2
EGFR	receptor do fator de crescimento epidermal
<i>FLD1</i>	gene que codifica para formaldeído desidrogenase
<i>GAP</i>	gene que codifica para gliceraldeído fosfato
GMR	genes de mecanismo de reparo
GS115	fenótipo da levedura <i>Pichia pastoris</i>
HDAC	histona desacetilase
HIV	vírus da imunodeficiência humana
HPV	papilomavírus humano
HSIL	lesão intraepitelial escamosa de alto grau
IFN- α , β e γ	interferons alfa, beta e gama
IL-18	interleucina-18
IRF-3	fator regulatório de interferon-3
ISGF-3	fator de crescimento ativador de interferon-3
KM71	fenótipo da levedura <i>Pichia pastoris</i>
<i>L</i>	gene que codifica proteína Late ou tardia
LCR	longa região de controle
LMP-2	Proteína de baixa massa molecular - 2 ou subunidade do proteassoma (MHC)

LSIL	lesão intraepitelial escamosa de baixo grau
MAP	proteína que estimula divisão celular
MHC	complexo de histocompatibilidade principal
Mut +	metabolismo rápido de metanol
Mut s	metabolismo lento de metanol
NF-1	fator nuclear-1
<i>Notch-1</i>	gene que codifica para proteína transmembrana da família Notch
p21	proteína 21, supressora de tumor
p53	proteína 53, supressora de tumor
p107, 130	proteínas da família Rb
p300	histona acetiltransferase, molécula co-ativadora de transcrição
<i>PEX8</i>	gene que codifica para proteína da matriz peroxisomal
pRB	proteína do retinoblastoma
RBP-1	Proteína de ligação ao retinol - 1
RNA _m	ácido ribonucleico mensageiro
S	síntese (replicação)
SCP	biomassa usada como fonte de alimento
SIL	lesão intraepitelial escamosa
STAT-1	transdutor de sinal e ativador de transcrição
TAP-1	proteína de transporte de fragmentos peptídicos – 1 (MHC)
TCD4+	célula T auxiliar
TCD8+	célula T citotóxica
Tyk2	tirosina-quinase 2
URR	região regulatória
UV	ultra violeta
VLP	partícula semelhante ao vírus
XPGC	proteína do xeroderma pigmentoso G
<i>YPT1</i>	gene que codifica para proteína envolvida com o transporte de vesículas entre o retículo endoplasmático e o Golgi.

RESUMO

Os papilomavírus humanos infectam o tecido epitelial mucoso ou cutâneo provocando o aparecimento de verrugas ou papilomas benignos que podem regredir ou evoluir para lesões malignas. A infecção por HPV é a doença sexualmente transmissível mais freqüente do mundo e está relacionada com a etiologia de certos tipos de cânceres, principalmente os anogenitais. O câncer cervical é o segundo mais freqüente entre as mulheres do mundo e o HPV-16 é o tipo mais encontrado, presente em 60% dos casos. Estudos para o combate da infecção mostram que as vacinas baseadas em *Virus-Like Particles* (VLPs), formadas a partir das proteínas capsidiais L1/L2 ou L1, induzem à produção de anticorpos neutralizantes que conferem proteção contra o mesmo tipo viral. A imunidade humoral é direcionada contra os epítomos conformacionais da proteína L1 que compõe 90% da estrutura capsidial. As VLPs são obtidas através da expressão dos genes capsidiais em sistema de expressão heterólogo e processos de purificação. A levedura *Pichia pastoris* é um sistema de expressão, eficiente e de baixo custo para a produção de altos níveis de proteínas, além de apresentar vantagens em relação a outros sistemas. Neste trabalho foi proposta a expressão do gene L1 de HPV-16 em células da levedura *P. pastoris*, como base de uma estratégia vacinal para o controle do câncer de colo de útero. O gene L1 de HPV-16 foi clonado em vetor de expressão pPICZA e a construção pPICZL1H16 foi integrada no genoma de *Pichia*. A transcrição do gene L1 foi confirmada por meio de RT-PCR e a expressão da proteína, por imunodeteção em Dot Blot. A obtenção dos clones de *P.pastoris* que expressam a proteína L1 de HPV-16, permitirá o desenvolvimento de mais uma estratégia vacinal baseada em VLPs.

Palavras-Chave: HPV, Papilomavírus Humano, *Pichia pastoris*, Sistema de expressão heteróloga, VLPs.

1. INTRODUÇÃO

O papilomavirus humano (HPV) é capaz de provocar infecção clínica ou subclínica em mulheres e homens após transmissão por via sexual. Várias evidências experimentais sustentam a estreita correlação entre a infecção com alguns tipos específicos de HPV e a etiologia do câncer anogenital, em especial o carcinoma cervical, para o qual o HPV-16 está presente em 50-60% dos casos. Há evidências de que a infecção pelo HPV tem aumentado nas últimas décadas, tornando hoje a papilomatose humana a doença sexualmente transmissível mais prevalente no mundo.

Abordagens preventivas consistem na melhor alternativa para o controle das infecções pelo papilomavírus. Diversas estratégias vacinais contra o HPV foram e são investigadas por grupos de pesquisa em todo mundo e os resultados mais promissores no desenvolvimento de vacinas profiláticas empregam partículas protéicas desprovidas do genoma viral, as VLPs (“Virus-Like Particles”). Recentemente, foi aprovada uma vacina quadrivalente baseada em VLPs que inclui 4 tipos virais (HPV-16, 18, 6 e 11). A vacina foi produzida pela Merck, mas o custo das doses ainda é bastante elevado e não inclui os tipos 31 e 33, mais prevalentes nas regiões Nordeste e Central do Brasil.

A produção de VLPs é complexa e depende de sistema de expressão baseado no cultivo de células modificadas geneticamente para expressão de genes do capsídio viral (L1 ou L1/L2) e posteriores processos de purificação.

Nos últimos anos, a levedura metilotrófica *Pichia pastoris* emergiu como um sistema heterólogo eficiente e de baixo custo para a produção de altos níveis de proteínas heterólogas. Este sistema combina as vantagens da expressão em células de mamíferos com as de células procariotas, tais como a capacidade de realizar as modificações pós-trasducionais e de obter níveis elevados de expressão da proteína recombinante, respectivamente.

No Brasil, a escassez de laboratórios capacitados para a produção e avaliação de VLPs de papilomavírus humano representa o principal fator limitante na geração de competência para a produção de vacinas contra esse patógeno. Neste projeto propomos o estabelecimento do sistema de expressão em células da levedura *Pichia pastoris* para a produção da proteína L1 de HPV-16, o tipo viral predominante em tumores de colo de útero.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Papilomavírus humano (*Human PapillomaVirus* - HPV)

Os papilomavírus, são pequenos vírus da família *Papillomaviridae* (de Villiers *et al*, 2004), compostos por um capsídio não-envelopado e icosaédrico (figura 1) que abriga um genoma de DNA circular, dupla fita com cerca de 8Kb (Scheurer *et al*, 2005; zur Hausen, 1991).

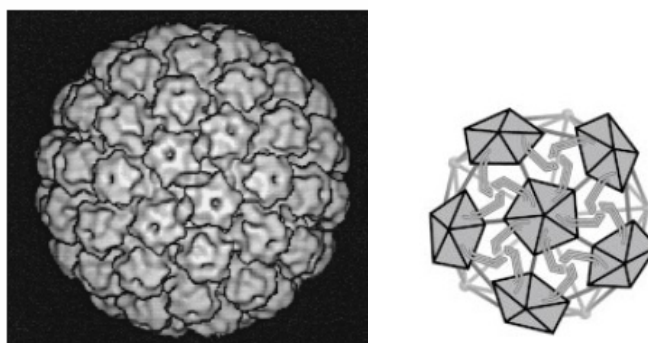


Figura 1. Morfologia do papilomavírus. Capsídio não envelopado e icosaédrico (Xu *et al*, 2006; Modis *et al*, 2002)

Os papilomavírus são espécie-específicos e infectam mamíferos, répteis e pássaros (Doorbar, 2005; Scheurer *et al*, 2005). Os tipos que atacam os homens são denominados abreviadamente por HPV (*Human Papillomavirus*), mas também são bem conhecidos os que atacam bovinos - BPV (*Bovine Papillomavirus*), coelhos – CRPV (*Cottontail Rabbit Papillomavirus*) e cães - COPV (*Cannine Oral Papillomavirus*). Outros animais que podem ser infectados são os veados, os cavalos, os hamsters e os macacos (Ozbun, 2002; Ferreira *et al*, 2002).

Este tipo de vírus infecta as células mucosas ou cutâneas, no tecido epitelial, através de microlesões ou microabrasões, sendo o contato sexual a principal forma de transmissão do HPV (Souto *et al*, 2005). A sua infecção provoca a formação de lesões, papilomas ou verrugas (figura 2), em geral benignas, que podem regredir naturalmente ou se transformar em tumores malignos (Clifford *et al*, 2003; Stanley, 2001).

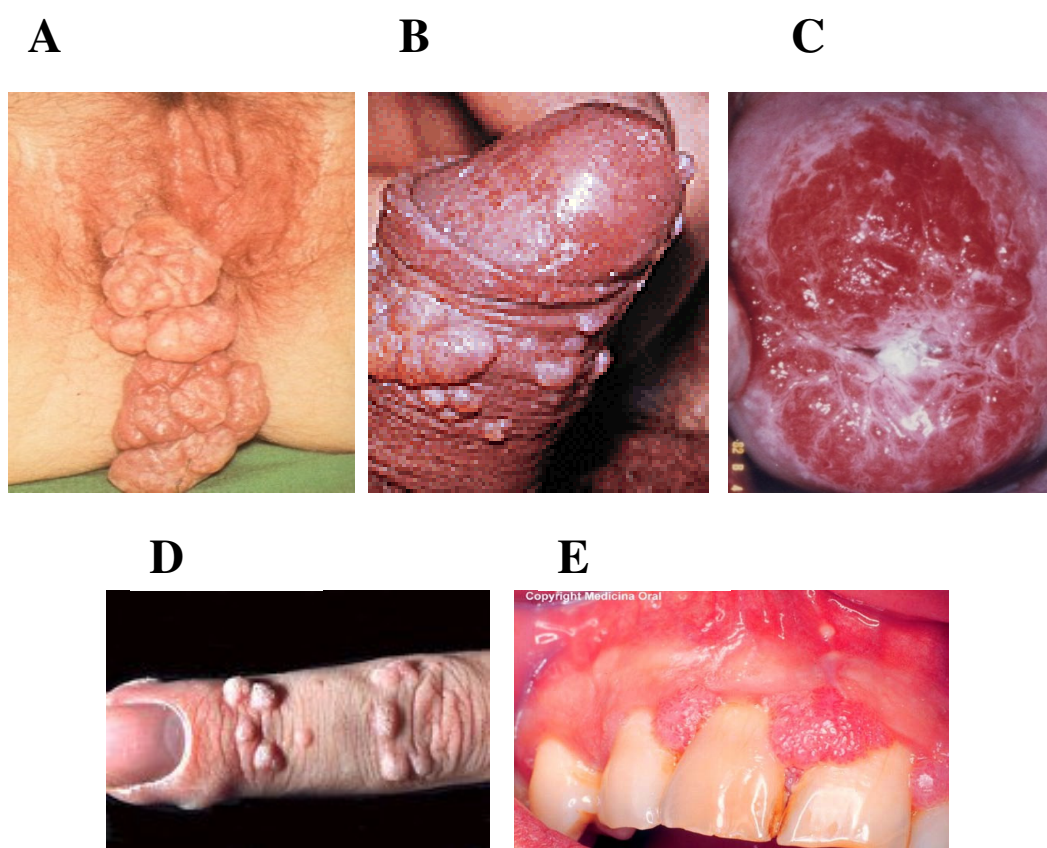


Figura 2. Lesões clínicas provocadas por HPV. (A) Papilomas no trato genital feminino (Pérez-Lopes, 2003); (B) Papilomas na região peniana (Pérez-Lopes, 2003); (C) Colo do útero com lesão (Saloney, 2007); (D) Verrugas cutâneas (FSC, 2007); (E) Papilomas na mucosa oral (Sebastián, 2006).

Atualmente mais de 100 tipos de HPV foram descritos (Bernard, 2005), além de subtipos e variantes, com base nas diferenças entre as seqüências de nucleotídeos dos genótipos (Myers *et al*, 1996). No entanto, os HPVs também podem ser classificados quanto ao tipo de tecido que infectam em cutâneotrópicos e mucosotrópicos (Silva *et al*, 2003; Scheurer *et al*, 2005) e de acordo com o grau da lesão induzida, sendo assim considerados de alto, médio ou baixo risco (Stanley, 2001).

Os tipos de HPVs podem ser organizados em gêneros e espécies de acordo com as suas propriedades biológicas e patológicas. Os principais gêneros são: Alfa-papilomavírus (mucosotrópicos, genitais, de alto e baixo risco), Beta-papilomavírus (cutâneotrópicos de alto e baixo risco), Gama-papilomavírus (cutaneotrópicos e de baixo risco), etc (Bernard, 2005).

Os tipos virais 16, 18, 31, 33, 45 e 46 são HPVs de alto risco, por serem comumente detectados no carcinoma cervical, sendo que, o HPV-16 é responsável por 50 a 60% dos casos diagnosticados (Motoyama *et al*, 2004). No Brasil, o HPV-16 é o mais prevalente (Cavalcanti *et al*, 1994; Eluf-Neto *et al*, 1994, Bosch *et al*, 1992; Noronha *et al*, 1999; Lorenzato *et al*, 2000), sendo o HPV-18 o segundo mais prevalente nas cidades de Belém (Noronha *et al*, 1999); São Paulo (Eluf-Neto *et al*, 1994) e Porto Alegre (Bosch *et al*, 1995); e é o terceiro em Recife (Lorenzato *et al*, 2000) e Goiânia (Rabelo-Santos *et al*, 2003). O segundo tipo de HPV mais prevalente no Nordeste (Recife) é o 31 (Lorenzato *et al*, 2000) e na região central (Goiânia) é o 33 (Rabelo-Santos *et al*, 2003).

A associação do HPV com alguns tipos de neoplasias foi detectada, primeiramente, em cânceres do trato anogenital, incluindo cérvix, vulva, vagina, pênis e ânus. Além destes, estão também associados ao HPV, alguns tipos de cânceres de cabeça, pescoço (Syrjanen, 2005) e pele (Sterling, 2005). O câncer cervical ou de colo de útero, associado à transmissão sexual do HPV, é considerado o segundo câncer mais freqüente em mulheres no mundo todo e por isso mais abordado para o desenvolvimento de vacinas (Favre *et al*, 1997).

2.2. Biologia molecular do HPV

O genoma do papilomavírus é composto por 8 ORFs (*Open Reading Frames*) possuindo 6 genes que se expressam precocemente e dois genes que se expressam tardiamente, denominados E (*Early*) e L (*Late*) respectivamente. Ele pode ser dividido em três partes: a longa região de controle (LCR–*long control region* ou URR–*upstream regulatory region*) que corresponde a 7-11% do tamanho; a região E, abrangendo 50% do genoma, que codifica proteínas envolvidas com a transformação celular (E6, E7, E5), com a maturação viral e alteração da matriz intracelular (E4) ou com a replicação e transcrição do genoma viral (E1 e E2); e a região L (figura 3) que codifica as duas proteínas capsidiais L1 e L2 (Favre *et al*, 1997).

A região reguladora LCR ou URR, apresenta seqüências ativadoras e repressoras da transcrição viral, além da origem de replicação, variando de 400 a 1000 pbs, localizadas entre as regiões L1 e E6 (Kisseljov, 2000; Burd, 2003; Silva et al, 2003).

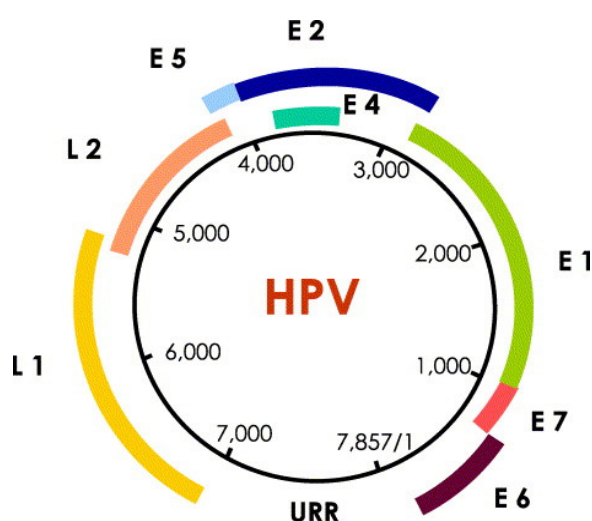


Figura 3. Genoma do HPV. DNA circular de aproximadamente 8kb, mostrando o arranjo dos genes não estruturais (E) e estruturais (L), e a região de regulação (URR) (Muñoz *et al*, 2006).

As ORFs E1, E2, L1 e L2 são particularmente bem conservadas entre os membros da família (de Villiers, 2004). Atualmente considera-se um novo tipo de HPV quando as seqüências de nucleotídeos dos genes L1, E6 e E7 (aproximadamente 30% do genoma viral) diferirem em mais de 10% dos tipos conhecidos. Se esse percentual for menor que 2%, então, o novo vírus isolado é designado como uma variante do mesmo tipo. Os subtipos virais correspondem a genomas cuja seqüência nucleotídica nessas regiões gênicas diferem entre 2% e 10% dos tipos já descritos (Burd, 2003; Berkhout *et al*, 2000).

2.3. Ciclo de infecção do HPV

O ciclo do papilomavírus é bastante complexo, pois depende da diferenciação completa das células epiteliais (Stanley, 2001), o que dificulta a montagem de um sistema de propagação em laboratório que permita a produção de vírions para fins vacinais (Da Silva *et al.*, 2001).

O processo infeccioso inicial ocorre na camada basal de queratinócitos do epitélio através de microabrasão ou outros traumas e isto pode resultar numa infecção clínica ou subclínica. No primeiro estágio do ciclo viral, o genoma do HPV é estabilizado na forma de elemento extracromossômico (epissomo) na célula basal epitelial, o qual é replicado para um número de 50 a 100 cópias aproximadamente junto com o DNA do hospedeiro, na fase S. Os primeiros genes a serem expressos são E1 (helicase) e E2 que formam um complexo para se ligar à origem de replicação do genoma viral e recrutar a maquinaria da célula necessária, como polimerase e proteínas acessórias (Mohr *et al*, 1990; Frattini *et al*, 1994; Conger *et al*, 1999). Além disso, a proteína E2 funciona como um fator de transcrição que ativa ou reprime a transcrição dos outros genes E (McBride *et al*, 1991). As proteínas E5, E6, e E7 participam da transformação celular pela indução da proliferação basal e parabasal das células, levando a

hiperplasia epitelial com papilomatoses de várias extensões (Stoler *et al*, 1989; Haller *et al*, 1995).

O segundo estágio do ciclo corresponde a um alto nível de expressão de proteínas virais não-estruturais (E4) e estruturais (L1 e L2) para a montagem dos vírions e sua liberação. A proteína E4 facilita a liberação dos vírions através do rompimento do citoesqueleto citoplasmático (Doorbar *et al*, 1991). Nesta fase, ocorre a migração de uma das células infectadas para as camadas mais superiores (sentido apical) do epitélio com a finalidade de acompanhar o programa de diferenciação dos queratinócitos (figura 4); enquanto isso, a célula-filha infectada que permaneceu na camada basal se multiplica e mantém um verdadeiro reservatório de DNA viral (McCance, 2005).

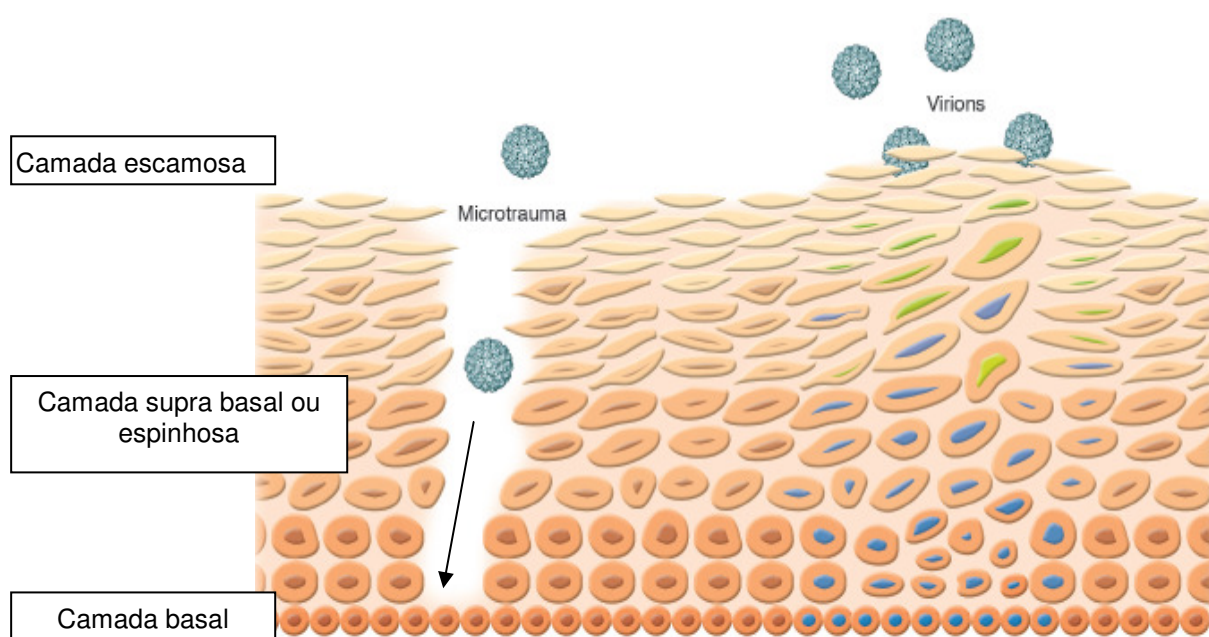


Figura 4. Ciclo de infecção do HPV. Entrada do vírus no tecido epitelial através de microtrauma e estabelecimento da infecção na camada basal (células com núcleo azul). As células de núcleo verde indicam a expressão das proteínas L1 e L2 para montagem dos vírions que são liberados posteriormente (adaptado de Lowy and Schiller, 2006).

Duas moléculas da família das integrinas, $\alpha 6\beta 1$ e $\alpha 6\beta 4$, expressas nas superfícies das células basais, foram identificadas como receptoras do HPV (Evander *et al*, 1997). Existem controvérsias em relação à natureza do receptor de superfície celular que permite o contato inicial do vírus com a célula, embora a maioria dos estudos sugiram uma dependência na presença do receptor de sulfato de heparina (Giroglou *et al*, 2001; Joyce *et al*, 1999). Um recente trabalho sugeriu que a internalização dos vírus é um processo lento com uma meia-vida aproximada de horas e que ocorre através da endocitose de vesículas revestidas de clatrina (Culp and Christensen, 2004; Day *et al*, 2003).

O tempo de infecção até a liberação das partículas virais é de aproximadamente 3 semanas e corresponde ao tempo necessário para a diferenciação completa e descamação do queratinócito basal (Stanley, 2005). O tempo entre a infecção inicial e o aparecimento de papilomas pode depender da concentração e do tipo do vírus que infecta o tecido, também é sugerido que o estado de latência pode resultar da baixa concentração de vírus inoculado (Zhang *et al*, 1999; Campo, 1995).

2.4. HPV e Transformação Celular

Os genes E6 e E7 são considerados os principais oncogenes dos papilomavírus humanos de alto risco porque detêm funções já esclarecidas que contribuem para o processo carcinogênico, através da interação com proteínas supressoras de tumor (Howley, 1996; Farthing and Vousden, 1994; Münger, 1995). Elas também têm um papel importante na manutenção do epissomo viral, durante a infecção produtiva (Thomas *et al*, 1999). Além de E6 e E7, a proteína E5 possui atividade de transformação e proliferação celular, interagindo com algumas proteínas transmembrana, tais como, o receptor do fator de crescimento epidermal – EGFR- *Epidermal Growth Factor Receptor* (Genther *et al*, 2005), e o fator estimulante de colônia – CSF- *Colony Stimulating Factor* (Kim and Yang, 2006).

Nos últimos 20 anos, as proteínas E6 e E7 foram o foco de muitos estudos na carcinogênese cervical, por apresentarem propriedades oncogênicas. Durante este período, surgiram dois modelos de interação com proteínas supressoras de tumor, onde E6 se liga à proteína p53 e E7 se liga à proteína pRB, inativando e degradando tais supressores (Storey *et al*, 1988; Werness *et al*, 1990). Esta descoberta não foi tão surpreendente pelo fato de que outros vírus oncogênicos também atingem essas mesmas proteínas (Butel, 2000; Zur hausen, 1998), no entanto, foi uma contribuição para explicar como os HPVs de alto risco induzem a neoplasia das células cervicais (Howley *et al*, 1991).

A proteína p53 tem como função ativar genes de mecanismo de reparo do DNA ou sinalizar para a apoptose após identificar danos no mesmo, provenientes de diferentes tipos de stress, como a exposição à UV (Silva *et al*, 2003). Quando presente na célula, a proteína viral E6 recruta a proteína celular E6AP (ubiquitina-ligase), para ubiquitinação e degradação de p53 (Stubenrauch and Laimins, 1999). Sem a proteína p53 a célula perde a capacidade de reparar possíveis danos no seu material genético (figura 5) e há um aumento na frequência de rearranjos, mutações e aneuploidias, que acumulados propiciam o desenvolvimento de uma neoplasia ou câncer (Vousden, 1993).

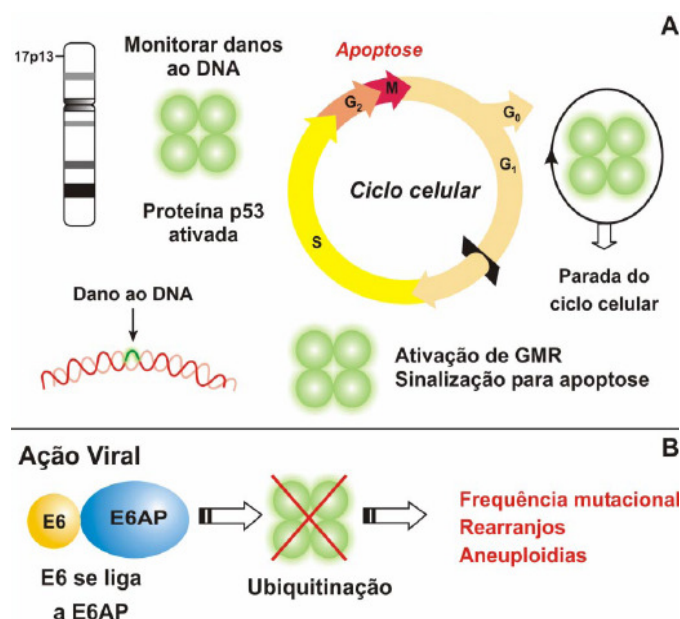


Figura 5. Esquema da interferência de E6 no ciclo celular. (A) atuação de p53 na célula, após ocorrência de dano no DNA. Há parada no ciclo celular e ativação de genes de mecanismo de reparo (GMR) ou sinalização para apoptose. (B) Complexo E6AP-E6 que resulta na ubiquitinação ou degradação de p53 e conseqüente acúmulo de mutações (Silva *et al*, 2003).

As proteínas da família pRb inibem a progressão do ciclo celular pela interação com o fator de transcrição E2F, que ativa genes necessários para a replicação, na fase S (Silva *et al*, 2003). A associação de E7 com a pRb, permite que E2F atue livremente na ativação dos genes de replicação (figura 6), o que levaria à progressão do ciclo celular ou um estímulo contínuo para a proliferação das células infectadas (Sandal, 2002).

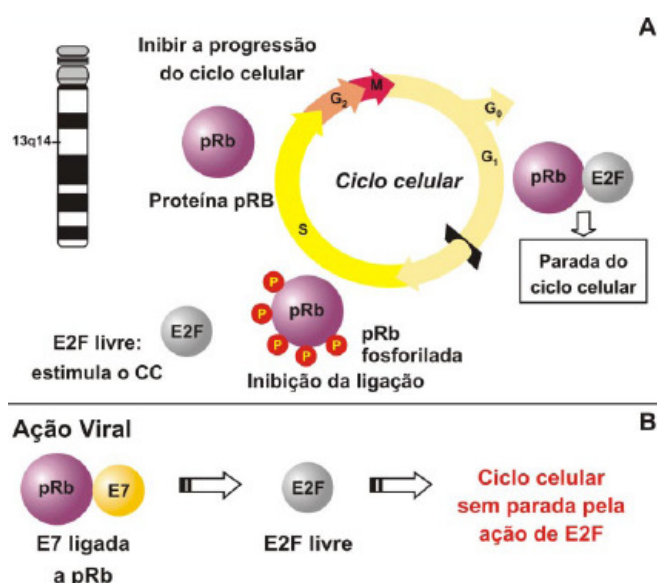


Figura 6. Esquema da interferência de E7 no ciclo celular. (A) Associação de pRb com o fator E2F e conseqüente regulação por inibição do ciclo celular. (B) Complexo E7- pRb que resulta na liberação do fator E2F e proliferação exagerada das células (Silva *et al*, 2003).

Estes dois mecanismos que envolvem as proteínas E6 e E7 são apenas a base geral para a investigação e a compreensão de outros eventos implicados com estas mesmas proteínas para o desenvolvimento carcinogênico. A proteína E6 altera a transcrição de genes através da interação com a proteína p300 (regula transcrição via acetilação das histonas) e aumenta o tempo de vida celular, por estimular a atividade de telomerase (Slebos *et al*, 1995). Já a proteína E7, associa-se a outros supressores de tumor da família retinoblastoma-Rb (p107, p130), a ciclinas (envolvidas na progressão do ciclo celular) e às histonas desacetilases (HDAC - *Histone deacytelase*) que reprimem a transcrição de genes, como o Notch-1, relacionado com a diferenciação de células e ativamente expresso no carcinoma cervical (Southern *et al*, 2000; Tewari *et al*, 2000).

Em lesões cervicais de alto grau e câncer, o DNA episossomal do HPV apresenta-se integrado no cromossomo do hospedeiro. A integração do genoma viral ocorre devido à

clivagem na região dos genes E1/E2, com conseqüente perda destes (Motoyama et al, 2004). Pelo fato de E2 exercer um controle transcricional negativo sobre estas proteínas, este evento resulta na superexpressão dos genes E6 e E7, conduzindo a malignização das células ou formação do tumor (Bosch *et al*, 1992; Doorbar *et al*, 1991).

A proteína E5 de HPV-16 tem um papel importante na formação da neoplasia celular. Estudos mostram que ela tem capacidade de transformação por estar implicada na ativação constitutiva do EGFR, que por sua vez, ativa vias de transdução de sinal como, STAT (Coffer and Kruijer, 1995) e MAP (Lewis *et al.*, 1998) implicadas no crescimento, diferenciação e divisão celular. A ativação de fatores de transcrição da célula hospedeira, como AP-1 (*Activator Protein-1*) e NF-1 (*Nuclear factor-1*) também é um mecanismo inerente à E5. Estes fatores apresentam sítios de ligação para a região de regulação transcricional do DNA viral, aumentando a expressão de genes como E6 e E7 (Tsai and Chen, 2003). Há evidências de que E5 também regule negativamente a expressão do supressor de tumor p21, promovendo proliferação celular (Tsao *et al*, 1996).

No câncer cervical, em alguns casos, observa-se que o gene E5 é deletado, indicando que ele não deve ser essencial para a manutenção da neoplasia maligna nas células infectadas. No entanto, a sua participação na transformação celular ocorre nos estágios iniciais da doença (DiMaio and Mattoon, 2001).

2.5. HPV x Câncer cervical

O câncer cervical é a segunda maior causa de morte entre as mulheres no mundo. Aproximadamente 450.000 casos deste tipo de câncer são diagnosticados a cada ano, com uma taxa de mortalidade de 50% (Parkin, 2006; Lowndes, 2006).

Este tipo de câncer é atribuído à infecção persistente por HPVs que estão classificados como de alto risco; e é o primeiro câncer 100% associado à uma infecção, segundo a

Organização Mundial de Saúde - *World Health Organization – WHO* (Bosch *et al*, 2002). Mais de 80% dos casos deste tipo de câncer ocorrem nos países em desenvolvimento, onde, tanto o diagnóstico preventivo quanto o tratamento da doença são precários (Frazer *et al*, 2004).

A relação entre o surgimento do câncer cervical e a infecção por certos tipos de HPV ficou evidente a partir de estudos epidemiológicos e funcionais (zur Hausen, 2002; Bosh and de Sanjose, 2003), onde o HPV foi detectado em mais de 99,7% do carcinoma de células escamosas (Walboomers *et al*, 1999, Munoz *et al*, 2003) e em 94-100% do carcinoma cervical adeno e adenoescamoso (van Muyden *et al* 1999; Zielinski *et al*, 2003). Por outro lado, o câncer vaginal, peniano e vulvar são muito raros, com taxas de incidência de 1% por ano. Este dado sugere que o risco de progressão da infecção é sítio dependente, ou seja, uma possível explicação para a alta incidência de câncer cervical seria a presença de uma zona de transformação no cérvix, considerada mais suscetível à transformação por HPV (Steenbergen *et al*, 2005).

O câncer cervical evolui de uma lesão não-invasiva, pré-maligna, denominada de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) ou *cervical intraepithelial neoplasia (CIN)*, ainda denominada de *Squamous Intraepithelial lesion (SIL)* ou lesão intraepitelial escamosa (figura 7). As lesões pré-malignas são classificadas histologicamente, com base no aspecto morfológico atípico e progressivo das células epiteliais, em: NIC I – displasia média; NIC II – displasia moderada e NIC III – displasia severa e câncer invasivo (carcinoma *in situ*). A NIC I também pode ser considerada como *SIL* de baixo grau (*Low Grade SIL –LSIL*) e as NIC II/III como *SIL* de alto grau (*High Grade SIL- HSIL*) (Steenbergen *et al*, 2005).

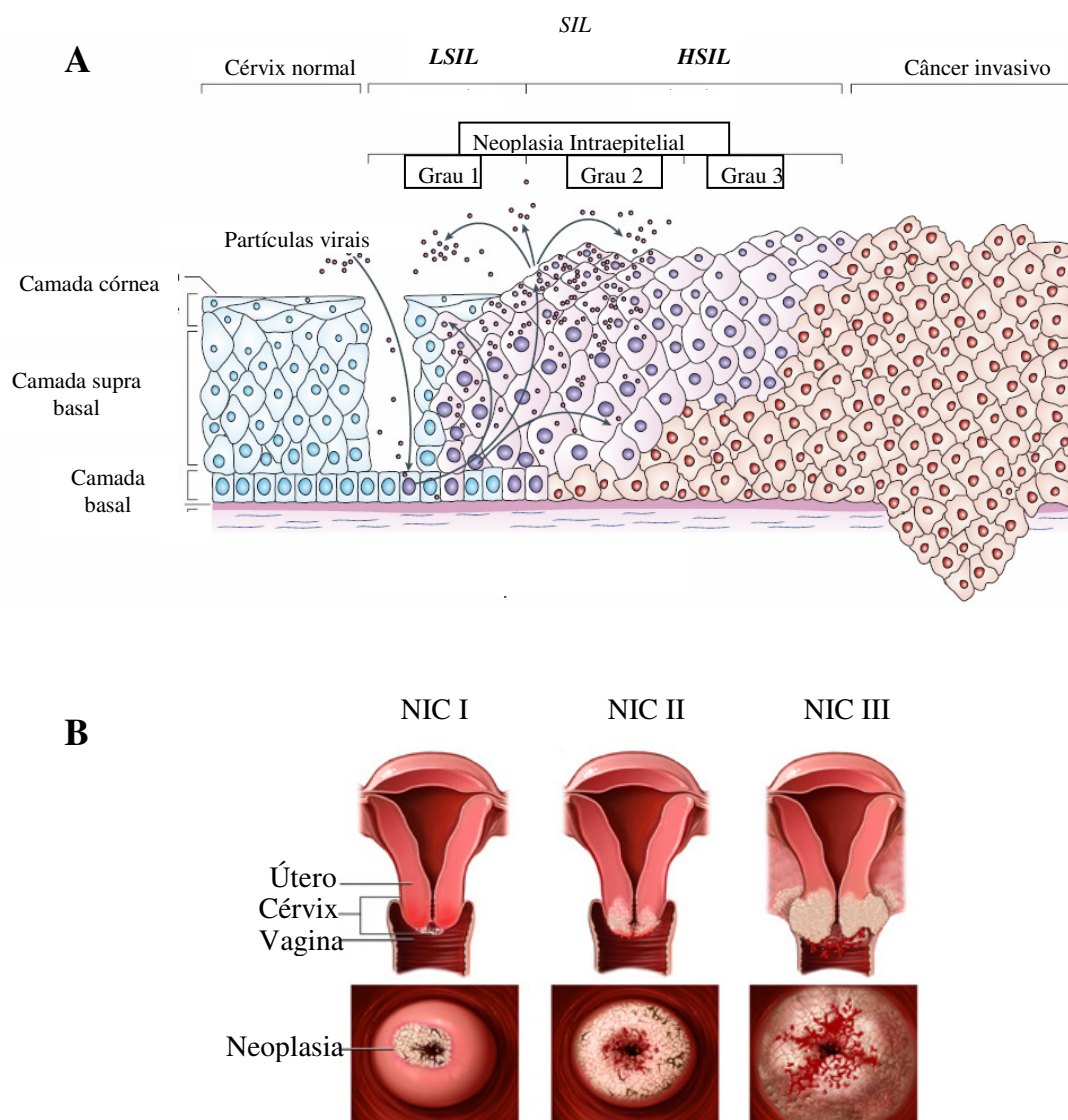


Figura 7: Evolução da lesão cervical pré-maligna ao câncer invasivo (A) Expansão da infecção no tecido epitelial cervical (adaptado de Woodman *et al*, 2007).; (B) Esquema do colo uterino com neoplasia intraepitelial cervical (adaptado de NMA, 2007).

A infecção com HPV-16 é responsável por aproximadamente 60% dos casos de câncer cervical no mundo. A incidência global de câncer cervical, é também estabelecida por outros tipos de HPVs como o 18, que abrange 10% dos casos, os tipos 45 e 31 com uma contribuição de 4% cada, e os tipos 33, 52 e 58 com 2%, cada um (Cuzick *et al*, 2006; IARC, 2005). Juntos o HPV-16 e o HPV-18 representam 25% das lesões cervicais de baixo grau (*LSIL*) e 50 a 60%

dos lesões de alto grau (*HSIL*). O HPV 6 e 11 (tipos de baixo risco) são responsáveis por 10% das *LSIL* e aproximadamente 90% das verrugas genitais (Bosch and Harper, 2006).

A infecção pelo HPV e conseqüentemente a sua progressão, podem ser prevenidas através de exames rotineiros, clínicos e citopatológicos que detectam lesões precursoras pela observação de alterações celulares, contudo, este exame tradicional, estabelecido por George Papanicolau na década de 40, apresenta algumas limitações relacionadas à interpretação das alterações morfológicas e à coleta das amostras examinadas; ambas devem ser boas o bastante para evitar resultados falsos-negativos (Lonky *et al*, 1999). Todavia, países desenvolvidos, onde a maior parte da população tem acesso à saúde e onde há programas bem estabelecidos de prevenção, conseguiram diminuir a incidência do câncer cervical em 3/4 nos últimos 50 anos (Franco and Harper, 2005). Nos países em desenvolvimento, muitas das vezes, a instauração e manutenção de programas de prevenção, assim como o acesso a tratamentos eficientes, não existem e conseqüentemente mais de 80% dos cânceres cervicais são atribuídos a essas regiões (Frazer, 2004).

Apesar da frequência de infecções, em muitos casos o organismo consegue combatê-las espontaneamente, ocasionando alterações citológicas ou histológicas cervicais menores e transitórias, ou subclínicas (Munoz, 2000; Bosh *et al*, 2002). No entanto, em alguns casos de infecção por HPVs carcinogênicos, as lesões não regredem e podem persistir por longos períodos, causando lesões cervicais pré-cancerígenas e até um câncer invasivo que pode ser diagnosticado décadas após a infecção. O longo período entre a infecção e o aparecimento do carcinoma cervical, explica porque este tipo de câncer é pouco comum em mulheres abaixo de 25 anos com incidência progressiva entre os 40 e 50 anos de idade (Snijders *et al*, 2006).

A persistência de HPVs de alto risco é o maior fator para o desenvolvimento de lesões malignas (zur Hausen, 1996), embora seja sugerida a influência de alguns fatores de risco adicionais para a susceptibilidade aos cânceres anogenitais como: uso de anti-concepcional

oral (Brinton, 1991), uso de cigarro (Deacon *et al*, 2000; Prokopczyk *et al*, 1997), debilidade do sistema imunológico, fatores nutricionais, co-infecção por outros agentes infecciosos, sexualmente transmitidos (Ziegler *et al*, 1990) e polimorfismos genéticos do indivíduo (Madkan *et al*, 2007). A promiscuidade e precocidade sexual, assim como o nível sócio-econômico do indivíduo são fatores que facilitam a infecção pelo vírus (Castellsague *et al*, 2002).

2.6. Resposta imune ao HPV

A proteção imunológica de um organismo corresponde à interação entre dois mecanismos de resposta imune: inato e adaptativo (Roßlinghoff, 1997). A imunidade inata é uma resposta rápida e inespecífica (relacionada à ação de fagócitos, proteínas solúveis, barreiras físico-químicas) envolvida nas fases iniciais da infecção provocada por patógenos e toxinas. Diferentemente, uma resposta adaptativa é mais lenta e específica sendo capaz de promover uma memória imunológica (células T efectoras e células B produtoras de anticorpos, ambas específicas para o patógeno), proporcionando proteção a uma nova infecção (Hilleman, 2000).

Na fase inicial ou resposta inata das infecções virais, a resposta inata do hospedeiro é feita pelos interferons tipo I (IFN- α e IFN- β), macrófagos e células NK - *Natural Killer* ou citotóxica natural (Chadha *et al*, 2004). Os interferons tipo I são produzidos pelas células infectadas por vírus e têm como função proteger as células não infectadas e colaborar com a resposta imune adaptativa. O IFN- γ também atua contra as infecções virais ativando macrófagos e células NK (células citotóxicas naturais) para destruição do vírus e das células infectadas, respectivamente (Machado *et al*, 2004).

A imunidade adaptativa contra os antígenos virais ocorre com ativação de células TCD8+ que vão exercer citotoxicidade ou lisar as células infectadas pelo reconhecimento de

antígenos virais processados e combinados a um complexo na superfície das células-alvo, denominado MHC classe I (*Major Histocompatibility Complex class I*). Durante a resposta imune adaptativa há também ativação das células TCD4+, que vão colaborar com as células B na produção de anticorpos. Em virtude dos múltiplos mecanismos de defesa contra os vírus, grande parte das infecções é assintomática ou tem uma apresentação subclínica com manifestações inespecíficas como a febre, porém, várias infecções progridem (Machado *et al*, 2004).

A resposta imune contra o HPV é caracterizada pela imunidade celular local (*cell-mediated immunity* - CMI) e pela produção de anticorpos neutralizantes que estão associadas com a regressão da lesão e a proteção contra o mesmo tipo de HPV, respectivamente (Shiller and Hidesheim, 2000).

Os indícios à natureza da resposta imune celular contra a infecção pelo HPV vieram dos estudos imuno-histológicos de verrugas genitais que regrediram espontaneamente, nas quais foi detectado um grande infiltrado de células T (CD4+ e CD8+) e macrófagos, tanto no estroma, como no epitélio (Stanley, 2005). Há evidências de que as células TCD4+ associadas à eliminação do HPV são específicas para a proteína E2 (Lee *et al*, 2004). Em pacientes com grandes lesões ou com tumor cervical são encontradas células CD8+ específicas para E6 (Welters *et al*, 2003) e E7 (Kadish *et al*, 2002).

A incidência e a progressão das infecções por HPV em indivíduos imunossuprimidos, demonstram o crítico papel da resposta imune celular na resolução e controle da infecção (Benton & Arends, 1996). Os pacientes infectados por HIV geralmente apresentam múltiplas recorrências de infecções por HPV (Fruchter *et al*, 1996) e um aumento no risco para progressão de uma infecção subclínica para clínica (Chirgwin *et al*, 1995).

Os níveis de anticorpos neutralizantes produzidos naturalmente numa infecção por HPV, são muito baixos (Villa *et al*, 2005), mesmo assim, a soropositividade do indivíduo

imunocompetente o protege contra uma nova infecção pelo mesmo tipo de vírus (Stanley, 2006; Kadish *et al*, 2002). O tempo necessário para o sistema imune combater a infecção pelo papilomavírus varia, mas considera-se que é preciso cerca de 8-14 meses para que HPVs de alto risco sejam eliminados e 5-6 meses para HPVs de baixo risco (Franco *et al*, 1999; Giuliano *et al*, 2002; Brown *et al*, 2005).

Os papilomavírus humanos adotaram vários mecanismos que impedem uma resposta eficiente do sistema imunológico e o primeiro destes é o seu próprio tipo de ciclo que não provoca lise celular (não lítico), ou seja, a liberação do vírus ocorre com a morte programada dos queratinócitos (descamação). Deste modo, os sinais essenciais para a resposta imune no epitélio, como a produção de citocinas pró-inflamatórias que ativam a migração das células apresentadoras de antígenos (APCs), são ausentes (Kupper & Fuhlbrigge, 2004; Stanley, 2006). Além de ser praticamente invisível ao hospedeiro, o HPV pode expressar suas proteínas E em baixos níveis, impedindo uma resposta imunológica eficiente (Greenfield *et al*, 1991; Stoler *et al*, 1992).

A infecção por HPV é exclusivamente intraepitelial e, teoricamente, deveria ser detectada pelas APCs do epitélio, denominadas de Células de *Langerhan* (CL). A CL tem como função fagocitar, processar e apresentar (via MHC) o antígeno que está no epitélio às células T nativas que se encontram nos nódulos linfáticos (figura 8), para que estas se diferenciem e se tornem efectoras na destruição dos queratinócitos infectados (Stanley, 2005). No entanto, os locais infectados por HPV apresentam um número de CL significativamente reduzido (Lehtinen *et al*, 1993; Connor *et al*, 1999). Estudos mostram que a proteína E6 do HPV-16 regula de forma negativa uma molécula de adesão (E-caderina) necessária para o contato entre o queratinócito e a CL (Mathews *et al*, 2003), e que esta última, em lesões cervicais pré-malignas ou malignas, não expressa as suas próprias moléculas de adesão (Mota *et al*, 1999; 126). A redução no número das CL e conseqüentemente, a alteração na resposta

celular é mais um dos mecanismos utilizados pelo vírus para seu escape do sistema imune (Kanodia *et al*, 2007).

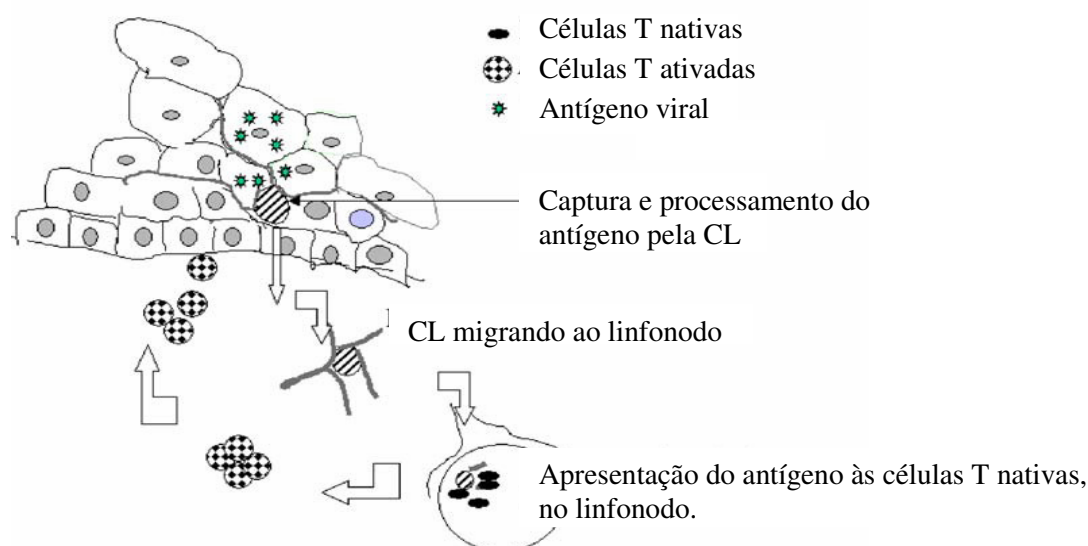


Figura 8. Apresentação de antígeno pelas Células de Langerhan. A célula de Langerhan processa o antígeno e migra para o linfonodo (ativada pela ligação com citocinas pró-inflamatórias) com a finalidade de apresentá-lo às células T nativas, que se diferenciam e seguem ao local da infecção. Na infecção por HPV há inibição da função da CL pela ausência de inflamação (adaptado de Stanley, 2005).

Mesmo na ausência de citólise induzida pelo vírus, os queratinócitos infectados devem ativar o sistema de defesa anti-viral, o interferon tipo I. Os interferons tipo I (IFN- α e IFN- β), têm propriedades anti-viral, anti-proliferativas, e imunoestimulatórias, agindo como uma ponte entre a imunidade inata e adaptativa, ativando neutrófilos, macrófagos, células NK e dendríticas (Le Bon & Tough, 2002; Theofilopoulos *et al*, 2005). A maioria dos vírus desenvolveu mecanismos para inibir a síntese de IFN, e os papilomavírus não são uma exceção. A ligação do IFN tipo I ao seu receptor estimula uma via de transdução de sinal pela

formação de um complexo de transcrição (*IFN-stimulated gene factor (ISGF)-3 transcription complex*) que se liga a outros elementos no núcleo para iniciar a expressão de genes relacionados (Stark and Kerr, 1992). Sabe-se que a proteína E7 de HPV-16 inibe a atividade do IFN- α (Barnard *et al*, 2000) pela perda do complexo (ISGF)-3 (Barnard and McMillan, 1999) e que ainda, inibe a ativação do promotor IFN- β pela interação com o fator IRF-1 - *IFN Regulatory Factor 1* (Park *et al*, 2000). Pacientes com lesões malignas por HPV, que não respondem ao tratamento com o IFN- α , apresentam altos níveis de RNAm da E7 se comparados aos que respondem bem (Arany *et al*, 1995; Chang & Laimins, 2000; Nees *et al*, 2001). A proteína E6 também diminui a expressão dos genes IFN- α e IFN- β , através da ação contra proteínas (Tyk2 e STAT-1) que participam da via de transdução de sinal do IFN (Li *et al*, 1999; Nees *et al*, 2001), e da ligação ao fator regulatório IRF-3 responsável pela expressão do gene IFN- β (Ronco *et al*, 1998).

A interferência do HPV na atividade e expressão do MHC classe I (*Major Histocompatibility Class I*) é um assunto bem explorado por pesquisadores. Estudos recentes mostram que a proteína E7 dos HPVs oncogênicos (16 e 18) é capaz de reprimir a expressão deste complexo, assim como a expressão de proteínas (TAP-1 e LMP-2) implicadas no transporte do complexo MHC-I/peptídeo à superfície da célula (Georgopoulos *et al*, 2000). A proteína E5 é hidrofóbica e se localiza nas endomembranas do retículo endoplasmático, complexo de Golgi e membrana plasmática (Pennie *et al*, 1993). Por interações ainda desconhecidas, esta proteína viral, impede o transporte do MHC-I à superfície celular gerando um acúmulo deste no complexo de Golgi e contribuindo, desta forma, para a sobrevivência do vírus (Marchetti *et al*, 2002).

A similaridade de algumas seqüências da proteína viral E7 com as de proteínas humanas, como a XPGC (*xeroderma pigmentosum group G complementing protein*) e a RBP-1 (*retinoblastoma binding protein 1*), que evita ou dificulta o reconhecimento pelas células

de defesa; e a inibição da produção de mediadores imunes por E6 e E7, como citocinas (IL-18), quimiocinas, moléculas de adesão e proteases (Kanodia *et al*, 2007) são outros mecanismos de evasão do sistema imune pelo HPV (figura 9) que podem ser citados.

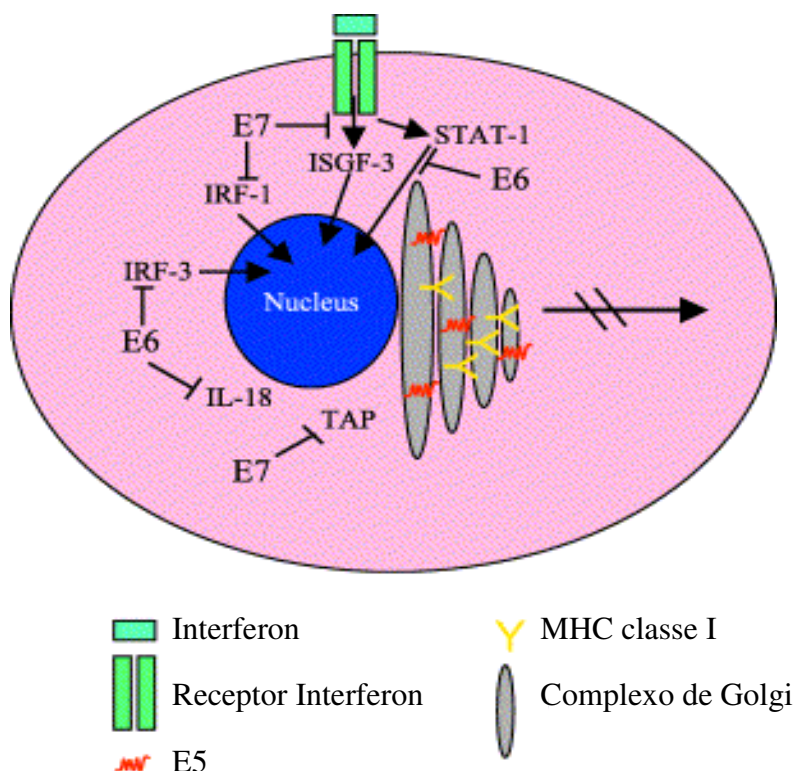


Figura 9. Esquema de mecanismos de evasão imune do HPV. Retenção do MHC classe I no complexo de Golgi por E5; via de transdução de sinal implicada na expressão de genes IFN, impedida por E6 e E7; inibição da interleucina IL-18 e da proteína TAP-1 por E6 e E7, respectivamente (adaptado de O'Brien and Campo, 2002).

2.7. Vacina Profilática contra o HPV: VLP - *Virus-Like Particle*

Diversos estudos baseados em modelos animais mostraram que a imunidade humoral é um fator chave na prevenção da infecção por papilomavirus (Breitburd *et al.*, 1995;

Kirnbauer, 1996). A imunidade humoral contra o HPV é gerada em quase todos os indivíduos infectados e é direcionada contra os epítomos conformacionais da proteína L1 (Dillner, 1999).

A proteína L1 (com um peso molecular de 54-58 kDa) compõe 90% da estrutura capsidial e se organiza na forma de pentâmeros que estão associados a proteína L2 (figura 10), com peso molecular aparente de 68-76 kDa (Da Silva *et al.*, 2001). O capsídio contém 360 cópias da proteína L1 e provavelmente 12 cópias da proteína L2, organizados em 72 capsômeros icosaédricos (Modis *et al.*, 2002).

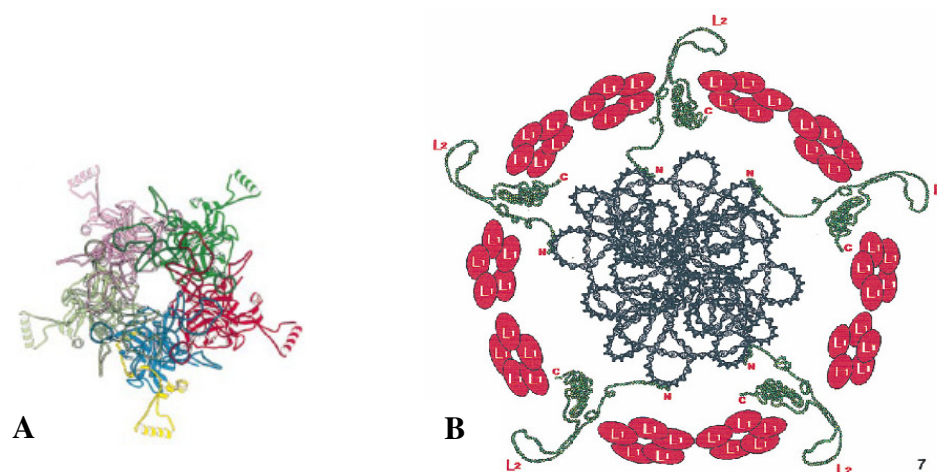


Figura 10. Estrutura das proteínas capsidiais do HPV. (A) pentâmero de L1 (adaptado de Chen *et al.*, 2000); (B) organização da estrutura viral, onde os pentâmeros de L1 (vermelho) se associam à proteína L2 (verde) que se liga ao DNA viral (cinza) (adaptado de Liu *et al.*, 1997).

A produção de anticorpos neutralizantes só é estimulada se a proteína L1 estiver na forma terciária ou nativa, montada como um multímero (Dillner, 1999; Stanley, 2006). A proteína capsidial pode ser produzida pela inserção do gene em vetores de expressão, como baculovírus recombinante para expressão em células de inseto, ou plasmídios para expressão em leveduras (Zhou *et al.*, 1991; Kirnbauer *et al.*, 1992). Quando produzidas em sistemas de

expressão eucarióticos, as proteínas L1 são capazes de se organizar como *virus-like particles* ou VLPs (figura 11), com morfologia similar aos vírions intactos (Kirnbauer *et al.*, 1992).

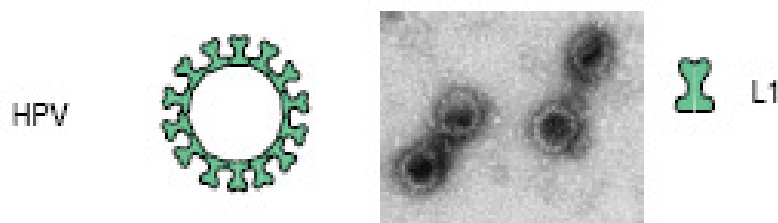


Figura 11. *Virus-like particle* de HPV. Morfologia capsidial e microscopia eletrônica das VLPs formadas pela proteína L1 (Noad & Roy, 2003).

As VLPs são indistinguíveis dos vírions nativos e preservam os epitopos conformacionais necessários à indução de anticorpos neutralizantes e também são capazes de promover resposta celular (Dupuy *et al.*, 1999; Palker *et al.*, 2001). Por não conterem o genoma viral, estas VLPs não são infecciosas ou oncogênicas e representam, portanto, a melhor estratégia para o desenvolvimento de vacinas profiláticas contra os papilomavírus (Da Silva *et al.*, 2001). A eficiência das VLPs na indução da resposta imune e prevenção da infecção por papilomavírus foi primeiramente testada em modelos animais, como cachorro - COPV (Suzich *et al.*, 1995) coelho-CRPV (Breitburd *et al.*, 1995), e bovino - BPV-4 (Kirnbauer *et al.*, 1996).

A imunidade humoral é específica para cada tipo de HPV, sendo assim, para uma proteção mais eficiente, a vacina deveria ser polivalente, ou seja, composta de VLPs de vários tipos de HPVs. Aproximadamente mais de 100 tipos de HPV já foram identificados, dos quais 40 infectam o trato genital, e destes, pelo menos 15 têm potencial oncogênico (Trottier and Franco, 2006). Duas estratégias vacinais para o HPV estão em estudo: vacinas profiláticas para prevenir a infecção primária, gerando anticorpos neutralizantes; e as vacinas terapêuticas

associadas à indução da imunidade celular através das oncoproteínas virais E5, E6 e E7, responsáveis pela neoplasia maligna. As vacinas profiláticas para o HPV são focadas no uso de VLPs específicas, formadas pela proteína capsidial L1 ou L1/L2 para indução de anticorpos neutralizantes (Berzofsky *et al*, 2004).

Nos últimos anos, foi realizada uma série de estudos profiláticos com as VLPs dos principais tipos associados ao câncer cervical (HPV-16 e HPV-18) e às verrugas genitais benignas (HPV-6 e HPV-11), nos quais a produção de anticorpos foi bastante satisfatória, atingindo níveis, cerca de 40 vezes maior que os observados nas infecções naturais (Harro *et al*, 2001; Evans *et al*, 2001; Villa *et al*, 2005). Recentemente, foi aprovada pela FDA (*Food and Drug administration*) uma vacina profilática (*Gardasil*) produzida pela *Merck* que inclui 4 tipos de HPVs mais prevalentes (HPV-16, 18, 6 e 11) e engloba a imunização de mulheres com idades entre 9-26 anos (US FDA, 2006). Existe outra vacina, produzida pela *GlaxoSmithKline*, denominada *Cervarix*, que está na última fase de testes e engloba VLPs de apenas dois tipos oncogênicos (16 e 18) do HPV (Roden and Wu, 2006).

Uma vacina para o HPV que combinasse a função profilática e terapêutica seria capaz de reduzir a incidência de câncer cervical num menor tempo que uma vacina apenas profilática, pois além de prevenir, poderia tratar infecções já estabelecidas (Davidson *et al*, 2002; Stanley, 2002). Todavia, é muito mais fácil desenvolver uma vacina profilática sem ação terapêutica (Katz, 1997; Hilleman, 1998).

Existe uma série de atributos que a vacina profilática deve possuir, como: baixo custo, tanto na produção quanto na compra; eficácia após uma única dose; longo tempo de proteção e polivalência para prevenir contra os principais tipos (Lowy and Frazer, 2003). O maior impacto da vacinação preventiva contra o HPV seria nos países subdesenvolvidos, onde a taxa de infecção e de câncer cervical é maior, e onde os programas de detecção e tratamento da

doença correspondem a 5% ou são inexistentes; contudo as vacinas devem ser economicamente acessíveis (Giles and Garland, 2006).

2.8. Sistemas Heterólogos de expressão

O avanço das técnicas de biologia molecular e de engenharia genética, contribuíram para o desenvolvimento de vacinas a partir da expressão de proteínas recombinantes em sistemas que utilizam, tanto organismos procariotos, quanto eucariotos (Schatzmayr, 2001; Morton and Potter, 2001).

A clonagem do gene que codifica o antígeno de interesse em outro organismo não-patogênico, capaz de expressar o imunógeno na sua forma nativa ou com um mínimo de alteração, é o princípio fundamental para produção de vacinas de subunidades (Rogan and Babiuk, 2005). O processamento pós-traducional da proteína (glicosilação, fosforilação) é, muitas vezes, essencial para sua ação terapêutica, portanto é necessária a escolha de um sistema de expressão heteróloga adequado a este tipo de produto (Shuler and Kargi, 2001). A escolha de um sistema de expressão apropriado inclui o conhecimento das propriedades bioquímicas e biológicas da proteína de interesse, a quantidade desejada ou necessária e a finalidade de uso da mesma (Geisse *et al*, 1996).

Os sistemas de expressão que utilizam células bacterianas (procariotos), têm como principal organismo a *Escherichia coli*, que é bem caracterizado geneticamente e pode atingir bons níveis de produção (cerca de 25% 50% ou mais das proteínas totais). Além disso, apresentam uma vantagem econômica por crescer em meios simples e baratos (Billman-Jacobe, 1996; Makrides, 1996). Apesar de muito utilizados, estes sistemas apresentam algumas dificuldades, tais como a ausência de modificações pós-traducionais (Brown, 2003; Pelczar *et al.*, 1996). O processo de purificação da proteína intracelular heteróloga requer

cuidado, pois a lise das células também libera endotoxinas ou pirógenos (presentes na membrana externa) que podem provocar reações indesejáveis. Além disso, quando a proteína atinge altos níveis dentro da célula bacteriana, pode sofrer degradação devido a um aumento da atividade proteolítica, assim como, ficar retida (na forma insolúvel e inativa) em “corpos de inclusão”, o que torna mais trabalhoso o processo de recuperação (Montor & Sogayar, 2003).

No caso de sistemas eucariotos, diversas linhagens de células de mamíferos, derivadas principalmente de tecidos humanos, de camundongos ou de hamsters, células de insetos ou de leveduras, vêm sendo utilizadas na síntese de várias proteínas recombinantes (Wurm and Bernard, 1999; Schatzmayr, 2001; Morton and Potter, 2001).

Nos sistemas de expressão baseados em células de mamíferos as proteínas são processadas corretamente e são indistinguíveis das versões não-recombinantes, no entanto, apresenta algumas desvantagens: crescimento lento em meios caros, baixo nível de expressão e processo de purificação complexo (Brown, 2003). A purificação é uma etapa importante que exige cuidado quando existe o uso de células transformadas ou tumorais, sendo necessária a total remoção de ácidos nucleicos e de qualquer substância que teoricamente poderia ser incorporada ao produto (Shuler and Kargi, 2001).

O uso de animais transgênicos é uma alternativa à cultura de células de mamíferos, pois a biologia do animal pode favorecer o processamento satisfatório da proteína. Os animais são engenheirados para produzir a proteína em fluidos específicos, como leite ou urina, mas existem muitas limitações nesta tecnologia, pois, em alguns casos, a proteína de interesse pode provocar efeitos adversos à saúde do animal, além de apresentar alto custo (\$100,000 para uma cabra e \$500,000 para uma vaca) e ineficiência para gerar e selecionar o animal que melhor produz a proteína (Shuler and Kargi, 2001).

O sistema que utiliza células de insetos é relativamente fácil de manter e com menor custo em comparação com as células de mamífero, além de oferecer um processamento pós traducional similar ao destes (McCarroll & King, 1997). O nível de produção obtido pode ser satisfatório (1 e 600 miligramas por litro de cultura), pois há a possibilidade de cultivar as células em suspensão, o que permite construir biorreatores com alta densidade celular, porém a manipulação e manutenção são mais complexas se comparadas às células de levedura e bactéria, que também são sistemas de cultivo mais baratos (Montor & Sogayar, 2003)

A produção em plantas transgênicas apresenta vantagem em relação à purificação do produto recombinante que pode ser facilitado pelo fato da proteína ficar retida em compartimentos estéreis ou comestíveis, o que, por sua vez, possibilita a idéia de administração oral de um produto terapêutico ou vacina, além disso, é um organismo que realiza modificações pós-traducionais (Mason and Arntzen, 1995). Todavia, este sistema tem desvantagens que ainda o fazem indesejável para uso comercial, desde os baixos níveis de expressão (1% do total das proteínas solúveis, é considerado bom), o longo tempo de testes e dificuldade no controle ambiental que pode variar a qualidade e quantidade de produção (Shuler and Kargi, 2001).

A expressão em células de leveduras permite um processamento similar à encontrada em células animais, quando comparadas à expressão utilizando procariotos, pois o ambiente intracelular da levedura é adequado para ocorrência de várias reações típicas de células de mamíferos, além de ser economicamente acessível (Brown, 2003; Torres & Moraes, 2002). Desta forma, este sistema contorna várias das dificuldades encontradas no sistema de expressão em células de mamíferos, mantendo muitas de suas vantagens (Schatzmayr, 2001).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é a mais utilizada e bem conhecida geneticamente, no entanto hiperglicosila as proteínas e não atinge altos níveis de expressão, se comparada a *Pichia pastoris* que é uma levedura que atinge gramas/litro de proteína e

apresenta um padrão de glicosilação mais simples e semelhante aos mamíferos (Sudbery, 1996). A glicosilação é uma modificação pós-traducional (ocorre no retículo endoplasmático e no aparelho de Golgi) em proteínas secretadas, que pode provocar uma imunogenicidade não desejável à proteína recombinante. Sendo assim, se a proteína for utilizada para um fim vacinal ou terapêutico é preferível a produção intracelular (Torres & Moraes, 2002). Fungos filamentosos como o *Aspergillus nidulans*, são também utilizados, como importante sistema de expressão para a produção comercial de enzimas, e geralmente, têm maior capacidade de secreção do que *S. cerevisiae*, apesar do seu crescimento filamentoso dificultar a produção em larga escala (Shuler and Kargi, 2001).

2.9. *Pichia Pastoris*: Sistema Heterólogo de expressão

Pichia pastoris é uma levedura homotática, haplóide que vêm sendo utilizada com bastante sucesso para a produção de uma grande variedade de proteínas recombinantes (Cereghino and Cregg, 2000). Mais de 400 proteínas já foram produzidas nesta levedura (Cereghino and Cregg, 2001), com um índice de produção que atinge de miligramas a gramas por litro, tanto para a pesquisa laboratorial quanto para a produção industrial. (Macauley-Patrick *et al*, 2005).

A levedura *Pichia pastoris* é um organismo metilotrófico, ou seja, é capaz de utilizar o metanol como única fonte de carbono ou energia. De todas as linhagens de levedura identificadas, são conhecidos apenas 4 gêneros que apresentam o metabolismo do metanol: *Hansenula*, *Pichia*, *Cândida* e *Torulopsis* (Faber *et al*, 1995). As primeiras reações do metabolismo metanólico para obtenção de energia, ocorrem nos peroxissomos e depois prosseguem no citoplasma. A enzima álcool oxidase – AOX (codificada pelos genes *AOX1* e *AOX2*, sendo o primeiro, responsável pela maior atividade da enzima na célula) (Ellis *et al*,

1985) é a primeira a atuar, oxidando o metanol a formaldeído e a peróxido de hidrogênio, que por sua vez é degradado a oxigênio e água. Uma parte do formaldeído deixa o peroxissomo e vai para o citoplasma, onde é oxidado a formato e carbono por duas desidrogenases (Cereghino and Cregg, 2000).

O metanol pode ser sintetizado a partir do gás natural metano, de forma relativamente barata, e foi por este motivo que, no ano de 1970, a *Phillips Petroleum Company* desenvolveu meios e métodos para cultivo desta levedura, no intuito de transformá-la numa fonte de alimento animal, como *Single cell protein* - SCP (Wegner, 1990). Após a crise do óleo, no mesmo período, o custo do metano aumentou dramaticamente, tornando inviável a produção de SCP por *P. pastoris*. Em 1980, a companhia de petróleo, junto ao *Salk Institute Biotechnology/Industrial associates Inc.* (SIBIA, La Jolla, CA, USA) decidiu transformar a levedura em um sistema de produção de proteínas recombinantes. No ano de 1993, a patente foi passada para a RCT (*Research Corporation Technology*- Tucson, AZ), e a *Invitrogen Corporation* (Carlsbad, CA, USA) foi licenciada para vender o sistema de expressão na forma de kit (Macauley-Patrick *et al*, 2005; Cereghino and Cregg, 2000).

Existem linhagens de *Pichia* que têm o seu genótipo modificado para atender diferentes aplicações. Exemplos disto são as linhagens GS115 e KM71 que apresentam o gene da histidina desidrogenase (*his4*) inativo, funcionando assim, como uma marca de seleção para os transformantes (Daly and Hearn, 2004). Os fenótipos associados ao metabolismo do metanol variam em relação ao consumo lento ou normal da fonte de carbono, que depende da interrupção ou não do gene *AOX1*, respectivamente. Linhagens que apresentam o gene *AOX1* intacto (responsável por 85% da utilização do metanol) têm fenótipo Mut⁺ (*Methanol utilization plus*) com taxa de crescimento no metanol igual ao tipo selvagem (Cereghino and Cregg, 2000; Inan and Meagher, 2001). A levedura que tem o fenótipo Mut^s (*Methanol utilization slow*) cresce e usa o metanol de maneira mais lenta por apresentar o gene *AOX1*

interrompido e assim, utilizar o *AOX2* que tem uma atividade menor no metabolismo metanólico. A escolha do fenótipo varia pelo tipo de proteína expressa e formas de estratégias utilizadas, sendo assim, existem pesquisadores que utilizam o fenótipo Mut⁺ (Hohenblum *et al*, 2004; Slibinskas *et al*, 2004), ou o Muts (Aoki *et al*, 2003; McKinney *et al*, 2004).

Os vetores de expressão gênica para uso com a levedura *P. pastoris* estão bem estabelecidos e têm sido utilizados com sucesso para produção de diferentes tipos de proteínas heterólogas (Higgins, 1995). A maioria dos vetores possuem um cassete de expressão composto pela sequência promotora do gene *AOX1* (*AOX1* 5'), um ou mais sítios de clonagem para inserção do gene heterólogo, uma sequência de término da transcrição do gene *AOX1*, sequências para integração no genoma, para seleção e secreção (Daly and Hearn, 2004). Além do promotor *AOX1* existem outros alternativos que podem ser mais indicados para expressão de certos tipos de proteínas, são eles: *GAP*, *FLD1*, *PEX8* e *YPT1*. Sistemas que utilizam vetores com o promotor *GAP* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) necessitam de glicose como fonte de carbono e são amplamente utilizados apresentando níveis de expressão semelhantes ou até maiores dos observados com o promotor *AOX1* (Waterham *et al*, 1997), porém, por ser constitutivo, ele só é apropriado para proteínas recombinantes que não sejam tóxicas às células. Os promotores *YPT1*, induzido por manitol (Sears *et al*, 1998) e construído a partir do gene da GTPase, e o *PEX8*, proteína da matriz peroxissomal (Liu *et al*, 1995), não são muito utilizados, provavelmente pelos baixos níveis de expressão obtidos (Cereghino and Cregg, 2000). O promotor *FLD1* é originado do gene que codifica a enzima formaldeído desidrogenase que participa do metabolismo do metanol. Ele pode ser induzido por metanol, metilamina ou ambos, o que resulta em um alto nível de produção (Resina *et al*, 2004), sendo uma alternativa atrativa para expressão heteróloga (Shen *et al*, 1998).

O sistema de expressão baseado nas células de *P. pastoris* apresenta características peculiares que exercem algumas vantagens sobre os outros. As suas células são de fácil manipulação genética; podem produzir grandes quantidades de proteínas, no espaço intracelular ou extracelular; atingem altas densidades em meios mínimos e de baixo custo e realizam modificações pós-traducionais semelhantes aos mamíferos (Macauley-Patrick *et al*, 2005). Além disso, esta levedura tem um padrão de glicosilação similar ao das células animais e não promove hiperglicosilação como a *Saccharomyces cerevisiae* (Torres & Moraes, 2002). Por apresentar tais características, algumas proteínas que não são expressas com eficiência em bactéria, *S. cerevisiae* ou baculovírus, são obtidas com sucesso e na forma funcional ativa através das células de *P. pastoris* (Cereghino *et al*, 2001).

A fermentação com *Pichia* pode ser feita facilmente em larga escala para atender a demandas maiores, e os parâmetros que influenciam a produção e atividade da proteína, como: pH, aeração e quantidade de carbono, podem ser bem controlados (Higgins and Cregg, 1998). Além disso, esta levedura não é uma forte fermentadora, como *Saccharomyces cerevisiae* e conseqüentemente não atinge com rapidez níveis tóxicos de etanol e ácido acético para as células (Cereghino *et al*, 2002). Outra vantagem do sistema com *P. pastoris* é a possibilidade de reprimir a expressão da proteína heteróloga (se for tóxica à célula, em altos níveis) já que o promotor *AOX1* é fortemente reprimido nas células que crescem com glicose e outras fontes de carbono, sendo induzido 1000 vezes quando as células são submetidas a um meio onde o metanol é a única fonte de carbono (Cereghino *et al*, 2002).

No sistema com *Pichia*, a expressão extracelular é bastante utilizada por que a levedura secreta baixos níveis de proteínas nativas e por isto a purificação da proteína heteróloga se faz de maneira simples. A produção intracelular geralmente não resulta em glicosilação, sendo assim, mais atrativo para certos tipos de proteínas, como fármacos.

Todavia, a purificação das proteínas expressas dentro da célula é mais difícil quando comparada a expressão extracelular (Rees *et al*, 1999).

2.10. Justificativas deste trabalho

Cerca de 15% de todos os cânceres humanos são devidos à infecção viral e 80% destes são devidos à infecção pelo vírus da hepatite B (carcinoma hepatocelular) e pelo papilomavírus humano ou HPV (câncer anogenital) (zur Hausen, 2000). O HPV do tipo 16 é responsável por 50 a 60% dos casos diagnosticados (Motoyama *et al.*, 2004). Portanto, é quase universalmente aceito que a prevenção de infecções por tipos de HPV oncogênicos reduziria dramaticamente a incidência de câncer cervical no mundo (Shiller & Hidesheim, 2000).

No caso da infecção pelo vírus da hepatite B existe uma vacina eficaz que permitiu a implantação de um amplo programa de vacinação em massa, o que resultou em redução drástica da morbidade e mortalidade associada ao vírus (zur Hausen, 1991). Estudos recentes em humanos demonstram que a vacinação contra proteínas do capsídeo previnem eficientemente a infecção (Villa, 2003). Uma vacina profilática contra os principais tipos de HPV associados ao carcinoma cervical, prevalentes na população, teria como objetivo prevenir a infecção ou a reinfecção e beneficiar os indivíduos com maior risco de exposição ao patógeno.

A possibilidade de gerar e manipular VLPs, promoveu o interesse para o desenvolvimento de vacinas profiláticas contra os diversos tipos de HPV (Schiller, 1999). Já existe uma vacina contra o HPV-16, 18, 6 e 11, entretanto, seu custo é muito elevado, sendo necessárias 3 doses. Além disso, ela não engloba os tipos 31 e 33 do HPV, prevalentes na região Centro e Nordeste do Brasil.

No Brasil, a falta de laboratórios capacitados para a produção e avaliação de VLPs de papilomavírus humano representa o principal fator limitante na geração de competência para a produção de vacinas contra esse patógeno. Portanto, o domínio desta estratégia possibilitará o desenvolvimento de VLPs dos diferentes tipos de HPVs relacionados a problemas de saúde pública.

2.11.Objetivos deste trabalho

O presente projeto teve como objetivo principal a expressão do gene L1 do papilomavírus humano tipo 16 (HPV-16) em células da levedura *Pichia pastoris* e conseqüente produção da proteína L1. Os objetivos específicos incluíram as seguintes etapas:

- Amplificação do gene L1 de HPV-16;
- Clonagem do gene L1 no vetor de expressão pPICZ gerando a construção pPICZL1H16;
- Transformação das células de *P. pastoris* com a construção pPICZL1H16;
- Seleção e análise das colônias recombinantes da levedura;
- Avaliação da produção da proteína L1.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aoki H, Ahsan MN and Watabe S (2003) Heterologous expression in *Pichia pastoris* and single-step purification of a cysteine proteinase from northern shrimp. *Prot Exp Pur* 31 (2):213–221.
- Arany I, Goel A and Tying S. K (1995) Interferon response depends on viral transcription in human papillomavirus-containing lesions. *Anticancer Res* 15:2865-2869.
- Barnard P and McMillan NA (1999) The human papillomavirus E7 oncoprotein abrogates signaling mediated by interferon-alpha. *Virology* 259:305–313.
- Benton EC and Arends MJ (1996) Human papillomavirus in the immunosuppressed. In: C. Lacey, Editor, *Papillomavirus Reviews: Current Research on Papillomaviruses*, Leeds University Press 271–279.
- Bernard HU (2005) The clinical importance of the nomenclature, evolution and the taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol* 32:1-6.
- Berkhout RJM, Bavink JNB and ter Schegget J (2000) Persistence of human papillomavirus DNA in benign and (pre)malignant skin lesions from renal transplant recipients. *J Clin Microbiol* 38 (6):2087-96.
- Berzofsky JA, Ahlers JD, Janik J, Morris J, Oh S, Terabe M and Belyakov IM (2004) Progress on new vaccine strategies against chronic viral infections. *J Clin Invest* 114 (4):450-62.
- Billman-Jacobe H (1996) Expression in bacteria other than *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* 7:500–504.
- Bosch FX, Muñoz N, Shah KV and Meheus A (1992) Second International Workshop on the epidemiology of cervical cancer and human papillomavirus. *Int J Cancer* 52:171-173.

- Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ and Shah KV (2002) The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 55:244–265.
- Bosh FX and de Sanjose S (2003) Chapter 1: human papillomavirus and cervical cancer-burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst Monogr* 3-13.
- Bosch FX and Harper D (2006) Prevention strategies of cervical cancer in the HPV vaccine era. *Gynecol Oncol* 103 (1):21-24.
- Breitbart F, Kirnbauer R, Hubbert NL B Nonnenmacher, Trin-Dinh-Desmarquet C, Orth G, Schiller JT and Lowy DR (1995) Immunization with virus-like particles from cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) can protect against experimental CRPV infection. *J Virol* 69:3959–3963.
- Brinton LA (1991) Oral contraceptives and cervical neoplasia. *Contraception* 43:581–595.
- Brown TA (2003) Clonagem Gênica e análise de DNA: uma Introdução. *Artmed* 4ed, 240p.
- Brown DR, Shew ML, Qadadri B, Neptune N, Vargas M, Tu W, Juliar BE, Breen TE and Fortenberry JD (2005) A longitudinal study of genital human papillomavirus infection in a cohort of closely followed adolescent women. *J Infect Dis* 191:182–192.
- Burd EM (2003). Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev* 16 (1):1-17.
- Butel J (2000) Viral carcinogenesis: revelation of molecular mechanisms and etiology of human disease. *Carcinogenesis* 21:405-426.
- Campo MS (1995) Infection by bovine papillomavirus and prospects for vaccination. *Trends Microbiol* 3:92–97.
- Castellsague X, Bosch FX and Munõz N (2002) Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res* 89:191–9.
- Cavalcanti SM, Frugulhetti IC, Passos MR, Fonseca MF and Oliveira LH (1994) Prevalence of human papillomavirus DNA in female cervical lesions from Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89:575-580.

- Cereghino GPL, Cereghino JL, Ilgen C and Cregg JM (2002) Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Curr Opin Biotech* 13:329–332.
- Cereghino JL and Cregg JM (2000) Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev* 24:45-66.
- Cereghino JL and Cregg JM (2001) Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev*, 24:45-66.
- Chadha KC, Ambrus JL Jr, Dembinski W and Ambrus JL Sr (2004) Interferons and interferon inhibitory activity in disease and therapy. *Exp Biol Med* 229:285-90.
- Chang YE and Laimins LA (2000) Microarray analysis identifies interferon-inducible genes and Stat-1 as major transcriptional targets of human papillomavirus type 31. *J Virol* 74:4174–4182.
- Chen XS, Garcea RL, Goldberg I, Casini G and Harrison SC (2000) Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. *Mol Cell*. 5(3):557-67.
- Chirgwin KD, Feldman J, Augenbraun M, Landesman S and Minkoff H (1995) Incidence of venereal warts in human immunodeficiency virus-infected and uninfected women. *J Infect Dis* 172(1):235–238.
- Clifford M, Smith JS, Plummer M, Muñoz N and Franceschi S (2003) Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer* 88:63–73.
- Coffer PJ and Kruijer W (1995) EGF receptor deletions define a region specifically mediating STAT transcription factor activation. *Biochem. Biophys Res Commun* 210:74–81.
- Conger KL, Liu JS, Kuo SR, Chow LT and Wang TS (1999) Human papillomavirus DNA replication. Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human DNA polymerase alpha/primase. *J Biol Chem* 274:2696-2705.

- Connor JP, Ferrer K, Kane JP and Goldberg JM (1999) Evaluation of Langerhans' cells in the cervical epithelium of women with cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol* 75:130-135.
- Culp TD and Christensen ND (2004) Kinetics of in vitro adsorption and entry of papillomavirus virions. *Virology* 319:152–161
- Cuzick J Clavel C, Petry KU, Meijer CJLM, Hoyer H and Ratnam S, Szarewski A, Birembaut P, Kulasingam S, Sasieni P and Iftner T (2006) Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *Int J Cancer* 119:1095–1105.
- Da Silva DM, Eiben GL, Fausch SC, Wakabayashi MT, Rudolf MP, Velders MP and Kast WM (2001) Cervical cancer vaccines: emerging concepts and developments. *J Cell Physiol* 186:169-182.
- Daly R and Hearn MTW (2005) Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J Mol Recognit* 18: 119–138.
- Davidson EJ, Kitchener HC and Stern PL (2002) The use of vaccines in the prevention and treatment of cervical cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 14:193–200.
- Day PM, Lowy DR and Schiller JT (2003) Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology* 307:1–11.
- de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H (2004) Classification of papillomaviruses. *Virology* 324(1):17-27.
- Deacon JM, Evans CD, Yule R Desai M, Binns W, Taylor C, Peto J (2000) Sexual behaviour and smoking as determinants of cervical HPV infection and of CIN3 among those infected: a case-control study nested within the Manchester cohort. *Br J Cancer* 83:1565–72.

- Dillner J (1999) The serological response to papillomaviruses. *Semin Cancer Biol* 9:423–430.
- Dimaio D and Mattoon D (2001) Mechanisms of cell transformation by papillomavirus E5 proteins. *Oncogene* 20:7866-73.
- Doorbar J, Ely S, Sterling J, McLean C and Crawford L (1991) Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* 352:824-7.
- Doorbar J (2005) The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol* 32:7-15.
- Dupuy C, Buzoni-Gatel D, Touzé A, Bout D and Coursaget P (1999) Nasal immunization of mice with human papillomavirus type 16 (HPV-16) virus-like particles or with the HPV-16 L1 gene elicits specific cytotoxic T lymphocytes in vaginal draining lymph nodes. *J Virol* 73 (11):9063-71.
- Ellis SB, Brust PF, Koutz PJ, Waters AF, Harpold MM and Gingeras TR (1985) Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol Cell Biol* 5:1111-1121.
- Eluf-Neto J, Booth M, Munõz N, Bosch FX, Meijer CJLM, Walboomers JM (1994) Human papillomavirus and invasive cervical cancer in Brazil. *Br J Cancer* 69:114-119.
- Evander M, Frazer IH, Payne E Qi YM, Hengst K and McMillan NA (1997) Identification of the $\alpha 6$ integrin as a candidate receptor for papillomavirus. *J Virol* 71:5449-5459.
- Evans TG, Bonne W, Rose RC, Koenig S, Demeter L, Suzich JA, O'Brien D, Campbell M, White WI, Balsley J and Reichman RC (2001) A Phase 1 study of a recombinant viruslike particle vaccine against human papillomavirus type 11 in healthy adult volunteers. *J Infect Dis* 183:1485–1493.
- Faber KN, Harder W, Ab G and Veenhuis M (1995) Review: methylotrophic yeasts as factories for the production of foreign proteins. *Yeast* 11:1331–1344.

- Farthing AJ and Vousden KH (1994) Functions of human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins. *Trends Microbiol* 2:170–174.
- Favre M, Ramoz N and Orth G (1997) Human papillomaviruses: general features. *Clin Dermatol* 15(2):181-98.
- Ferreira W and Souza J (2002) *Microbiologia*. volume 3. LIDEL, Lisboa.
- Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP, Prado JM, Rousseau MC, Désy M and Rohan TE (1999) Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J Infect Dis* 180:1415–1423.
- Franco EL and Harper DM (2005) Vaccination against human papillomavirus infection: a new paradigm in cervical cancer control. *Vaccine* 23:2388-2394.
- Frattoni MG, Laimins, LA (1994) Binding of the human papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer-binding protein. *Proc Natl Acad Sci* 91:12398-12402.
- Frazer IH (2004) Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nat Rev Immunol* 4(1):46-54.
- Fruchter RG, Maiman M, Sedlis A, Bartley L, Camilien L and Arrastia CD (1996) Multiple recurrences of cervical intraepithelial neoplasia in women with the human immunodeficiency virus. *Obstet Gynecol* 87:338–344.
- FSC (2007) Florida Skin Câncer. www.floridaskincenter.com/warts.asp.
- Geisse S, Gram H, Kleuser B and Kocher HP (1996) Eukaryotic expression systems: a comparison. *Protein Expr Purif* 8:271–282.
- Genther Williams SM, Disbrow GL, Shlegel R, Lee D, Threadgile DW and Lambert PF (2005) Requirement of epidermal growth factor receptor for hyperplasia induced by E5, a high-risk human papillomavirus oncogene. *Cancer Res* 65:6534-42.

- Georgopoulos N, Proffitt JL and Blair GE (2000) Transcriptional regulation of the major histocompatibility complex (MHC) class I heavy chain, TAP1 and LMP2 genes by the human papillomavirus (HPV) type 6b, 16 and 18 E7 oncoproteins. *Oncogene* 19: 4930-4935.
- Giles M and Garland S (2006) Human papillomavirus infection: An old disease, a new vaccine. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 46 (3):180–185.
- Giroglou T, Florin L, Schafer F, Streeck RE and Sapp M (2001) Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J Virol* 75:1565–1570.
- Giuliano AR, Harris R, Sedjo RL, Baldwin S, Roe D, Papenfuss MR, Abrahamsen M, Inserra P, Olvera S and Hatch K (2002) Incidence, prevalence, and clearance of type-specific human papillomavirus infections: the Young Women's Health Study. *J Infect Dis* 186:462–469.
- Greenfield I, Nickerson J, Penman S and Stanley M (1991) Human papillomavirus 16 E7 protein is associated with the nuclear matrix. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:11217-11221.
- Haller K, Stubenrauch F and Pfister H (1995) Differentiation-dependent transcription of the epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus type 5 in benign lesions. *Virology* 214:245–255.
- Harro CD, Pang YY, Roden RB, Hildesheim A, Wang Z, Reynolds MJ, Mast TC, Robinson R, Murphy BR, Karron RA, Dillner J, Schiller JT and Lowy DR (2001) Safety and immunogenicity trial in adult volunteers of a human papillomavirus 16 L1 virus-like particle vaccine. *J Natl Cancer Inst* 93:284–292.
- Higgins DR (1995) *Current Protocols in Protein Science: Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast Pichia pastoris*. P T Wingfield 1.ed (2) p571-5716.
- Higgins DR and Cregg JM (1998) *Pichia Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ.

- Hilleman MR (1998) Overview of viruses, cancer, and vaccines in concept and in reality. Recent Results Cancer Res 154:345–62.
- Hilleman MR (2000) Overview of vaccinology with special reference to papillomavirus vaccines. J Clin Virol 19:79–90
- Hohenblum H, Gasser B, Maurer M, Borth N and Mattanovich D (2004) Effects of gene dosage, promoters, and substrates on unfolded protein stress of recombinant *Pichia pastoris*. Biotechnol Bioeng 85(4):367–375.
- Howley PM, Scheffner M and Munger K (1991) Oncoproteins encoded by the cancer-associated papillomavirus target the products of retinoblastoma and p53 tumor suppressor genes. Quant Biol 56:149-155.
- Howley PM (1996) Papillomaviridae: the viruses and their replication. In: B.N. Fields, Knipe D.M. and P.M. Howley, Editors, Virology vol. 2, Lippincott-Raven, Philadelphia p2045–2076.
- IARC (International Agency for Research on Cancer), IARC Handbook of Cancer Prevention (2005). Cervical Cancer Screening vol. 10, IARC Press, Lyon, France
- Inan M and Meagher MM (2001) The effect of ethanol and acetate on protein expression. J Biosci Bioeng 92:337-341.
- Joyce JG, Tung JS, Przysiecki CT, Cook JC, Lehman ED, Sands JÁ, Jansen KU and Keller PM (1999) The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. J Biol Chem 274:5810–5822.
- Kadish AS, Timmins P, Wang Y, Ho GY, Burk RD, Ketz J, He W, Romney SL, Johnson A, Angeletti R and Abadi M (2002) Regression of cervical intraepithelial neoplasia and loss of human papillomavirus (HPV) infection is associated with cell-mediated

- immune responses to an HPV type E7 peptide. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11: 483–488.
- Kanodia S, Fahey LM and Kast WM (2007) Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. *Curr Cancer Drug Targets* 7(1):79-89.
- Katz SL (1997) Future vaccines and a global perspective. *Lancet* 350:1767–70.
- Kim SW and Yang JS (2006) Human papillomavirus type 16 E5 protein as a therapeutic target. *Yonsei Med J* 47(1):1-14.
- Kirnbauer R, Booy F, Cheng N, Lowy DR and Schiller JT (1992) Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 89:12180-12184.
- Kirnbauer R (1996) Papillomavirus-like particles for serology and vaccine development. *Intervirology* 39:54-61.
- Kirnbauer R, Chandrachud LM, O'Neil BW, Wagner ER, Grindlay GJ, Armstrong A, McGarvie GM, Schiller JT, Lowy DR and Campo MS (1996) Virus-like particles of bovine papillomavirus type 4 in prophylactic and therapeutic immunization. *Virology* 219:37–44.
- Kisseljov FL (2000) Virus-associated human tumors: cervical carcinomas and papilloma viruses. *Biochemistry* 65(1):68-77.
- Kupper TS and Fuhlbrigge RC (2004) Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. *Nat Rev Immunol* 4:211–222.
- Le Bon A and Tough DF (2002) Links between innate and adaptive immunity via type I interferon. *Curr Opin Immunol* 14:432–436.
- Lee BN, Follen M, Shen DY, Malpica A, Adler-Storthz K, Shearer WT and Reuben JM (2004) Depressed type 1 cytokine synthesis by superantigen-activated CD4+ T cells of

- women with human papillomavirus-related high-grade squamous intraepithelial lesions. Clin Diagn Lab Immunol 11:239-44.
- Lehtinen M, Rantala I, Toivonen A, Luoto H, Aine R, Lauslahti K, Yla-utinen A, Romppanen U and Paavonen J (1993) Depletion of Langerhans cells in cervical HPV infection is associated with replication of the virus. Apmis 101:833-837.
- Lewis TS, Shapiro PS and Ahn NG (1998) Signal transduction through MAP kinase cascades. Adv Cancer Res 74:49–139.
- Li S, Labrecque S, Gauzzi MC, Cuddihy AR, Wong AH, Pellegrini S, Matlashewski GJ, Koromilas AE (1999) The human papilloma virus (HPV)-18 E6 oncoprotein physically associates with Tyk2 and impairs Jak-STAT activation by interferon-alpha. Oncogene 18:5727-5737.
- Liu H, Tan X, Russell KA, Veenhuis M and Cregg JM (1995) PER3, a gene required for peroxisome biogenesis in *Pichia pastoris*, encodes a peroxisomal membrane protein involved in protein import. J Biol Chem 270(18):10 940.
- Liu WJ, Gissmann L, Sun XY, Kanjanahaluethai A, Muller M, Doorbar J and Zhou J (1997) Sequence Close to the N-terminus of L2 Protein Is Displayed on the Surface of Bovine Papillomavirus Type 1 Virions. Virology 227 (2): 474-483.
- Lonky N, Sadeghi M, Tsadik GW and Petitti D (1999) The clinical significance of the poor correlation of cervical dysplasia and cervical malignancy with referral cytologic results. Am J Obstet Gynecol 181(3):560-6.
- Lorenzato F, Ho L, Terry. G, Singers A, Santos LC, De Lucena Batista R, and Lubambo T (2000) The use of human papil-lomavirus typing in detection of cervical neoplasia in Recife (Brazil). Int J Gynecol Cancer 10:143-150.
- Lowndes CM (2006) Vaccines for cervical cancer. Epidemiol Infect 134:1-12.

- Lowy DR and Frazer IH (2003) Chapter 16: Prophylactic Human Papillomavirus Vaccines. J Natl Cancer Inst Monogr 31:111-116.
- Lowy DR and Schiller JT (2006) Prophylactic human papillomavirus vaccines. J Clin Invest 116(5):1167-73.
- Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B and Harvey LM (2005) Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. Yeast 22:249–270.
- Machado PRL, Araújo MIAS, Carvalho L & Carvalho EM (2004) Mecanismos de resposta imune às infecções. An bras Dermatol, RJ 79(6):647-664.
- Madkan VK, Cook-Norris RH, Steadman MC, Arora A, Mendoza N and Tyring SK (2007) The oncogenic potential of human papillomaviruses: a review on the role of host genetics and environmental cofactors. Br J Dermatol 157:228–4.
- Makrides SC (1996) Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. Microbiol Rev 60:512–538.
- Marchetti B, Ashrafi GH, Tsirimonaki E, O'Brien PM and Campo MS (2002) The papillomavirus oncoprotein E5 retains the major histocompatibility class I in the Golgi apparatus and prevent its transport to the cell surface. Oncogene 21:7808–7816.
- Mason HS and Arntzen CJ (1995) Transgenic plants as vaccine production systems. Trends Biotechnol 13:388–392.
- Matthews K, Leong CM, Baxter L, Inglis E, Yun K, Backstrom BT, Doorbar J and Hibma M (2003) Depletion of Langerhans cells in human papillomavirus type 16-infected skin is associated with E6-mediated down regulation of E-cadherin. J Virol 77: 8378-8385.
- McBride AA, Romanczuk H, Howley PM (1991) The papillomavirus E2 regulatory proteins. J Biol Chem 266:18411-4.
- McCance DJ (2005) Transcriptional regulation by human papillomaviruses. Curr Opin in genetics & development 15:515-519.

- McCarroll L, King LA (1997) Stable insect cell cultures for recombinant protein production. *Curr Opin Biotechnol* 8:590–594.
- McCarroll L and King LA (1997) Stable insect cell cultures for recombinant protein production. *Curr Opin Biotechnol* 8:590-594.
- McKinney J, Knappskog PM, Pereira J, Ekern T, Toska K, Kuitert BB, Levine D, Gronenborn AM, Martinez A and Haavik J (2004) Expression and purification of human tryptophan hydroxylase from *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* 33:185–194.
- Modis Y, Trus BL and Harrison SC (2002) Atomic model of the papillomavirus capsid. *EMBO J* 21(18):4754-62.
- Mohr IJ, Clark R, Sun S, Androphy EJ, MacPherson P and Botchan MR (1990) Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator. *Science* 250:1694-1699.
- Montor WR & Sogayar MC. Insetos como biofábricas de proteínas humanas. *Ciência Hoje* 33(196):16-23
- Morton CL and Potter PM (2000) Comparison of *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Spodoptera frugiperda*, and COS7 cells for recombinant gene expression. Application to a rabbit liver carboxylesterase. *Mol biotechnol* 16:193-202.
- Mota F, Rayment N, Chong S, Singer A and Chain B (1999) The antigen-presenting environment in normal and human papillomavirus (HPV)-related premalignant cervical epithelium. *Clin Exp Immunol* 116(1): 33-40.
- Motoyama S, Ladnines-Llave CA, Villanueva SL and Maruo T (2004) The Role of Human Papilloma Virus in the Molecular Biology of Cervical Carcinogenesis. *Kobe J Med Sciv* 50:9-19.
- Münger K (1995) The molecular biology of cervical cancer. *J Cell Biochem* 23:55–60.

- Munoz N (2000) Human papillomavirus and cancer: The epidemiological evidence. *J Clin Virol* 19:1-5.
- Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ and Meijer CJ (2003) Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 348(6):518-27.
- Muñoz N, Castellsagué X, González AB and Gissmann L (2006) Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* 24 (S3):S1-S10.
- Myers G, Lu H, Calef C and Leitner T (1996) Heterogeneity of papillomaviruses. *Semin Cancer Biol* 7:349-358.
- Nees M, Geoghegan JM, Hyman T, Frank S, Miller L and Woodworth CD (2001) Papillomavirus type 16 oncogenes downregulate expression of interferon-responsive genes and upregulate proliferation-associated and NF-kappaB-responsive genes in cervical keratinocytes. *J Virol* 75:4283-4296.
- NMA (Nucleus Medical Art) Progression of cervical Cancer: medical illustration (2007) <http://catalog.nucleusinc.com/chooseexhibit.php?A=2&I=2&TL=1793&ExhibitKeywords=cervical+cancer>.
- Noad R and Roy P (2003) Virus-like particles as immunogens. *Trends Microbiol* 11(9):438-44.
- Noronha V, Mello W, Villa LL, Macedo R, Bisi F, Mota R, Sassamoto K, Monteiro T and Linhares A (1999) Human papillomavirus associated with uterine cervix lesions. *Rev Soc Bras Med Trop* 32:235-240.
- O'Brien PM, Saveria Campo M (2002) Evasion of host immunity directed by papillomavirus-encoded proteins. *Virus Res* 88(1-2):103-17.
- Ozbun M (2002) Infectious human papillomavirus type 31b: purification and infection of an immortalized human keratinocyte cell line. *J Gen Virol* 83:2753-2763.

- Palker TJ, Monteiro JM, Martin MM, Kakareka C, Smith JF, Cook JC, Joyce JG and Jansen KU (2001) Antibody, cytokine and cytotoxic T lymphocyte responses in chimpanzees immunized with human papillomavirus virus-like particles. *Vaccine* 19(27):3733-43.
- Park JS, Kim EJ, Kwon HJ, Hwang ES, Namkoong SE and Um SJ (2000) Inactivation of interferon regulatory factor-1 tumor suppressor protein by HPV E7 oncoprotein. Implication for the E7-mediated immune evasion mechanism in cervical carcinogenesis. *J Biol Chem* 275:6764–6769.
- Parkin DM (2006) The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer* 118(12):3030-44.
- Pelczar JM, Chan ECS and Krieg NR (1996) *Microbiologia: conceitos e aplicações*. São Paulo, Makron Books, 2.ed 517p.
- Pennie WD, Grindlay GJ, Cairney M and Campo MS (1993) Analysis of the transforming functions of bovine papillomavirus type 4. *Virology* 193: 614–620.
- Pérez-López FR (2003) virus del papiloma, condilomas verrugosos, CIN, SIL y cancer genital. *Gine Web Ginecologia* www.unizar.es/gine/gin301.htm.
- Prokopczyk B, Cox JE, Hoffmann D and Waggoner SE (1997) Identification of tobacco-specific carcinogen in the cervical mucus of smokers and nonsmokers. *J Natl Cancer Inst* 89:868–73.
- Rabelo-Santos SH, Zeferino L, Villa LL, Sobrinho JP, Amaral RG and Magalhães AV (2003) Human Papillomavirus Prevalence among Women with Cervical Intraepithelial Neoplasia III and Invasive Cervical Cancer from Goiânia, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 98(2):181-4.
- Rees GS, Gee CK, Ward HL, Ball C, Tarrant GM, Poole S and Bristow AF (1999) Rat tumour necrosis factor-alpha: expression in recombinant *Pichia pastoris* purification, characterization and development of a novel ELISA. *Eur Cytokine Netw* 10:383–392.

- Resina D, Serrano A, Valero F and Ferrer P (2004) Expression of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* under control of the nitrogen source-regulated formaldehyde dehydrogenase promoter. *J Biotechnol* 109(1–2):103–113.
- Roßlinghoff M (1997) Immunity, components of the immune system and immune response. *Biologicals* 25:165–8.
- Roden R and Wu TC (2006) How will HPV vaccines affect cervical cancer? *Nature Reviews Cancer* 6:753-763.
- Rogan D and Babiuk LA (2005) Novel vaccines from biotechnology. *Rev sci tech Off int Epiz* 24 (1):159-174.
- Ronco LV, Karpova AY, Vidal M and Howley PM (1998) Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes Dev* 12:2061-2072.
- Sandal T (2002) Molecular aspects of the mammalian cell cycle and cancer. *The Oncologist* 7:73-81.
- Saloney N (2007) Cervical cancer screening: Unaided Visual Inspection of the Cervix Clinical Downstaging Picture Atlas Geneva. Geneva WHO Collaborating Center in Human. http://www.gfmer.ch/Books/Cervical_cancer_modules/Unaided_visual_inspection_atlas.htm.
- Schatzmayer HG (2001) Emerging and reemerging viral diseases. *Cad Saude Publica* 17:209-213.
- Scheurer ME, Tortolero-Luna G and Adler-Storthz K (2005). Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. *Int J Gynecol Cancer* 15:727-746.
- Schiller JT (1999) Papillomavirus-like particle vaccines for cervical cancer. *Mol Med Today* 5:209–215.

- Schiller JT and Hidesheim A (2000) Developing HPV virus-like particle vaccines to prevent cervical cancer: a progress report. *J Clin Virol* 19:67-74.
- Sears IB, Oconnor J, Rossanese OW and Glick BS (1998) A versatile set of vectors for constitutive and regulated gene expression in *Pichia pastoris*. *Yeast* 14:783–790.
- Sebastián JVB (2006) Atlas Clínico de Medicina Oral: tumores benignos de la mucosa oral. <http://www.uv.es/medicina-oral/Docencia/atlas/tumoresbenignos/1.htm>
- Shen S, Sulter G, Jeffries TW and Cregg JM (1998) A strong nitrogen source-regulated promoter for controlled expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*. *Gene* 216:93–102.
- Shuler ML and Kargi F (2001) Utilizing Genetically Engineered Organisms In: *Bioprocess Engineering: Basic Concepts*, 2nd Edition by Prentice Hall.
- Silva AMT, Amaral MVT & Cruz AD (2003) HPV e Câncer: O papel do papiloma vírus humano na carcinogênese. *Biotechnol Ciênc Desenvol* 29:48-54.
- Slebos RJ, Kesses TD, Chen AW, Han SM, Hedrick L and Cho KR (1995) Functional consequences of directed mutations in human papillomavirus E6 proteins: abrogation of p53-mediated cell cycle arrest correlates with p53 binding and degradation in vitro. *Virology* 208:111-20.
- Slibinskas R, Samuel D, Gedvilaite A, Staniulis J and Sasnauskas K (2004) Synthesis of the measles virus nucleoprotein in yeast *Pichia pastoris* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biotechnol* 107:115–124.
- Snijders PJ, Steenbergen RD, Heideman DA and Meijer CJ (2006) HPV-mediated cervical carcinogenesis: Concepts and clinical implications. *J Pathol.* 208:152-64.
- Southern SA, and Herrington CS (2000) Disruption of cell cycle control by human papillomavirus with special reference to cervical carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* 10:263-274.

- Souto R, Falhari JPB & Cruz AD (2005). O papilomavírus Humano: um fator relacionado com a formação de neoplasias. *Rev Br Cancerol* 51 (2):155-160.
- Stanley MA (2001) Human papillomavirus and cervical carcinogenesis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 15(5): 663-76.
- Stanley MA (2002) Human papillomavirus vaccines. *Curr Opin Mol* 4:15–22.
- Stanley MA (2000) Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine* 24(S1):S16-S22.
- Stanley M, Lowy DR and Frazer I (2006) Chapter 12: Prophylactic HPV vaccines: Underlying mechanisms. *Vaccine* 24(S3):S106-S113.
- Stark GR and Kerr IM (1992) Interferon-dependent signaling pathways: DNA elements, transcription factors, mutations, and effects of viral proteins. *J Interferon Res* 12:147–151.
- Steenbergen RDM, Wilde J, Wilting SM, Brink AATP, Snijders PJF and Meijer CJLM (2005) HPV-mediated transformation of the anogenital tract. *J Clin Virol* 32:25-33.
- Sterling JC (2005) Human papillomaviruses and skin cancer. *J Clin Virol* 32:67-71.
- Stoler MH, Wolinsky SM, Whitbeck A, Broker TR and Chow LT (1989) Differentiation-linked human papillomavirus types 6 and 11 transcription in genital condylomata revealed by in situ hybridization with message-specific RNA probes. *Virology* 172(1): 331–340.
- Stoler, MH, Rhodes CR, Whitbeck A, Wolinsky SM, Chow LT and Broker TR (1992) Human papillomavirus type 16 and 18 gene expression in cervical neoplasias. *Hum Pathol* 23: 117-128.
- Storey A, Pim D, Murray A, Osborn K, Banks L and Crawford L (1988) Comparison of the in vitro transforming activities of human papillomavirus types. *Embo J* 7:1815-1820.
- Stubenrauch F and Laimins LA (1999) Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Cancer Biology* 9:379-386.

- Sudbery PE (1996) The expression of recombinant proteins in yeasts. *Curr Opin Biotechnol* 7: 517–524.
- Suzich JA, Ghim SJ, Palmer-Hill FJ, White WI, Tamura JK, Bell JA, Newsome JA, Jenson AB and Schlegel R (1995) Systemic immunization with papillomavirus L1 protein completely prevents the development of viral mucosal papillomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:11553–11557.
- Syrjanen S (2005) Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *J Clin Virol* 32:59-66.
- Tewari KS, Taylor JA, Liao SY, DiSaia PJ, Burger RA, Jomk, BJ, Hughes CCW, and Villareal LP (2000) Development and assessment of a general theory of cervical carcinogenesis utilizing a severe combined immunodeficiency murinehuman xenograft model. *Gyn Onco* 77:137-148.
- Theofilopoulos AN, Baccala R, Beutler B and Kono DH (2005) Type I interferons (α/β) in immunity and autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 23:307–336.
- Thomas JT, Hubert WG, Ruesch MN and Laimins LA (1999) Human papillomavirus type 31 oncoproteins E6 and E7 are required for the maintenance of episomes during the viral life cycle in normal human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(15):8449–8454.
- Torres FAG & Moraes LMP (2002) Proteínas recombinantes produzidas em leveduras. *Biotechnolog Cienc Desenvolv* 29:20-22.
- Trottier H and Franco EL (2006) The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine* 24(1):1-15.
- Tsai TC and Chen SL (2003) The biochemical and biological functions of human papillomavirus type 16 E5 protein. *Arch Virol* 148:1445-53.

- Tsao YP, Li LY, Tsai TC and Chen SL (1996) Human papillomavirus type 11 and 16 E5 represses p21 (Waf1/Sdi1/Cip1) gene expression in fibroblasts and keratinocytes. *J Virol* 70:7535-9.
- US Food and Drug Administration (2006). Product approval information — licensing action. US Food and Drug Administration, <http://www.fda.gov/cber/products/gardasil.htm>.
- van Muyden RC, ter Harmsel BW, Smedts FM, Hermans J, Kuijpers JC, Raikhlin NT, Petrov S, Lebedev A, Ramaekers FC, Trimboos JB, Kleter B and Quint WG (1999) Detection and typing of human papillomavirus in cervical carcinomas in Russian women: a prognostic study. *Cancer* 85:2011–2016.
- Villa LL (2003) Vaccines against papillomavirus infections and disease. *Salud Publica Mex* 45(3):443-8.
- Villa LL, Costa RLR, Petta CA, Andrade RP, Ault KA, Giuliano AR Wheeler CM, Koutsky LA, Malm C, Lehtinen M, Skjeldestad FE and Olsson SE *et al* (2005) Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11 16 and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. *Lancet Oncol* 6:271–278.
- Vousden K (1993) Interactions of human papillomavirus transforming proteins with the products of tumor suppressor genes. *The FASEB Journal* 7:872-879.
- Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM, Bosh FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ and Munoz N (1999) Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 189:12-19.
- Waterham HR, Digan ME, Koutz PJ, Lair SV and Cregg JM (1997) Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. *Gene* 186:37–44.

- Wegner G (1990) Emerging applications of the methylotrophic yeasts. FEMS Microbiol Rev 7:279–283.
- Welters MJP, de Jong A, van den Eeden SJF, van der Hulst JM, Kwappenberg KMC, Kadish AS, Timmins P, Wang Y, Ho GY, Burk RD, Ketz J, He W, Romney SL, Johnson A, Angeletti R and Abadi M (2003) Regression of cervical intraepithelial neoplasia and loss of human papillomavirus (HPV) infection is associated with cell-mediated immune responses to an HPV type E7 peptide. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 11:483–488.
- Werness BA, Levine AJ and Howley PM (1990) Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. Science 248:76-79.
- Woodman CB, Collins SI and Young LS (2007) The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. Nat Rev Cancer 7(1):11-22.
- Wurm F and Bernard A (1999) Large-scale transient expression in mammalian cells for recombinant protein production. Curr Opin biotechnol 10:156-159.
- Xu YF, Zhang YQ, Xu XM and Song GX (2006) Papillomavirus virus-like particles as vehicles for the delivery of epitopes or genes. Arch Virol Nov 151(11):2133-48.
- Zhang P, Nouri M, Brandsma JL, Iftner T and Steinberg BM (1999) Induction of E6/E7 expression in cottontail rabbit papillomavirus latency following UV activation. Virology 263:388–394.
- Zhou J, Sun XY, Stenzel DJ and Frazer IH (1991) Expression of vaccinia recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles. Virology 185:251–257.
- Ziegler RG, Brinton LA, Hamman RF, Lehman HF, Levine RS, Mallin K, Norman SA, Rosenthal JF, Trumble AC and Hoener RN (1990) Diet and the risk of invasive

cervical cancer among white women in the United States. Am J Epidemiol 132:432–445.

Zielinski GD, Snijders PJ, Rozendaal L, Daalmeijer NF, Risse EK, Voorhorst FJ, Jiwa NM, Linden HC, van der, Schipper FA de, Runsink AP, Meijer CJLM (2003) The presence of high-risk HPV combined with specific p53 and p16INK4a expression patterns points to high-risk HPV as the main causative agent for adenocarcinoma in situ and adenocarcinoma of the cervix. J Pathol 201:535–543.

zur Hausen H (1991) Viruses in human cancers. Science 254:1167-73.

zur Hausen H (1996) Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. Biochim. Biophys Acta 1288:F55-F78.

Zur Hausen H (1998) Papillomavirus and p53. Nature 393:217.

zur Hausen H (2000) Papillomavirus causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. J Natl Cancer Inst 92: 690–698.

Zur Hausen H (2002) Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. Nat Rev Cancer 2:342-350.

4. ARTIGO CIENTÍFICO EM PUBLICAÇÃO

VIRUS-LIKE PARTICLES AS A VACCINAL STRATEGY AGAINST TUMORS INDUCED FOR PAPILLOMAVIRUS INFECTION

Artigo a ser publicado como capítulo do Livro:
*Communicating Current Research and
Educational Topics and Trends in
Applied Microbiology*

Badajoz, Spain

Virus-Like Particles as a vaccinal strategy against tumors induced by papillomavirus infection

E. C. Coimbra¹, H. M. Souza¹, M. C. G. Leitão³, J. F. dos Santos¹, W. Beçak^{1,2}, R. C. Stocco dos Santos², A. C. Freitas^{1,2,3}

¹Departamento de Genética de Genética, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Moraes Rego, s/n, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brazil

²Laboratório de Genética, Instituto Butantan, Av. Vital Brazil, 1500, 05503-900, São Paulo, São Paulo, Brazil

³Setor de Biologia Molecular, LIKA, Universidade Federal de Pernambuco Av. Moraes Rego, s/n, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brazil

Papillomavirus (PV) are small DNA viruses that infect mucosal and cutaneous epithelium and cause benign hyperproliferative lesions in human and animals. Occasionally these lesions can progress to cancer under appropriated environmental conditions. The human papillomavirus (HPV) is associated with many different types of cancer with approximately 450,000 newly diagnosed cases each year and 50% mortality rate. The bovine papillomavirus (BPV) is associated with papillomatosis and cancer in bovines. Cattle cutaneous papillomatosis is not only a health problem but also has economic consequences. Occasionally, entire herds have to be culled if the papillomatosis does not regress. Infections with papillomatosis induce type-specific immune responses, mainly directed against the major capsid protein, L1. Based on the propensity of the L1 protein to self-assemble into virus-like particles (VLPs), our group has lead to research into the development of BPV and HPV vaccine strategies. This work focuses on the expression of L1 BPV and HPV gene in the *Pichia pastoris* expression system how a base to VLP production.

Keywords: VLP, *Pichia pastoris*, heterologous expression system, papillomavirus, vaccine

1. Introduction

Papillomaviruses are small double-stranded DNA viruses found in a wide variety of proliferative lesions of epithelial origin and that are associated with different carcinogenesis process in human and other animals [1].

Human papillomavirus (HPV) has been firmly identified as the major etiologic agent of neoplasia of cutaneous and mucosal epithelia [2]. Of the 200 or more types of HPV that have been discovered, about 35 of them are associated with cancer. Cervical cancer is the second most common cause of cancer-related deaths in women worldwide. More than 450,000 cases are diagnosed each year, resulting in nearly 250,000 deaths. HPV-16 is the most prevalent, accounting for more than half of cervical cancer cases [3].

In cattle, bovine papillomavirus (BPV) are the etiologic agent of neoplasia of upper gastrointestinal tract, and urinary bladder, and cutaneous papillomatosis. Infection by papillomavirus requires epidermal or mucosal epithelial cells. Initial infection occurs in basal cells and the access to these cells occurs through micro-abrasions caused by various forms of physical trauma [4]. The correlation of BPV and cancer has been evaluated not only because of the economic repercussions of virus infection, but also because the system is an attractive experimental model to study HPV infection and carcinogenesis [5,6].

Papillomavirus can not be grown in the laboratory as a source of antigen for serological tests and conventional killed vaccine development, so vaccine development is difficult [7]. Therefore, papillomavirus vaccines currently under development employ genetic engineering technology. The main requirement for prophylactic papillomavirus vaccine is to induce neutralizing anti-bodies against

natural structural viral capsid proteins to prevent virus entry into the host cell [8]. The principle protein components of the virion are two virus encoded proteins. The main protein components of the virion are proteins encoded by two open reading frames (ORF). The major capsid protein has a molecular weight of 55-60 kDa and is encoded by L1 ORF and the minor capsid protein, produced in a substantially less amount, is encoded by the L2 ORF and it has a apparent molecular weight of 75-100 kDa [9]. The discovery that papillomavirus capsid proteins L1 and L2 (or L1 alone) self-assemble into virus-like particles (VLPs) when over expression in a heterologous expression system was decisive to papillomavirus vaccine research [10]. VLPs are not only immunogenic and safe, but also are able to induce strong cell-mediated and humoral immune responses [11, 12].

Expression of papillomavirus proteins has been achieved in several different model systems as bacteria, insect cells, mammalian cells, and yeast. Yeast as an expression host offers distinct advantages over these expression systems both in terms of scale ability and productivity as well as the proven safety of yeast derived viral proteins for pharmaceutical applications, e.g. hepatitis B vaccine [13].

We have selected the methylotropic yeast *Pichia pastoris* to express structural protein L1 of papillomavirus since several reports have shown that this yeast, unlike *Saccharomyces cerevisiae*, is capable of expressing glycoproteins that are both non-hyperglycosylated and lack a terminal 1,3-linked mannose addition which are undesirable features that limit the pharmaceutical potencial applications of recombinant expressed proteins [14]. *P. pastoris* is transformed by integration of the expression cassette into chromosome at a specific locus to generate genetically stable transformants. This cassette can use the AOX1 strong promoter induced by methanol to drive the expression of recombinant proteins to high levels even with a single integrated copy of the expression cassette [14].

In this study, we focus on the strategy for production of a recombinant *Pichia pastoris* expressing HPV-16 L1 gene as a base to VLP production.

2. Material and Methods

Bacteria and Yeast cells

Escherichia coli Top 10 and *Pichia pastoris* GS115 were purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA). The *E. coli* strain was grown in L-broth at 37°C and *P. pastoris* was grown in YPD media at 30°C.

Plasmids

The pBR322 plasmid containing the whole genome of HPV-16 was used to obtained L1 HPV-16 by PCR. The pGEM-T (Promega, Madison) was used as appropriated cloning vector for PCR products. Expression vector pPICZA, purchased from Invitrogen, contains the 5'AOX1 promoter region induced by methanol and the 3'AOX1 transcription terminators, as well as the *Sh ble* gene, that gives Zeocin (Invitrogen) resistance.

Cloning strategy

DNA fragment encoding the full length HPV-16 L1 gene was generated by polymerase chain reaction (PCR) amplification using TripleMaster-Taq DNA polymerase HiFi (Eppendorf) and specific primers. The primers were constructed based on the sequences deposited in the Gene Bank. The forward primer for HPV-16 L1 gene was constructed to contain the yeast consensus Kozak sequence and a restriction site for *KpnI* in the 5'terminal. The reverse primer contains a terminal *Sall* restriction site and the downstream stop codon was removed in order to have an attached 6 His-tag. The L1 fragment amplified was initially cloned into the pGEM-T easy vector, originating the pGEML1H16 with *KpnI* and *Sall*, the restriction fragment was purified using the Promega purification kit. The

purified L1 fragment was subcloned into the *P. pastoris* expression vector pPICZA, opened with *KpnI* and *Sall* enzymes, to originate the pPICZL1H16 construct.

DNA manipulation

All routine subcloning, ligation, transformation, restriction enzyme digestion, and plasmid DNA preparation were performed as described in standard texts [15].

PCR directed cloning

Two primers, FwL1H16 (5'- GGTACC AWAATGTCTCTTTGGCTGCC -3', with *KpnI* site underlined and the Kozak sequence in italics) and RevL1H16 (5'- GTCGAC CAG CTT ACGTTTTTTGCG-3', with *Sall* site underlined), were used to generate a 1.5 Kb PCR fragment containing flanking *KpnI* and *Sall* restriction sites corresponding to L1 gene, using pBR322H16 as a template. This PCR fragment was ligated to the pGEM-T cloning vector generating the pGEML1H16 and sequenced by the dideoxy sequencing method. After digestion of the pGEML1H16 with *KpnI* and *Sall* the digestion fragment was purified and ligated into the corresponding *KpnI* and *Sall* sites of *P. pastoris* expression vector generating the ppiczl1h16 construct, with a 6 histidines tail in the C-terminus.

Pichia pastoris transformations

The recombinant plasmid (pPICZL1H16) was linearized by *SacI* digestion and used to transform the *P. pastoris* strain GS115 by lithium chloride protocol [21]. A 50mL culture of *P. pastoris* was grown in YPD at 30°C with shaking to OD₆₀₀ of 0.8 to 1.0. Cells were harvested and washed with 25mL of sterile water and centrifuged at 1500xg for 10 minutes at room temperature. The water was discarded and cells resuspended in 1mL of 100mM LiCl. The cell suspension was transferred to a 1.5mL microcentrifuge tube and centrifuged at maximum speed for 15 seconds and LiCl was removed with a pipet. The cells were resuspended in 400µL of 100mM LiCl. For each transformation 50µL of the cell suspension was dispensed into 1.5mL microcentrifuge tube and use immediately. The transformation was carried out by adding a reaction mixture containing 50% PEG; 1M LiCl; 2mg/ml single-stranded DNA; and the linearized plasmid DNA. The reaction tube was submitted to vortex until the cell pellet is completely mixed and incubated at 30°C for 30 minutes without shaking. After the reaction tube was submitted to heat shock at 42°C for 20 minutes. The tube was centrifuged at 7000 rpm and the transformation solution was removed with pipet. The pellet was resuspended in 1mL of YPD and incubated at 30°C with shaking. After 1 hour and 4 hour, 25 to 100µL was plated on YPD plates containing 100µg/mL Zeocin. The plates were incubated for 2-3 days at 30°C after which the transformants were analysed.

Analysis of the MUT⁺ and MUT^S phenotypes of the GS115/pPICZL1H16 recombinants

After isolating the DNA from the GS115 transformed with pPICZL1H16, the following procedure was used to identify integrants and its Mut phenotype. Amplification of the interest gene was carried out with 5'AOX and 3'AOX primers. About 10µL of the *P. pastoris* culture was placed into a 1.5mL microcentrifuge tube and 5µL of a 5U/µL solution of lyticase was added and incubated at 30°C for 10 minutes. The samples were frozen at -80°C for 10 minutes and 5µL of this reaction was used to PCR. The product of amplification was analysis by 1,2% agarose gel electrophoresis.

Analysis of total mRNA extracted from recombinants of *P. pastoris*

Recombinant colonies GS115/pPICZL1H16 isolated from Zeocin selective media plates were inoculated into 5mL of the minimal glycerol medium (MGY) and allowed to grow for 24h at 30°C with vigorous shaking. To induce L1 gene expression, methanol was added to the media to a final concentration of 1%. After incubation for 48h, methanol was added again and after a further 24h

growth the cells were harvested. The total RNA was extract from methanol induced culture samples using TRIzol reagent (Invitrogen). The L1 mRNA was detected by RT-PCR amplification using the SupeScript II kit (Invitrogen). The amplification was performed with primers Fw 5'-GGTCCATTAGGTGTGGG-3', and Rv 5'-AGCTGTGCGCCATATGGTTCTG-3', and the L1 amplification product of 500pb confirmed by 1,2% agarose gel electrophoresis.

Analysis of L1 protein production

Cell extracts from GS115/pPICZL1H16 were analysed by sodium dodecyl sulfate poliacrylamide gel (SDS-PAGE) separation to detect the L1 heterologous protein as follows: cells correspondin to an optical density of OD₆₀₀ =1.0 were harvested, washed and resuspended in 500µL of PBS+1mM PMSF+ 1% Triton X-100, an equal volume of glass beads (0,5mm) was added and cells were disrupted by vortexing 10 times for 1min. after centrifugation for 10min at 14000g, 10µL of the supernatant was loaded onto a 12% SDS-PAGE and the gel was stained with silver nitrate. Dot blot analisys of same cell extracts was performed with anti-penta-His antibody (Qiagen, Germany). Membranes were blocked in 2% (w/v) bovine serum albumin in PBST (10mM Na₂PO₄, 150mM NaCl, and 1% Tween 20). Incubation was performed three times with PBST, the membranes were incubated with secondary horseradish antibody peroxidase (HRP) conjugated anti-mouse antibody at 1:4000 in blocking buffer His-tag detection. Three washing steps were subsequently performed with PBST.

3. Results

Construction of the *P. pastoris* expression vector: pPICZL1H16

The results showed in the Fig. 1, indicate that the full length HPV-16 L1 gene was successfully cloned into pPICZA expression vector. The construct was designated pPICZL1H16.

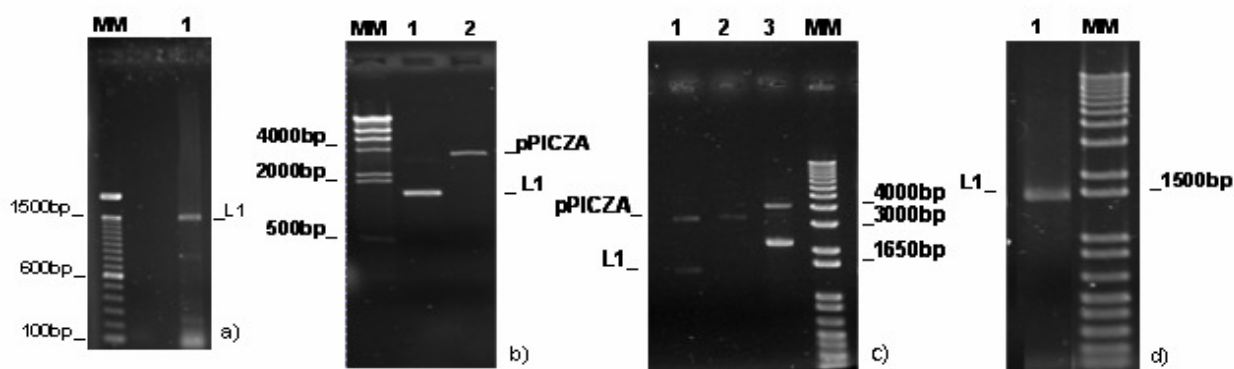


Fig. 1 a) the PCR of HPV-16 L1gene with specific primers generated a 1.5 kb product confirmed by electrophoresis in 1.2% agarose gel: lane MM, molecular marker 100bp ladder (Promega); lane 1, 1.5Kb L1 amplicom. This product was inserted into pGEM-T easy vector and the pGEML1H16 was confirmed by *EcoRI* digestion (data not shown). In b) the product pGEML1H16 was cleaved by *KpnI* and *Sall*, separated in 1.2% agarose electrophoresis and the 1.5kb fragment was purified and ligated to *P. pastoris* expression vector pPICZA previously digested also with *KpnI* and *Sall*: lane MM, lambda HindIII molecular marker; lane 1, HPV-16 L1 purified; lane 2, pPICZA purified. In c) analysis of the L1 HPV-16 clones: lane MM, molecular marker 1Kb plus DNA ladder (Promega); lane 1, clone DNA digested with *KpnI/Sall*; lane 2, pPICZA plasmid digested with *KpnI*, lane 3, pPICZA not digested. In d), is show that L1 HPV-16 gene was successfully cloned into pPICZA vector by PCR giving origin to pPICZL1H16 construct: lane MM, molecular marker 1Kb plus DNA ladder (Promega); lane 1, HPV-16 L1 amplicom.

Screening of GS115 transformants (GS115/pPICZL1H16)

Whit the use of the AOX1 primers or HPV-16 L1 primer associated with AOX1 primer is possible verify the integration of HPV-16 L1 gene into *Pichia pastoris* cell genome. The results showed in the Fig. 2, indicate that pPICZL1H16 was successfully inserted into *P. pastoris* GS115 strain. The recombinant was designated GS115/pPICZL1H16.



Fig. 2 In a) are shown GS115/pPICZL1H16 clones grown in plate containing YPD+Zeocin (see Material and Methods). In b), is shown a GS115/pPICZL1H16 clone grown in YPD+Zeocin liquid medium (see Material and Methods). In c), the integration of pPICZL1H16 construct into GS115 was confirmed by PCR of the GS115 recombinant clones: lane MM, molecular marker 1Kb plus DNA ladder (Promega); lanes 1 and 2, PCR using AOX primers; lane 3, PCR using L1 HPV-16 primers. Both PCR amplifications have confirmed the presence of HPV-16 L1 gene.

Analysis of GS115/pPICZL1H16 phenotype

The results showed in Fig. 3, indicate that all GS115/pPICZL1H16 obtained clones are MUT^S phenotype.

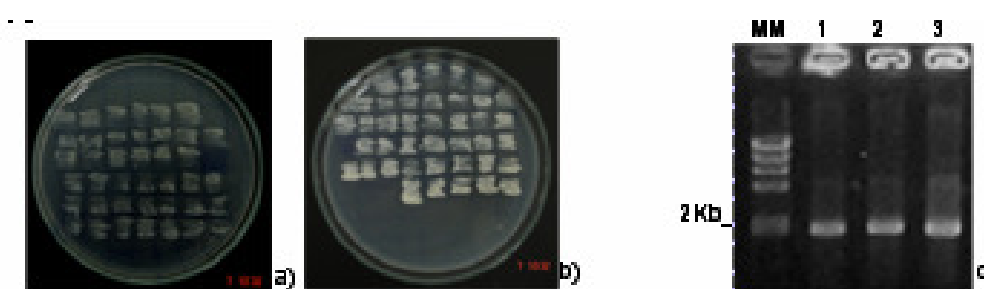


Fig. 3 In a) and b) are shown the GS115/pPICZL1H16 clones analysis for MUT phenotype by growth in plates with MMH (Minimal Metanol + Histidine) or MDH (Minimal Dextrose Medium + Histidine) medium, respectively. In c) is shown a PCR using AOX1 primers (according with *Pichia pastoris* Expression System manufacturer manual): only one band with 1500pb + 325pb, indicate that MUT^S phenotype. Lanes 1, 2 and 3 identify the CL1, CL2, and CL3 clones respectively. The best growth of the clones in MDH medium associated with only one band amplification product in PCR indicate that these clones are MUT^S phenotype.

Analysis of HPV-16 L1 expression

Total RNA extracted from *P. pastoris* cells was analyzed for expression of the integrated L1 gene by RT-PCR. A 500bp integrated L1 gene DNA fragment was observed as an amplification product (Fig. 4), suggesting active transcription of the HPV-16 L1 gene. The protein extract of induced and

non induced clones were prepared and the proteins resolved in SDS-PAGE followed by staining with silver nitrate. The result shown in Fig. 5a indicates that L1 protein, represented by approximately 55kDa band, can be visualized in all induced clones. A Dot Blot using anti-Histidine antibody was performed and the result confirms the SDS-PAGE data, indicate the L1 protein expression (Fig. 5b).

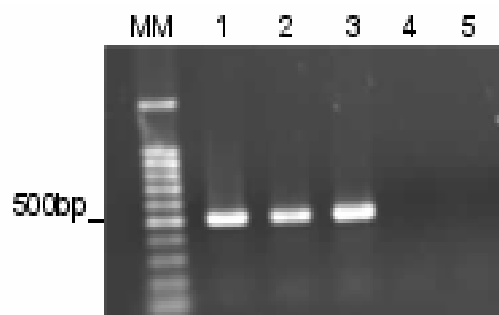
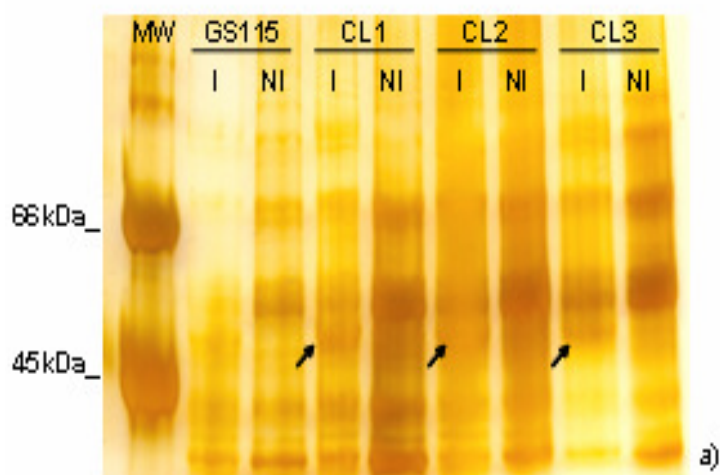


Fig. 4 RT-PCR of the GS115/pPICZL1H16 clones. Lane MM, Ladder 100bp (Promega); lane 1, CL1; lane 2, CL2; lane 3, CL3. Lane 4, reaction negative control. Lane 5, GS115 wild type. The length of the product of RT-PCR for L1 gene is 500bp.

Fig. 5. a) silver nitrate stained SDS-PAGE of the GS115/pPICZL1H16 clones and GS115 wild type *P. pastoris*. I, induced with methanol; NI, non induced with methanol. Arrows indicate the band (~55 kDa) referent to L1 protein. Note that in the GS115 wild type (I and NI) this band is not seen. b) Dot Blot using anti-His tag was performed to verify the expression of L1 protein expressed linked to a 6 histidine tag. The total protein was extract of the CL1 clone and GS115 wild type and appropriately diluted before applied on the membrane. The Dot Blot was revealed by peroxidase reaction. C-, GS115/pPICZL1H16 protein extract hybridized only with secondary antibody



[] protein	GS115/ pPICZL1H16	C-	GS115 Wild type
1:20			
1:40			
Anti-His			

4. Discussion

Traditionally most prophylactic vaccines for human viruses have consisted of live attenuated or inactivated virus. In the case of papillomavirus, due to the lack of a virus production system or proteins from natural sources to vaccine development the molecular cloning of the papillomavirus genes have been employed as a suitable source. Papillomavirus like-particles (VLPs) made from the major capsid L1 protein alone have been proven to induce protective immunity in animal model and L1-only VLPs are currently in clinical use [16]. A variety of expression systems have been investigated for expression of papillomavirus capsid protein as potential systems for producing vaccines. Typically, overexpression of proteins in bacteria may yield inappropriately folded and/or glycosylated proteins [13]. To overcome these problems a variety of expression systems have been devised [13]. All these recombinant cell expression systems require stringent purification and sterile protocols to obtain sufficient papillomavirus L1 antigen [14]. Therefore, these processes are very expensive for developing countries that urgently require these vaccines [17].

P. pastoris is a methylotrophic yeast, capable of metabolizing methanol as its sole carbon source. The first step in the metabolism of methanol is the oxidation of methanol to formaldehyde by alcohol oxidase enzyme using oxygen. Two genes code for alcohol oxidase, *AOX1* and *AOX2*. The majority of alcohol oxidase activity in the cell is attributable to the product of the *AOX1* gene which expression is controlled at the level of transcription. In methanol-grown cells approximately 5% the polyA+ RNA is from the *AOX1* gene, and growth on glucose represses transcription, even in the presence of the inducer methanol. The loss of the *AOX1* gene, and thus loss of most of alcohol oxidase activity in the cell, results in a strain that is phenotypically Mut^S (Methanol utilization slow) [14,18]. As a eukaryote, *P. pastoris* have many advantages of the of eukaryotic expression systems, such as protein processing, protein folding, and posttranslational modification, while being as easy to manipulate as *E. coli* or *S. cerevisiae*. As a yeast, it shares the advantages of molecular and genetic manipulations and presents advantages over *S. cerevisiae* in respect to recombinant expression protein levels and therapeutic use of the produced proteins. *P. pastoris* can produce 10-100-fold more heterologous protein and do not adds core terminal oligosaccharides α 1,3 glycan linkages, which are believed to be primarily responsible for the hiper-antigenic nature of the recombinant proteins, making them particularly unsuitable for therapeutic use [14,19].

In this paper we described the use of a recent expression system based on *P. pastoris* yeast cells to express L1 papillomavirus protein as a first step to a vaccinal strategy based on VLPs against papillomavirus infection in human and animals. Initially we have constructed the expression vector pPICZL1H16 containing the L1 gene of HPV-16 by amplification with specific primers where the L1 gene have the initial ATG codon as part of a yeast Kozak consensus sequence [20] in order to improve the translation of L1 protein. The L1 gene produced by PCR was cloned into pGEM-T easy vector and subcloned in frame with a his tag into the pPICZA expression vector for *P. pastoris* cells transformation. Although spheroplasting have been used for yeast transformation, it is not recommended for transformation of *Pichia* with plasmids with zeocin resistance genes, because this method does not allow direct selection on zeocin containing plates [14]. Therefore we have used the LiCl transformation technique that showed good results, producing 40 recombinant clones selected by zeocin resistance. All the clones obtained has shown the Muts phenotype, since they grow slowly in the presence of methanol and have presented a unique band after colony PCR with *AOX1* primers. However, this is not an impairing characteristic, since the final yield of heterologous protein production can be even higher in Muts strains of *P. pastoris*.

After induction by methanol we have checked the transcription of the L1 gene of recombinant clones by RT-PCR, since in *Saccharomyces* was already verified the premature termination of transcription in TA rich sequences such as TTTTATA, that resembles a sequence in HIV-1 gp 120, which resulted in premature termination of the mRNA when expressed in *Pichia* [14]. The RT-PCR analisys has confirmed that all 40 recombinant clones were positive for L1 gene mRNA transcription. The first clones (CL 1-3) were grown on glycerol and after induction by methanol the L1 protein was detected in the appropriated apparent size (~55kDa) in the electrophoresis gel. The 6-his tag fused to the L1 protein was used to confirm the identity of the produced protein by Dot blot analisys using an anti-his antibody.

The data presented in this work confirm the viability of the *P. pastoris* cells system to papillomavirus heterologous protein production, specially the capsid proteins that are natural candidates for the development of a vaccinal strategy against papillomavirus infection based on VLPs. The next steps will be to select the best producing clones, to standardize and scale up the production of L1 protein in fermenters, and after purification to analyze the ability of this heterologous protein to assemble in VLPs and, finally, to perform immunogenic analysis.

Acknowledgements

This research was supported by a research grant from the following Brazilian agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de Pernambuco (FACEPE), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

References

- [1] J. Doorbar, Journal of Clinical Virology **32**:7-15 (2005).
- [2] M.E. Scheurer, G. Tortolero-Luna, and K. Adler-Storthz, International Journal of Gynecology Cancer **15**:727-746 (2005).
- [3] X.F. Yang, X.Z. Qui, K. Wang, Acta Biochimica et Biophysica Sinica, **37**(11), 743 (2005).
- [4] M.S. Campo, Virus Research, **89**, 249 (2002).
- [5] R.C. Stocco dos Santos, C.J. Lindsey, O. Ferraz, J.R. Pinto, R.S. Mirandola, F.J. Benesi, E.H. Birgel, C.A. Pereira, W. Beçak, Journal of General Virology **79**, 2127 (1998).
- [6] M.S. Campo, Veterinary and Comparative Oncology **1**, 3 (2003).
- [7] D.M. Da Silva, G.L. Eiben, S.C. Fausch, M.T. Wakabayashi, M.P. Rudolf, M.P. Velders, and W.M. Kast, Journal of Cell Physiology **186**:169-182 (2001).
- [8] J.A. Berzofsky, J.D. Ahlers, J. Janik, J. Morris, S. Oh, M. Terabe, I.M. Belyakov, Journal of Clinical Investigation **114**(4), 450 (2004).
- [9] J.J. Carter, N. Yaegashi, S.A. Jenison, D.A. Galloway, Virology **182**(2), 513 (1991).
- [10] Y.F. Xu, Y.Q. Zhang, X. M. Xu, G.X. Song, Archives of Virology **151**(11), 2133 (2006).
- [11] C.D. Harro, Y.Y. Pang, R.B. Roden, A. Hildesheim, Z. Wang, M.J. Reynolds, T.C. Mast, R. robinson, B.R. Murphy, R.A. Karron, J. Dillner, J.T. Shiller, D.R. Lowy, Journal of National Cancer Institute, **93**(4), 252 (2001).
- [12] D. Nardelli-Haeffliger, D. Wirthner, J.T. Schiller, D.R. Lowy, A. Hildesheim, F. Ponci, P. De Grandi, Journal of National Cancer Institute, **95**(15), 1128 (2003).
- [13] C.L. Morton, and P.M. Potter, molecular Biology **16**, 193 (2000).
- [14] R. Daly and T.W. Hearn, Journal Molecular Recognition, **18**, 119 (2005).
- [15] J. Sambrook, E.F. Fritsch, and T. Maniats (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2.ed.
- [16] M. Stanley, D.R. Lowry, and I. Frazer, Vaccine **S3**, 106 (2006).
- [17] J.M. Agosti, and S.J. Goldie, New England Journal Of Medicine **356**, 1908 (2007).
- [18] S. Macauley-Patrick, M.L. Fazenda, B. McNeil, and L.M. Harvey, Yeast **22**, 249 (2005).
- [19] F.A.G. Torres and L.M.P. Moraes, Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento **29**, 20 (2002).
- [20] M.A. Romanos, C.A. Scorer, and J.J. Clare, Yeast **8**, 423 (1992).
- [21] R.D. Gietz, and R.H. Schiestl, (1996) Transformation of Lithium-Treated Yeast Cells and the Selection of Auxotrophic and Dominant Markers. In Methods in Molecular Biology (I.H. Evans, ed) Humana Press, Totowa, NJ.

5. INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

5.1. Detalhamento da metodologia utilizada

5.1.1. Transformação bacteriana

Células *Escherichia coli* DH5 α foram transformadas pelo sistema de cloreto de cálcio (Sambrook *et al*, 1989) com o plasmídio pBR322, contendo o genoma do HPV-16 (pBR322H16). A linhagem a ser transformada foi inoculada em 50 mL de meio LB para crescimento por 16 horas a 37°C, com agitação. Após este período, realizou-se o ré-inóculo com 1 ml da cultura em novo erlenmeyer contendo 500ml de LB para crescimento a 37°C, com agitação até atingir uma DO A600 de 0,5. Uma alíquota de 250ml de cultura foi centrifugada a 5000rpm por 5 min, e 0°C. O pellet obtido foi ressuspensionado em 30ml de solução gelada de CaCl₂ (100mM) e incubado no gelo por 30min. Nova centrifugação a 5500rpm por 7min foi realizada para ressuspensão das células em 5ml de solução CaCl₂ 100mM, 15% de glicerol bem gelados. Alíquotas de 250 μ l de células competentes foram armazenadas em freezer -80°C. Para a transformação, 0,5 μ g de DNA, 25 μ l de tampão de transformação e 50 μ l das células competentes foram incubados no gelo por 30min com posterior choque térmico a 42°C por 5min. Após 1min no gelo foi acrescentado 800 μ l de LB para recuperação das células por 1 hora a 37°C. Placas com LB + ampicilina (100 μ g/ μ l) foram semeadas com 100 μ l das células e deixadas a 37°C, por 16-24 horas para crescimento dos transformantes.

5.1.2. Mini-extração Plasmidial (lise alcalina)

Os recombinantes foram analisados quanto à presença do vetor pBR322H16, através de miniprep e digestão (figura 1) com enzima BamHI (Fermentas) que libera o genoma viral.

Para extração plasmidial foi usado o protocolo de Sambrook, 1989. A cultura foi crescida a 37°C em 20 ml de meio LB + antibiótico por 16 horas. Após este período foi feita uma centrifugação da cultura em tubo de 1,5ml, por 1min, 4°C a 12000rpm. Depois

de obtido o pellet bacteriano, o mesmo foi ressuspensionado em 100µl da Solução I gelada (glicose 50mM, Tris-HCl 25mM pH 8, EDTA 10mM pH 8) para dispersão em vórtex e posteriormente, misturado por inversão com 200µl da SoluçãoII (NaOH 0,2N e SDS 1%) para lise das células. A SoluçãoIII (acetato de potássio 5M, ácido acético glacial e água destilada) foi adicionada (150µl) para precipitação de proteínas e DNA genômico no tubo que foi mantido no gelo por 3-5min. Logo após, realizou-se uma centrifugação a 12000rpm por 5min e 4°C. para recuperação do sobrenadante em um novo tubo. Foi acrescentado 2 volumes de etanol a temperatura ambiente e misturado por vórtex para precipitação a -80°C, por 30min. Uma centrifugação a 12000rpm, 15min e 4°C foi realizada para remoção do sobrenadante e obtenção do pellet, que foi adicionado de 1 ml de etanol 70% gelado para lavagem através da centrifugação por 5-10min. Após remoção do sobrenadante e secagem do pellet na estufa (37°C), ele foi ressuspensionado em 50µl de TE (pH 8) ou água MilliQ, contendo RNase (20µg/ml) para estoque a -20°C.

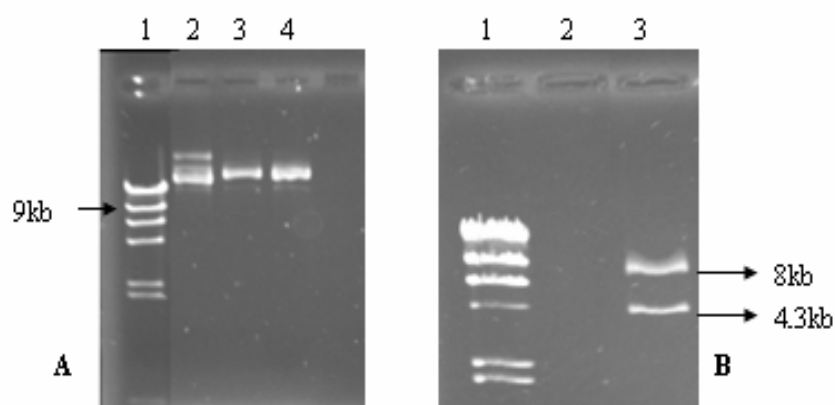


Figura 1. Extração e digestão de plasmídeo PBR322H16. A- extração de plasmídeo; poço 1: marcador lambda Hind III, poço 2, 3 e 4: PBR322H16. B- digestão de PBR322H16 com BamHI; poço 1: marcador lambda Hind III; poço 3: genoma viral (8kb) e plasmídeo PBR322 (4,3kb).

5.2. Amplificação do Gene L1 de HPV-16 por PCR

Após a digestão e confirmação da presença do genoma viral de HPV-16 nos clones, submetemos o material a uma amplificação com *primers* específicos.

5.2.1. Desenho de primers para a amplificação do gene L1 de HPV-16

As seqüências do genoma de HPV-16 (8kb) e do gene L1 (1,5kb) foram obtidas através do banco de dados do site NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, www.ncbi.nlm.nih.gov). Para analisar a complementaridade e eficiência dos primers direto (*forward*) e reverso (*reverse*) na seqüência do gene desejado, foi utilizada a ferramenta *Oligo Analyser* do site www.idtdna.com e o programa Gene Runner (www.generunner.com). O resultado mostrou que a seqüência dos primers *forward* e *reverse* não apresentavam incompatibilidades interferentes no pareamento.

Para facilitar a clonagem dos produtos amplificados por PCR, foram incluídos nas extremidades dos primers, sítios para as enzimas de restrição *KpnI* (primer direto) e *SalI* (primer reverso) compatíveis com o vetor de expressão pPICZ (Invitrogen). Também foi adicionada, na região inicial (ATG) do primer direto, a seqüência consenso de Kozak (A/YAA/TAATGTCT) para expressão em leveduras, como mostra a tabela 1.

Tabela 1. Seqüência de nucleotídeos dos primers para amplificação do gene L1 de HPV-16.

Primer	Seqüência 5' - 3'
<i>Forward</i>	GGTACC* <u>AWAATGTCT*</u> CTTTGGCTGCCT
<i>Reverse</i>	GTCGAC** CAGCTTACGTTTTTTGCG

* Sítios de restrição para *KpnI** e *SalI*** em negrito

* Seqüência consenso de reconhecimento do início de tradução em leveduras

5.2.2. PCR de L1

O resultado esperado da amplificação seria uma banda de 1500pb correspondente ao gene L1 (Figura 2), mas a análise em gel de agarose 0,8% mostrou que o DNA não havia sido amplificado.

Genoma viral HPV 16

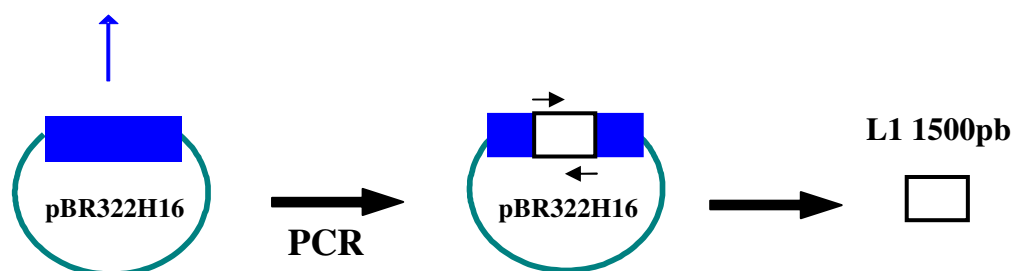


Figura 2. Esquema da PCR do gene L1.

5.2.3. Análise do gene L1 para o sítio BamHI

A enzima BamHI foi utilizada para clonar o genoma de HPV-16 no plasmídeo PBR322. Com base no resultado obtido da PCR de L1, foi feita uma análise do genoma viral de HPV-16 usando o programa *on line* Web Cutter 2.0 para avaliar a presença do sítio de restrição para a enzima *Bam*HI, sendo encontrado um único sítio (Tabela 2). A ORF de L1 inicia na posição 5559 e termina na posição 7154 do genoma de HPV-16. Nesta ORF foi detectado o sítio de restrição para *Bam*HI.

Tabela 2. Localização do sítio de *Bam*HI (**GGATCC**) no genoma de HPV-16.

Nome da enzima	Número de cortes	Posição do sítio	Sequência de reconhecimento
BamHI	1	6150 pb	g/gatcc
(6138pb) CACTGGGGCAAAG GGATCC CCCATGTACCAATGTTG (6171 pb)			

Sendo assim, o genoma de HPV-16 foi linearizado e clonado no plasmídio pBR322, através do corte dentro da ORF de L1. Conseqüentemente, na amplificação do gene, os primers se anelaram de modo a amplificá-lo juntamente com o vetor pBR322 (cerca de 5800pb), como mostra a figura 3.

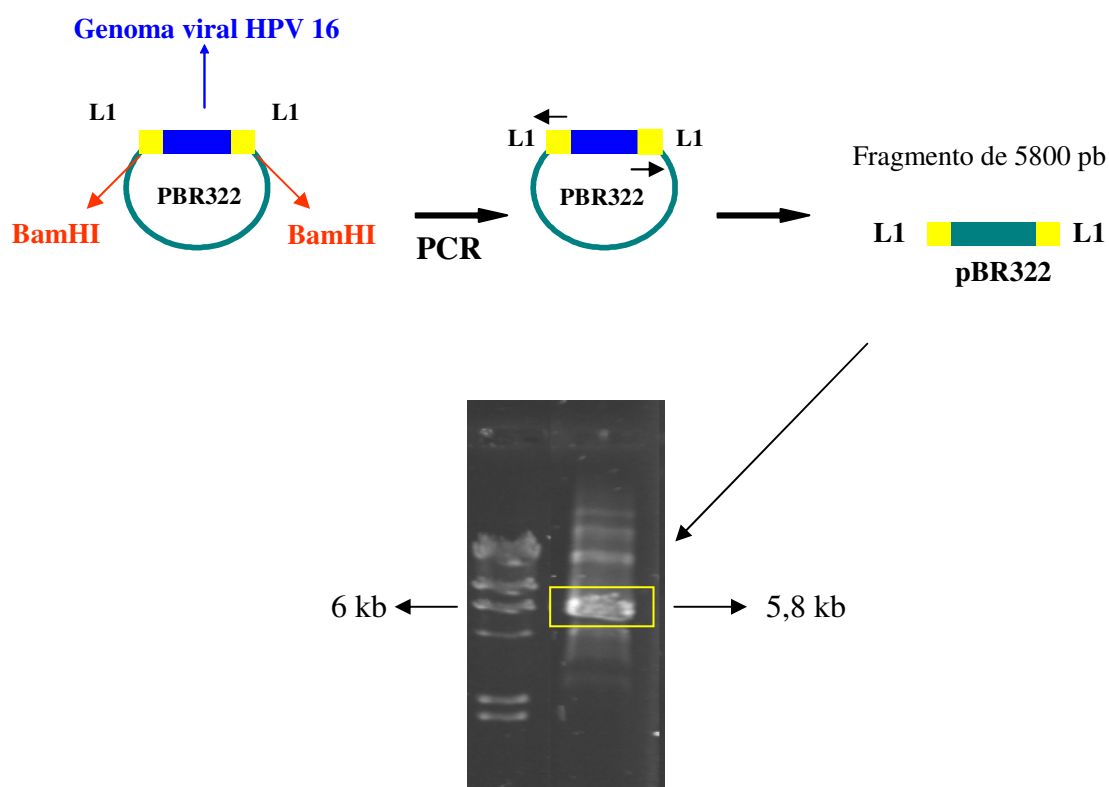


Figura 3. Descrição esquemática do problema da não amplificação de L1

5.2.4. Nova estratégia para amplificação do gene L1

Com o objetivo de promover a amplificação do gene L1, a estratégia encontrada foi isolar, purificar e recircularizar o genoma viral de modo a reconstituir a ORF de L1 (Figura 4), antes de realizar a reação de PCR.

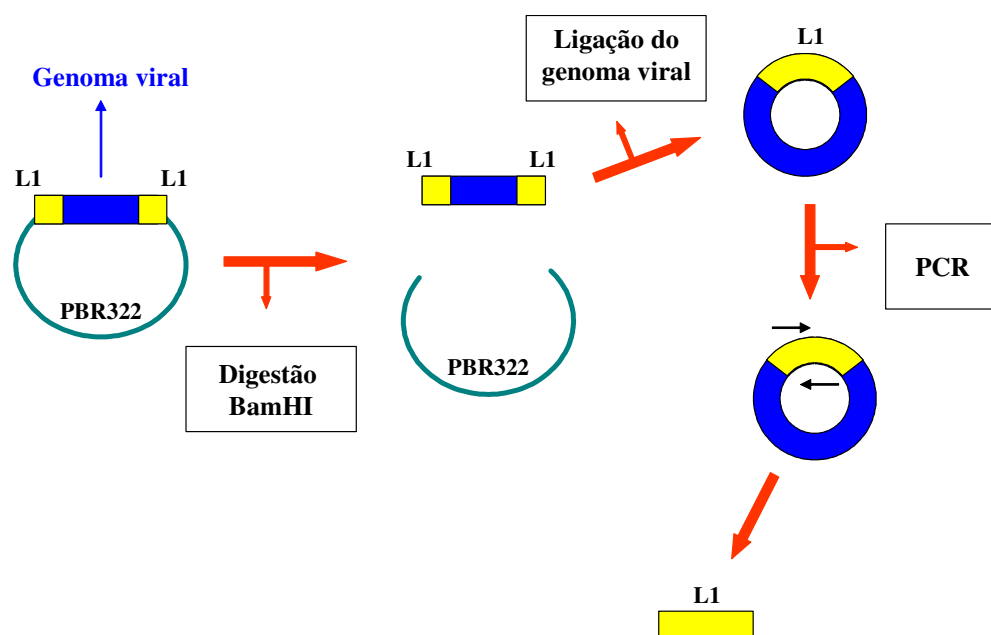


Figura 4. Estratégia para amplificação do gene L1 de HPV-16.

5.2.5. Purificação do genoma viral de HPV16

Para a purificação do genoma do vírus (8kb) foi realizada a digestão do pBR322H16 com a enzima *Bam*HI (Fermentas), com a finalidade de liberar o genoma viral e após separação em gel de agarose (0,8%) a banda de 8kb foi excisada e purificada por meio do uso do kit *QIAquick Gel Extraction* da Qiagen. Na Figura 5 é apresentado um gel de agarose 0,8% no qual se observa uma banda de 8kb correspondente ao genoma viral purificado.

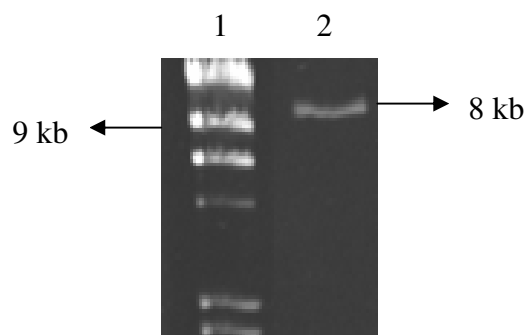


Figura 5. Genoma do HPV16 purificado. 1- Marcador lambda Hind III; 2- Banda correspondente ao genoma de HPV16 (8kb) purificado

5.2.6. Ligação do genoma viral

Obtido o genoma viral purificado, este foi submetido à recircularização via reação de ligação (usando a enzima T4 Ligase, Invitrogen) seguindo o protocolo descrito pelo fabricante, com os componentes apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Composição da reação de ligação do genoma de HPV16

Reagente	Volume
DNA plasmidial	15µL
Enzima ligase 10u µL	0,5µL
Tampão 10x	4µL
Água	0,5µL
Total	20µL

Quando a reação de ligação (ligase, DNA recircularizado, tampão) foi usada diretamente como template, a taq de alta fidelidade, *Tripple Master* (Invitrogen), não amplificou o gene L1. Portanto, foi necessária a purificação da reação com o Kit *QIAquick PCR Purification* (Qiagen) para que a amplificação ocorresse.

5.3. Construção do vetor de expressão pPICL1H16

5.3.1. Clonagem do gene L1 no vetor pGEM-T Easy

O gene L1, após PCR com taq *Tripple Master* (Eppendorf) e purificação com o uso do kit *QIAquick Gel Extraction* (Qiagen), foi clonado no vetor pGEM-T Easy (Promega). Os clones foram obtidos por transformação com CaCl₂ (Sambrook *et al*, 1989), selecionados em meio LB (com X-GAL, IPTG, ampicilina) e analisados quanto à presença do inserto por miniprep (Sambrook, 1989), seguida de digestão com a enzima que flanqueia o gene (*EcoRI* - Fermentas) e PCR com os *primers* de L1 (figura 6).

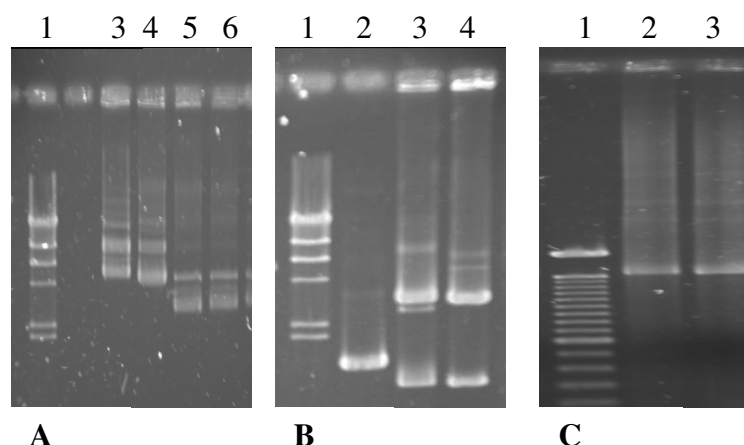


Figura 6. Extração, digestão e PCR de pGEMLIH16. A – Extração plasmidial: poço 1, marcador lambda Hind III; poços 3 e 4, pGEM com inserto L1; poços 5 e 6, pGEM sem inserto. B – Digestão pGEMLIH16; poço 1, marcador lambda Hind III; poço 2, gene L1 como controle (1,5 kb); poços 3 e 4, pGEM (3 kb) e L1 (1,2 kb). C – PCR de L: poço 1, marcador 100 pb; poços 2 e 3, gene L1 amplificado (1,5 kb).

A digestão do pGEMLIH16 deu origem a um fragmento de 1,2 kb, com aproximadamente 300 pb deletados. Isto ocorreu porque o gene possui um sítio de restrição para *EcoRI* no fim da sua ORF.

5.3.2. Subclonagem de L1 no vetor pPICZA

Após confirmação da construção pGEMLIH16 em *E.coli* DH5 α , foi realizada uma extração com o kit *QIAprep Spin Miniprep* (Qiagen) para posterior amplificação, purificação e digestão de L1 com as enzimas *KpnI* (Fermentas) e *SalI* (Fermentas). Paralelamente, o vetor pPICZA (Invitrogen) também foi digerido com as mesmas enzimas após sua extração pelo kit *QIAprep Spin Miniprep* (Qiagen) e purificação pelo kit *QIAquick Gel Extraction* (Qiagen). Os produtos purificados foram ligados com uso da enzima T4 ligase (Promega) e transformados por CaCl₂ (Sambrook *et al*, 1989). A análise dos clones foi feita através de extração plasmidial (Sambrook, 1989), digestão com as respectivas enzimas e PCR do gene L1.

5.3.3. Transformação da levedura *Pichia pastoris* com pPICL1H16

Os clones com a construção pPICL1H16 foram submetidos à extração com o kit *QIAprep Spin Miniprep* (Qiagen), para obtenção de, 5µg/µl (no mínimo) de DNA e posterior linearização com a enzima *SacI* para transformação da levedura *Pichia .pastoris* pelo sistema de cloreto de lítio (Invitrogen). A análise dos clones foi feita por crescimento em meio YPD com 100µg/ml de zeocina, e PCR de colônia (Linder *et al.*, 1996).

5.3.4. PCR de colônia

A PCR para detecção foi feita diretamente dos clones crescidos em placa. Uma colônia foi misturada a 10µl de água e 5µl de enzima lyticase (5U/ µl) para incubação a 30°C, por 10 min. Depois de incubada, a amostra foi colocada a -80°C por 10 min. Uma alíquota de 5µl das células foi utilizada para a reação de PCR como mostra a tabela 4.

Tabela 4. Reação de PCR direta de colônia

Reagente	Volume
Células lisadas	5µL
5´ AOX1 primer (10 pmol/uL)	1µL
3´ AOX1 primer (10 pmol/uL)	1µL
Tampão 10x	5µL
MgCl ₂ (25mM)	5µL
dNTP (25mM)	1µL
Água	27µL
Total	45µL

A reação foi incubada a 95°C por 5 min e depois adicionada de 5µL de 0,16 U/µL de *Taq* polymerase (0,8 units). O programa utilizado apresenta 30 ciclos: 95°C de desnaturação (1 min), 54°C de anelamento (1min) e 72°C de extensão (1min), incluindo extensão final de 7 min.

Além dos primers AOX, listados na tabela 5, a reação também foi feita utilizando-se os primers para L1.

Tabela 5. Primers para amplificação de região AOX.

Primer	Seqüência 5' - 3'
3' AOX1 Pichia	5' GCAAATGGCATTCTGACATCC 3'
5' AOX1 Pichia	5' GACTGGTTCCAATTGACAAGC 3'

5.4. Análise da expressão da proteína L1

5.4.1. Fermentação dos clones e indução da expressão do gene L1

Foram selecionados 3 clones de *Pichia pastoris* e a linhagem GS115 sem o inserto, para os ensaios de fermentação, que seguiram o protocolo apresentado no manual *EasySelect. Pichia Expression Kit* (Invitrogen). As colônias foram inoculadas em meio MGH - *Minimal Glicerol Médium Histidine* (1,34% YNB, 1% glicerol, 0,00004% biotina, 0.004% histidina) ou BMGH - *Buffered Minimal Glicerol Médium Histidine* (mesma composição do MGH, mas acrescentado de tampão fosfato de potássio 100mM, ph. 6,0) para crescimento por 16-24 horas, a 28-30°C. O volume de meio utilizado foi equivalente a 10% do volume do *erlenmeyer*. Para a indução, a cultura deveria estar numa DO600 de 1-6. Nesta fase, o meio com glicerol era retirado, por centrifugação (3000xg, 5 min, temperatura ambiente) e as células ressuspensas em meio com metanol MMH - *Minimal Methanol Histidine* (1.34% YNB, 0,00004% biotina, 0.5% metanol) ou BMMH - *Buffered Minimal Methanol*. A indução foi feita a cada 24 horas de crescimento, com adição de metanol 100% para uma concentração final de 1%. Um volume de 1ml era centrifugado e estocado a -80°C, também a cada 24 horas, para posterior análise em géis de SDS-PAGE 12,5%.

5.4.2. Extração de RNA total dos recombinantes de *P.pastoris*

A extração de RNA dos clones foi feita a partir do método que utiliza fenol ácido, quente. Um volume de 5-10ml de cultura induzida, foi centrifugado a 5000 rpm, por 4 min. O pellet foi ressuspensionado em 600 µl de solução AE (acetato de sódio, 50 mM, pH 5,3 e EDTA, 10mM), e depois passado a um tubo de 1,5ml. À amostra, foram adicionados 40 µl de SDS

25%, levando-se ao vórtex. Rapidamente, foi feita a adição de fenol previamente aquecido a 65°C e equilibrado em tampão AE. Após agitação no vórtex, a amostra foi incubada a 65°C, por 10 min e, posteriormente, congelada a 4°C, por 5min. Foi realizada uma centrifugação de 10000 rpm, por 5 min para recuperação da fase aquosa em novo tubo, à qual foi misturado, por inversão (2-3min), um volume igual de fenol/clorofórmio/isoamílico (25:24:1) a temperatura ambiente. Para nova recuperação da fase aquosa, fez-se uma centrifugação a 14000 rpm por 2 min. Um volume de 1ml de clorofórmio foi agregado para separar as fases, através de centrifugação a 12000 rpm, 2 min. Ao sobrenadante (em novo tubo), foi adicionado 1/10 de acetato de sódio 3M (pH 5.3) e misturado em vórtex. Posteriormente, foram misturados 2,5 volumes de isopropanol para a precipitação do RNA a -20°C e 5 min. A amostra foi centrifugada a 12000 rpm por 10 min, para obtenção do pellet que em seguida, foi lavado 2x com 1 ml de etanol 80% sob centrifugação de 14000 rpm por 5 min. A ressuspensão do pellet foi feita em 5-20 µl de água DEPC, após secagem (não completa) em temperatura ambiente. Alternativamente foi utilizado o método com uso do reagente Trizol (Invitrogen), de acordo com o protocolo do fornecedor.

5.4.3. Síntese de cDNA e RT-PCR

A construção do cDNA foi realizada a partir do *kit SuperScript II* (Invitrogen). Foram utilizados de 1-5µL (1ng-5µg) de RNA e, juntamente com 1µL do primer oligo DT 15 (Promega), incubados à temperatura de 65°C, por 5 minutos e no gelo, por 2 min. Em seguida, foram acrescentados 7µL do tampão (5x), 1µL de DTT, 1µL de RNAsin (40 U/µL), 1µL de Dntp (10mM) e 1µL de Transcriptase reversa para incubação a 42°C, por 1 hora, e 70°C, por 15 min.

A amplificação foi feita através da RT-PCR (*Reverse-Transcriptase Polimerase Chain Reaction*), utilizando-se 2 µl de cDNA, 15,5 µl de H₂O, 2,5µL de tampão (10x), 1µL de dNTP (2mM), 1µL de MgCl₂ (50mM), 0,5µL de Taq DNA Polimerase (5U/µL) e 1µl (10pmol/µl)

de cada primer, para um volume final de 25 µl de reação. Os primers utilizados foram construídos com base na sequência interna do gene L1, resultando em um produto de amplificação de 500 pb.

5.4.4. Avaliação da expressão de L1 através de Dot Blot

Os 3 clones analisados e positivos quanto à transcrição de L1, foram inoculados para uma nova indução e análise da expressão da proteína recombinante por Dot Blot. O crescimento foi realizado nas mesmas condições descritas do item 4.1.

5.4.4.1. Padronização Dot Blot

Nos testes para otimização do Dot Blot, foram usados os anticorpos anti-penta-His e anti-tetra-His, ambos da Qiagen e um anticorpo (IgG total) secundário conjugado à peroxidase (Sigma). Inicialmente, foram feitos vários testes de concentrações só com o anticorpo primário (1/10, 1/50, 1/100, 1/200, 1/500 e 1/1000) e o anticorpo secundário (1/400, 1/800, 1/1000, 1/1600, 1/2000, 1/5000, 1/10000). Foi observada que a interação entre os dois era melhor quando o primário estava na diluição de 1/50, 1/100, 1/200 e 1/500, com o secundário diluído de 1:800, 1/1000 e 1/1600. Os substratos testados foram o DAB (Sigma) e o TMB (sigma), com este último apresentando melhor sensibilidade.

Os primeiros testes de concentração e interação antígeno/anticorpo foram feitos com uma proteína controle constituída de uma cauda de histidina. Foi usado tanto o anticorpo primário tetra-His (figura 7), quanto o penta-His (figura 8).

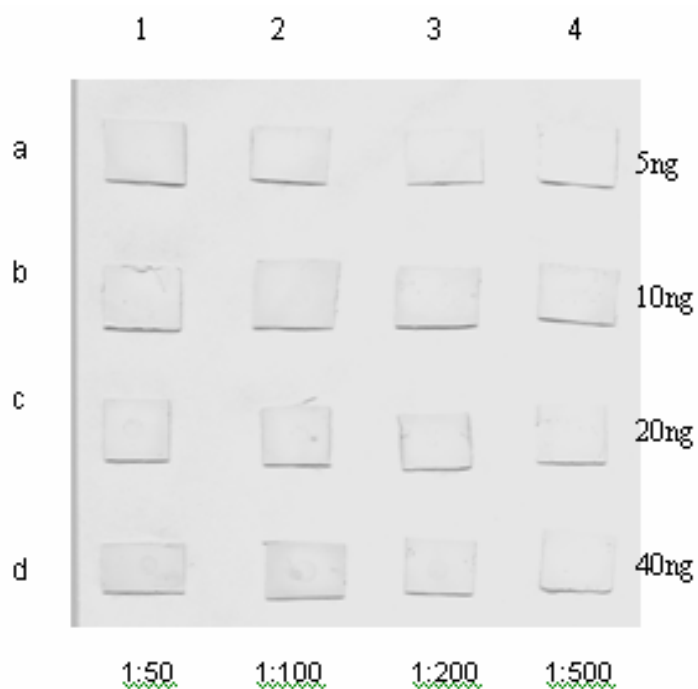


figura 7. Dot blot de proteína com cauda poli-His (controle positivo) e anticorpo primário anti-tetra-His. A proteína foi testada na concentração de 5,10,20 e 40ng (linhas a, b, c e d). A cada coluna (1, 2, 3, 4) foram testadas diluições do 1º anticorpo -1:50, 1:100, 1:200 e 1:500. Diluição do 2º anticorpo: 1:800. As concentrações foram testadas para ambos os anticorpos primários: tetra-His e penta-His.

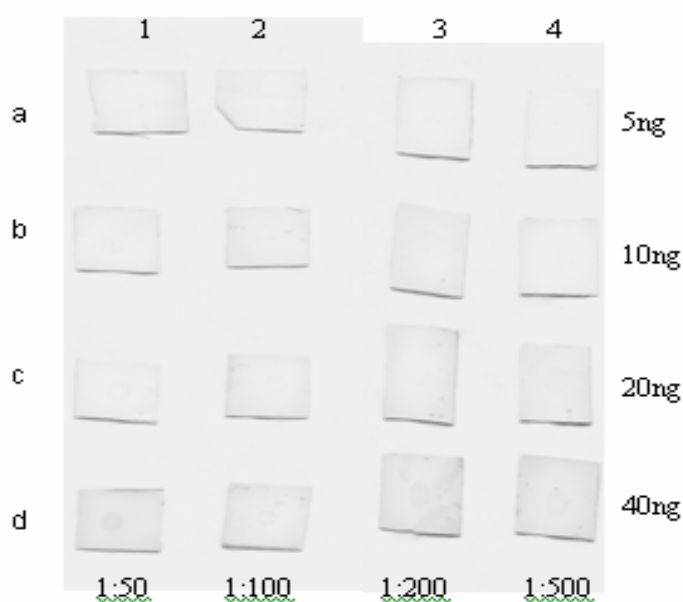


Figura 8. Dot blot de proteína com cauda poli-His (controle positivo) e anticorpo primário anti-penta-His. Mesmas condições da placa com o tetra-His.

Deste primeiro teste vimos que o anticorpo penta-His reagiu melhor se comparado ao tetra-His, apresentando reação apenas onde havia uma concentração de 40 ng da proteína. No entanto, no primeiro ensaio com o extrato protéico intracelular total de um clone induzido (clone1), foram também utilizados o penta-His (figura 9) e o tetra-His (figura 10) para uma melhor comparação.

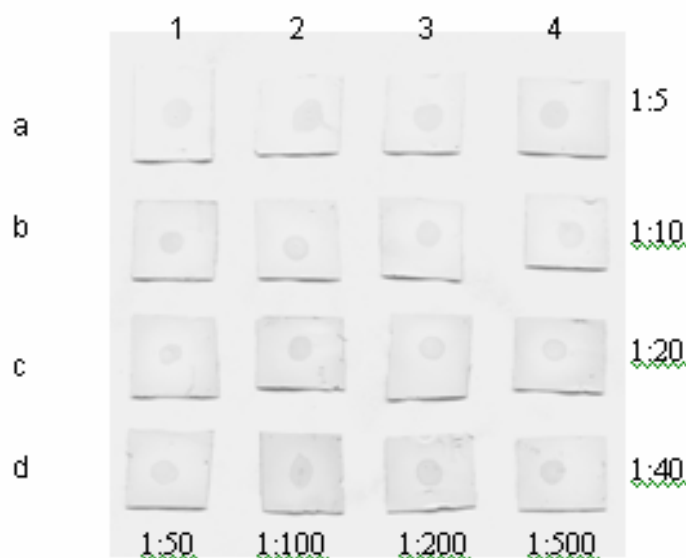


Figura 9. Dot blot de proteína total intracelular do clone1 com anticorpo primário anti-penta-His. O clone foi induzido, em fermentador, com 1% de metanol e o tempo usado no experimento foi de 96 horas. A concentração deste extrato era de 8,543 mg/ml de proteína total. Foram feitas 4 diluições: 1:5, 1:10, 1:20 e 1:40 (linhas a, b, c, d). A diluição do segundo anticorpo foi de 1:800.

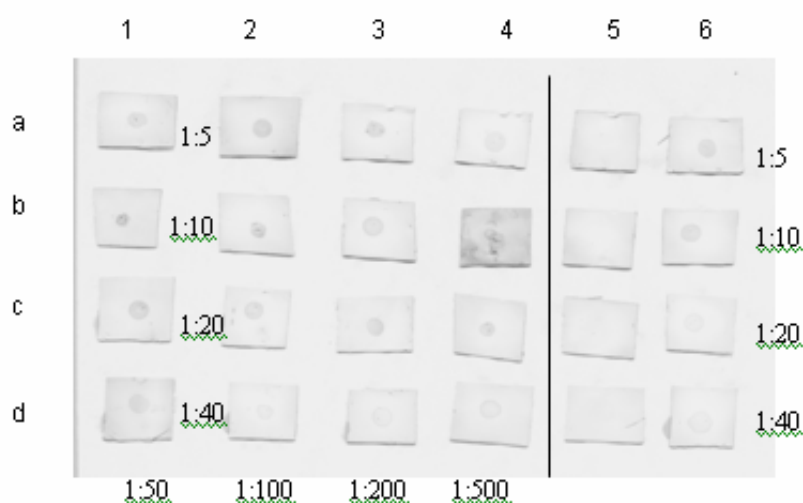


Figura 10. Dot blot de proteína total intracelular do clone1 com anticorpo primário anti-tetra-His. Foram feitas 4 diluições: 1:5, 1:10, 1:20 e 1:40 (linhas a, b, c, d). A diluição do segundo anticorpo foi de 1:800. As colunas 5 e 6 correspondem ao controle negativo ou branco,

equivalente ao extrato ou proteína só com o anticorpo secundário (ausência do primário). Coluna 5: branco da proteína controle com cauda poli-His; coluna 6: branco do extrato protéico do clone1.

Nestes dois últimos experimentos, pôde-se concluir que os dois anticorpos primários reagiram de forma semelhante com as concentrações da proteína. Em relação aos controles negativos, foram observadas reações inespecíficas das proteínas do clone com o anticorpo secundário. No entanto, quanto menor a concentração, menos visível a reação inespecífica. Este tipo de reação não foi observada na proteína usada como controle positivo (proteína poli-His), provavelmente por estar purificada (livre de proteínas interferentes).

Com intenção de reduzir a inespecificidade da reação, um novo ensaio foi realizado com bloqueio do anticorpo secundário que, desta vez, teve sua diluição aumentada para 1:1600. A concentração do bloqueio que era de 1%, foi mantida, mas também foi testado um bloqueio de 2,5%, sem o bloqueio do segundo anticorpo. Foram feitas 3 placas com as mesmas variações de bloqueio e diluição de anticorpos, para o clone1 (figura 11), para a GS115, controle sem inserto (figura 12) e para a proteína poli-His, como controle positivo (figura 13). As amostras do clone1 e da GS115 foram igualadas na concentração protéica (0,4mg/ml) e o anticorpo primário utilizado em todas as reações foi o tetra-His. Adicionalmente, testou-se a ligação do anticorpo secundário às proteínas da levedura (GS115) sem o inserto (figura 14).

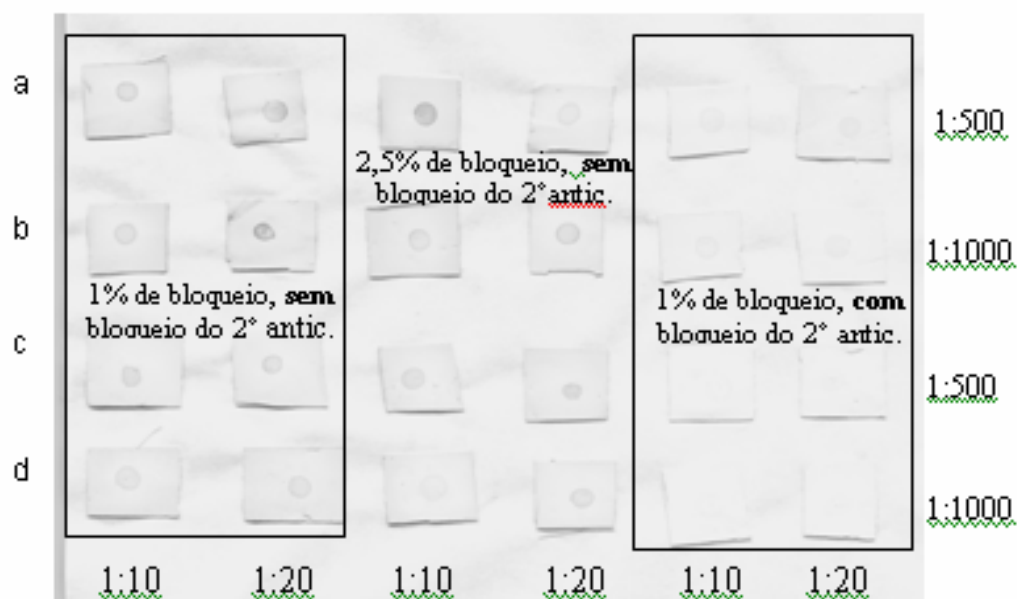


Figura 11. Extrato protéico intracelular do clone1 diluído de 1:10 (0,8mg/ml) e 1:20 (0,4mg/ml). O tempo utilizado foi de 96 horas de indução, em fermentador, com metanol 1%. As diluições para o 1° anticorpo foram de: 1:500 (linhas a, c) e 1:1000 (linhas b, d). As diluições do 2° anticorpo foram de 1:800 (linhas a, b) e 1:1600 (linhas c, d).

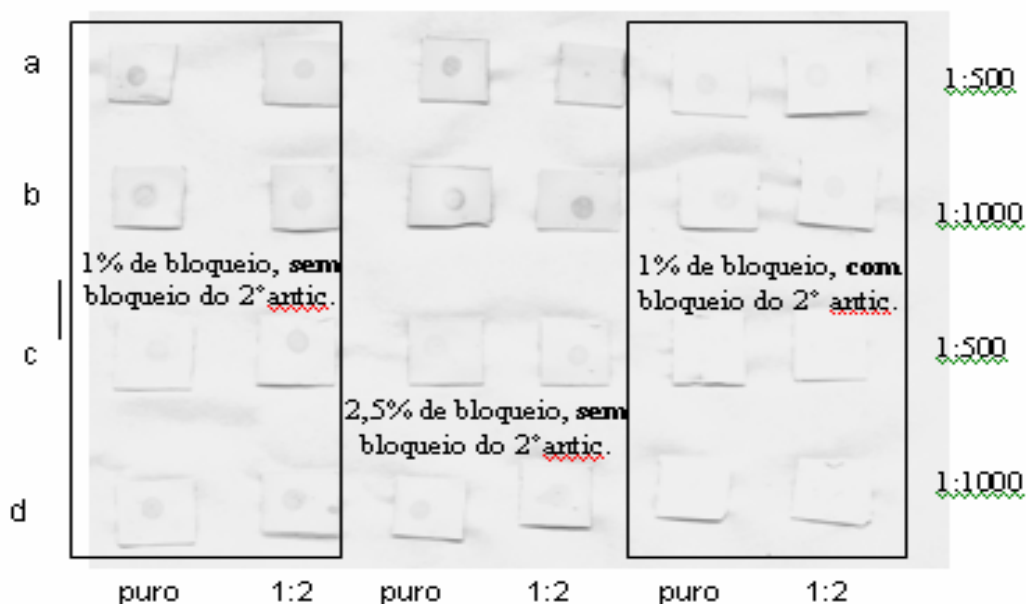


Figura 12. Dot blot de proteína total intracelular do controle negativo GS115. A concentração do extrato puro estava em 0,4mg/ml, o qual também foi diluído de 1:2 (0,2mg/ml). O tempo

utilizado foi de 96 horas de indução, em *shaker*, com 1% de metanol. As diluições para o 1° anticorpo foram de: 1:500 (linhas a, c) e 1:1000 (linhas b, d). As diluições do 2° anticorpo foram de 1:800 (linhas a, b) e 1:1600 (linhas c, d).

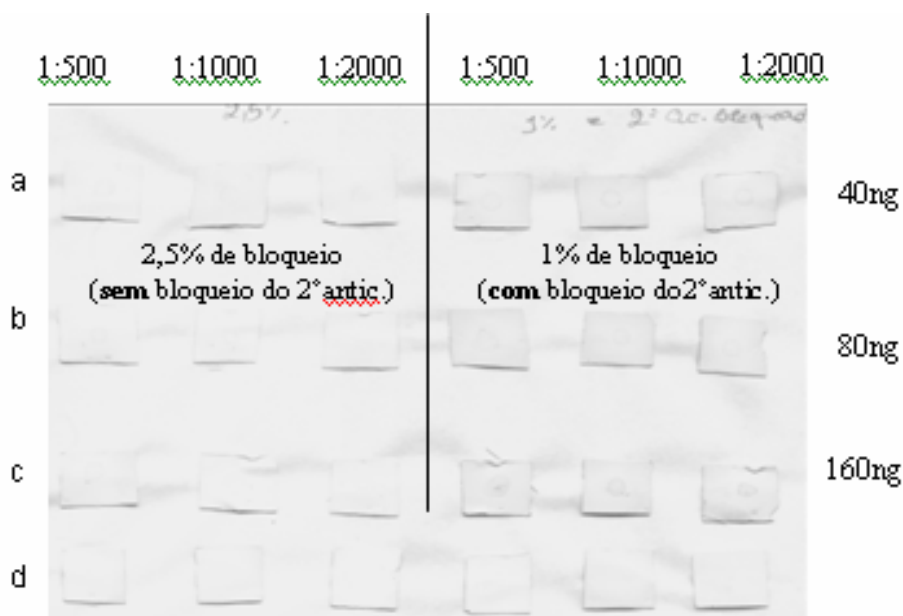


Figura 13. Dot blot de proteína poli-His, controle positivo, em maiores concentrações. As concentrações utilizadas foram de 40, 80 e 160ng (linhas a, b e c). O 1° anticorpo foi usado nas diluições de 1:500, 1:1000 e 1:2000, e o segundo anticorpo, na diluição de 1:1600. A linha d corresponde, apenas, à presença de anticorpo secundário, sendo um controle negativo para confirmar que o mesmo não se liga à membrana de nitrocelulose (bloqueio de 1%).

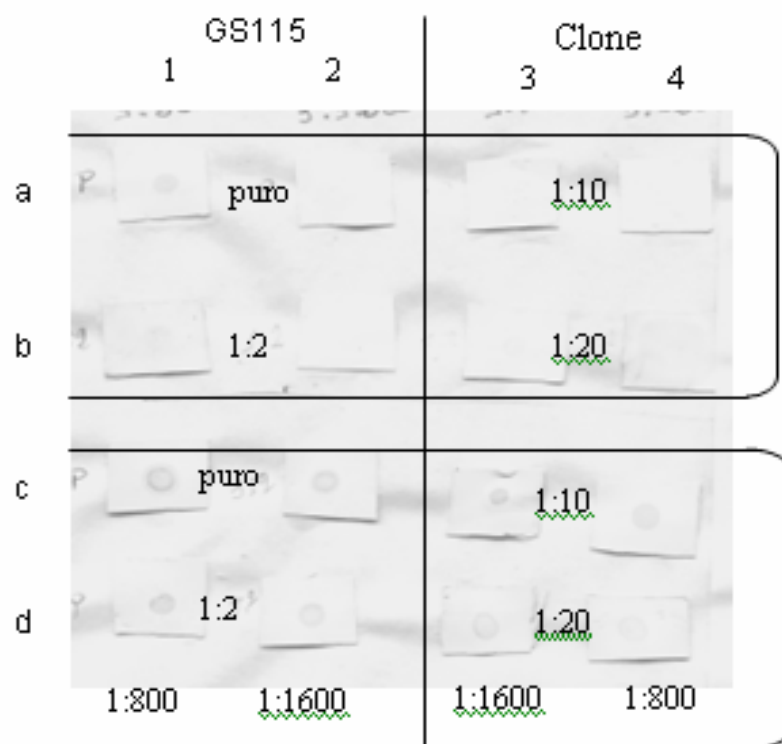


Figura 14. Dot blot de clone 1 e de GS115 com ausência de anticorpo primário, controle negativo. As duas primeiras colunas correspondem (1 e 2) às proteínas da GS115 + anticorpo secundário. E as colunas 3 e 4 apresentam as proteínas do clone1 + anticorpo secundário. O 2º anticorpo está diluído de 1:800 (colunas 1 e 4) e de 1:1600 (colunas 2 e 3). As concentrações do clone estão de 0,8mg/ml (1:10) e 0,4mg/ml (1:20); e as concentrações da GS115 estão de 0,4mg/ml (puro) e 0,2mg/ml (1:2). As linhas a e b apresentam bloqueio de 1% e as linhas c e d, 2,5%.

Com estes resultados, foi possível determinar que os bloqueios de 1% e 2,5% (sem bloqueio do segundo anticorpo) apresentam resultados semelhantes, e que o bloqueio de 1% (com anticorpo secundário bloqueado) resulta em pouca ou nenhuma reação. Os resultados do clone e da GS115 foram semelhantes quando usando o anticorpo primário + secundário. No entanto, na placa do controle negativo, onde foi usado apenas o conjugado com as proteínas, o clone (1:20 ou 0,4mg/ml) apresentou menos reação se comparado a GS115 (puro ou 0,4

mg/ml), nas linhas c e d, respectivamente. Em relação à proteína utilizada como controle positivo (poli-His), sugerimos que ela pode ter sido degradada ou perdido a cauda de histidina (pelo tempo de estoque), já que apresentou pouca ou nenhuma reação.

Pôde-se concluir que o anticorpo secundário reage inespecificamente com as proteínas da levedura. Novos testes com outros anticorpos secundários, como um conjugado (IgG1) à biotina (Sigma), também apresentaram reação inespecífica com as proteínas de *P.pastoris*.

Foi feito um novo crescimento com 3 clones (cada um em duplicata, com uma amostra induzida por metanol e outra não-induzida) e a GS115 (controle negativo, também induzida e não-induzida), para purificação por coluna de níquel com o *Ni-NTA Spin Kit* (Qiagen). Desta vez, o crescimento dos três clones e da GS115 foi feito com um maior número de células (DO₆₀₀ 30-40) em 50 ml de meio, e maior concentração de metanol na indução (2%). O período de indução durou 96 horas. O gel de SDS-PAGE, corado tanto por comassie, quanto por prata, não apresentou a banda esperada (55 kDa) após a purificação.

O material purificado foi submetido a uma diálise e liofilização para realização de um dot blot, onde apenas um clone apresentou o resultado esperado (figura 15). Todavia, mesmo com um material purificado, observou-se reação inespecífica no controle negativo (GS115), o que reforçou a inespecificidade do anticorpo secundário e a necessidade de se utilizar um anticorpo primário anti-His, conjugado.

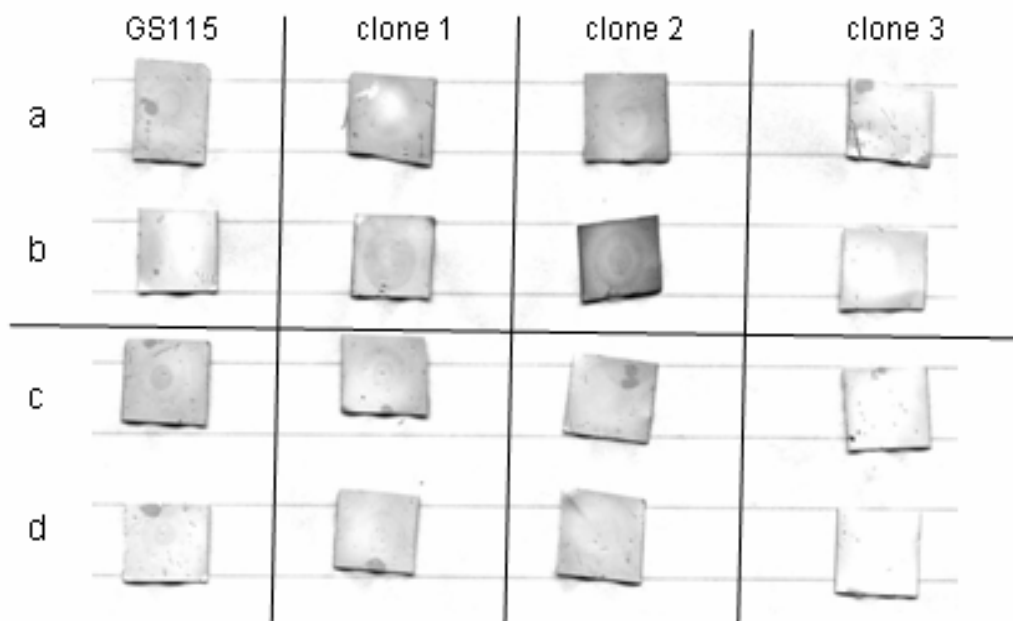


Figura 15. Dot blot de clones 1, 2 e 3, e GS115 purificados por coluna de níquel. As linhas a e b, correspondem ao crescimento com indução, onde apenas o clone 2 apresentou resultado positivo. As linhas b e c, apresentam as amostras não-induzidas, com reações inespecíficas na GS115 e no clone 1.

Com a aquisição de um anticorpo primário, conjugado à fosfatase alcalina (Sigma), foi possível repetir o experimento (figura 16). O crescimento dos três clones e da GS115 foi feito com células na DO₆₀₀ 30-40, em 50 ml de meio, e 2% de metanol na indução. O período de indução durou 96 horas. O protocolo teve como etapas: ligação das proteínas (1,5µl) na membrana por 1 hora; lavagem (1X) com TBS por 5 min; bloqueio com 2,5% de leite por 40 min, lavagem (1X) com TBS por 5 min, adição de Anti-His conjugado a fosfatase alcalina, diluído 1:20.000 em leite 5% com 1 hora de incubação, a 37°C; lavagem (3X) com TBS-Tween (10 min cada) e revelação com NTB/BCIP (diluídos 10x em água). As condições deste protocolo foram otimizadas em um experimento anterior, onde foram testadas diluições do anticorpo (1:10000, 1:20000, 1:30000), concentrações de bloqueio (2,5% e 2,5%; 2,5% e 5%;

5% e 5%) e concentrações das proteínas. Foi obtido um resultado ideal com o clone 1 que apresentava 286 µg/ml de proteína, nas condições do protocolo citado anteriormente.

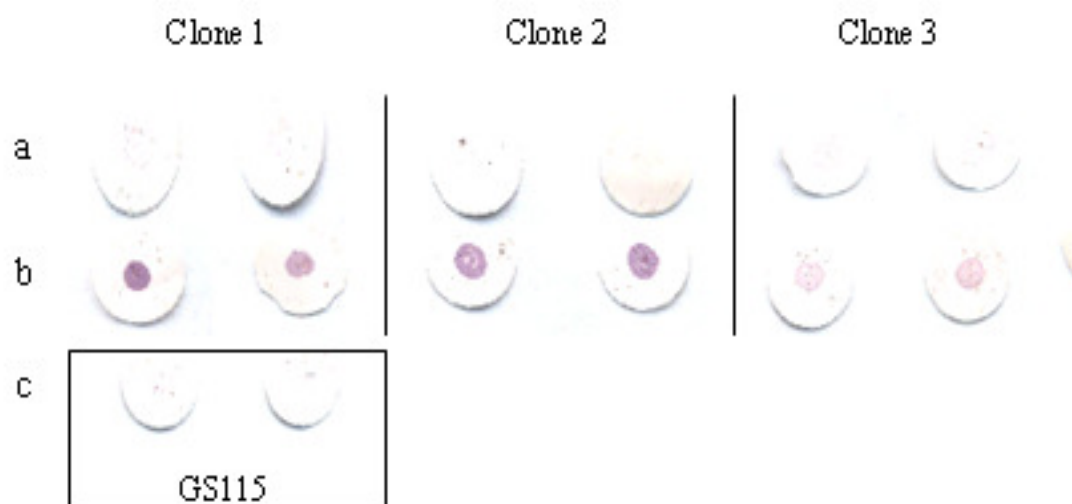


Figura 16. Dot blot de clones 1, 2 e 3, e GS115 com anticorpo primário conjugado. Todas as amostras encontram-se em duplicata e foram igualadas quanto à concentração, que ficou equivalente a 286 µg/ml. A linha a, corresponde aos clones não-induzidos por metanol (controle negativo da expressão), no tempo de crescimento de 96 horas. A linha b, corresponde ao tempo de indução de 72 horas (clone 1), T96 (clone 2) e T72 (clone 3). A linha c corresponde à levedura *P.pastoris* (GS115 sem o inserto L1) no T72 de indução.

Com o resultado deste último dot blot, foi possível verificar que os clones expressam a proteína L1 de HPV-16, visto que, foi utilizado apenas um anticorpo anti-His (conjugado à fosfatase alcalina), eliminando a possibilidade de reações inespecíficas, as quais foram ausentes, pois os controles negativos (GS115 e amostras não-induzidas) permaneceram brancos.

5.5. Detecção da proteína recombinante L1 por Western blot

Foram feitos alguns western blots, com crescimentos dos três clones, em tempos diferentes. No entanto, a transferência de proteínas do gel de SDS-PAGE para a membrana de nitrocelulose não foi tão eficaz, estando em procedimento sua otimização. O melhor resultado obtido é mostrado na figura 18. Neste caso o protocolo seguinte foi utilizado: transferência de 3 horas e 30 min (2 hrs a 120 W e 1:30h a 100W). A membrana foi bloqueada com 2,5% de leite, por 16 horas e logo após foi feita a adição de anticorpo primário tetra-His (diluído 1:1000) para incubação a 37°C, por 2 horas. Posteriormente realizou-se 3 lavagens (10 min cada) com TBS-Tween, e adicionou-se o 2º anticorpo (IgG conjugada a peroxidase), para incubação por 1 hora e 37°C. Após última incubação, a membrana foi submetida a mais 3 lavagens com TBS-Tween, e a reação foi revelada com TMB.

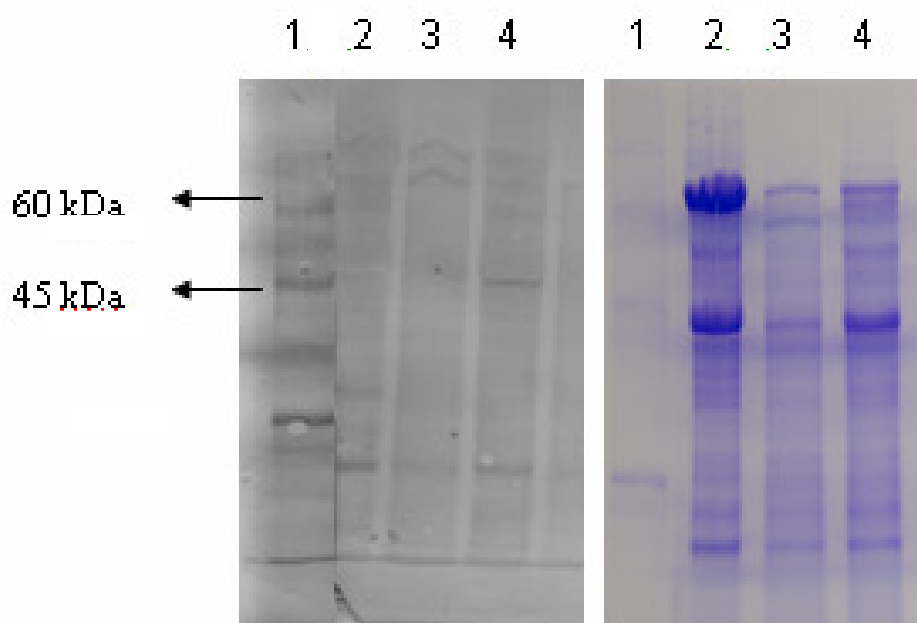


Figura 17. Western blot de proteína total intracelular do clone 1. À esquerda, está a membrana de nitrocelulose com as proteínas transferidas, e à direita, o gel SDS-PAGE (12,5%) correspondente. A linha 1 representa o marcador; a linha 2, extrato protéico de GS115; a linha 3, indução de clone 1 em fermentador (com 1% de metanol); a linha 4, crescimento de clone 1 em *shaker* (também induzido com 1% de metanol).

6. Conclusões

Neste trabalho concluímos que *P. pastoris* constitui um sistema de expressão capaz de produzir a proteína L1 de HPV-16 utilizando o vetor pPICZA, que contém um promotor induzido por metanol (*AOX1*). Porém, para obter maiores níveis de expressão é necessário otimizar o cultivo e/ou o gene heterólogo utilizando o *codon usage* de *P. pastoris*.

7. ANEXOS

7.1. Anexo 1
INSTRUÇÕES PARA AUTORES

Microbiology Book Series
*Communicating Current Research and Educational Topics
and Trends in Applied Microbiology*

Badajoz, Spain

Template for Chapters in “Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology”

A. Méndez-Vilas^{*,1}, and J. Diaz^{1,2}

¹ Department of Applied Physics, Biosurfaces and Interfaces, Universidad de Extremadura, Avda de Elvas s/n, 06071 Badajoz, Spain

² Department of Organic Chemistry, Universidad de Extremadura, Avda de Elvas s/n, 06071 Badajoz, Spain

This document contains a short summary of author instructions for articles to be published in *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. It has been formatted according to the current layout and page size. Each manuscript requires an abstract with a maximum length of about ten lines. A second abstract in another language may be added.

Keywords keyword; keyword

1. General remarks

Submissions to “A General Review of Current Important Research and Educational Topics in Applied Microbiology” should be written in correct English. Please consult a native speaker or a knowledgeable colleague for help, if necessary.

Please submit your manuscript exclusively as **one single Word document** including the entire text as well as all tables and figures. Please note that **papers** must be restricted to a total of 8 or 12 pages for original research or educational papers, and mini-reviews, respectively. Large numbers of figures should be avoided.

2. Title information

The manuscript should begin with the title of the paper in lower case letters except for proper nouns, certain abbreviations, physical quantities etc. It is followed by the names of all authors (with first name initials or full names) and the corresponding institutions (from the smallest to the largest unit, e.g. group, department, and university) with addresses, as given in the above example (street or P.O. box, city with zip codes, country). Countries should be written in English.

Please identify the corresponding author unambiguously and add his/her electronic mail address and, optionally, phone and fax numbers in a footnote. A corresponding address valid for the entire period from submission until publication of the paper must be given either in the manuscript or in an accompanying cover letter. This is especially important in cases where the current address deviates from the author's affiliation in the paper.

Keywords *must* be provided separated by semicolon.

3. Manuscript layout

3.1 File formats and templates

Please prepare your manuscript electronically using Microsoft Word (or compatible formats like RTF). All textual material of the paper (including tables, captions, etc.) should be in a single file. It is essential that you use the provided **template**. Please use the predefined styles for title, authors, abstract, body etc. Please use Times New Roman, Times, Arial, Helvetica, or Symbol fonts as much as possible. Some other fonts (e.g., Asian or Russian character fonts) may cause problems and should be avoided.

Section headings on all (preferably not more than three levels) should be consecutively numbered by decimal numbers as 1, 1.1, 1.1.1 etc.

3.2 Figures and tables

Figures must be carefully prepared and submitted ready for reproduction. Lettering and symbols should be clear and large enough in the final figure size (the typical width of a figure in the proceedings is about 7 cm; smallest letters should not be smaller than 1.5 mm). Avoid small open symbols, small dots, small decimal points, and hairlines, close-dotted or short-dashed lines. Draw a closed axes frame in diagrams with the axis titles (quantity followed by the unit in brackets) parallel to the corresponding axis, outside the frame. For numbers, use a

* Corresponding author: e-mail: microbio@formatex.org, Phone: +34 924258615

decimal point instead of a comma. For symbols and units, avoid writing alpha, Ohm, deg; use Greek and special characters instead: α , Ω , $^{\circ}$.

Table 1 Volumes of the Microscopy book series in 2003 and 2005. A table is usually half-inch indented, unless it is very wide and requires the whole page width.

Year	Volume nos.	Papers per volume	Number of pages
2003	I	51	436
2003	II	49	405
2005	I	35	295

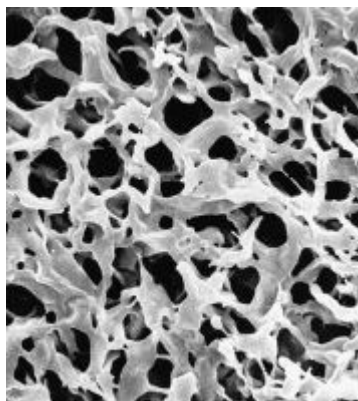


Fig. 1 If a figure is very wide and therefore must span the whole page width, the standard half-inch left indent may be skipped. Please note that the final phrase of the caption ends with a period.

Figures and tables including captions should be embedded in the manuscript file, in order to indicate their appropriate position and required space. Possible arrangements are shown in this document (Figs. 1–4, see also Table 1). Figures may also be submitted as separate files (PS/EPS, TIF, GIF, CorelDraw, Adobe Illustrator, and compatible formats). Please make sure to use only standard fonts (Arial, Times New Roman, Symbol) or include the fonts in the figure file. When composing a figure, avoid using separate drawing elements in Word such as arrows, symbols or letters, since these are often lost if a figure must be extracted from the Word file during typesetting. All elements of a figure should be grouped together as one graphics object.

Halftone figures should have 300 dpi, line drawings 1200 dpi minimum resolution in final size. Screen or web resolution, e.g. JPG-compressed format, is usually insufficient for publication.

In the text, the figures or tables are referred to as “... in Fig. /Table 1” or as “Figure/Table 1 shows ...” at the beginning of a sentence.

Colour figures submitted in electronic format will generally remain in colour in the internet PDF version of an article. The print version will be black/white.

3.3 Quantities, units, and equations

All physical quantities and constants should be given in *italic*, vectors in ***bold italic*** letters (both in the text and in equations). Care should be taken to distinguish subscripts, superscripts, and special symbols. Units should be written in upright letters (not in italics) with a short space to the number before. SI units should be used throughout. Mathematical functions which are tabulated (e.g. sin, cos, exp, e, etc.) should be given in upright letters (not in italics).

Equations may be numbered sequentially. Except for small in-line equations, they should appear on separate lines, such as

$$G = \frac{a+b}{i \cos a} \sum_{i=1}^{\infty} b_2 b_1 + \frac{a+b}{i \cos a} \sum_{i=1}^{\infty} b_2 a^n a^n . \quad (1)$$

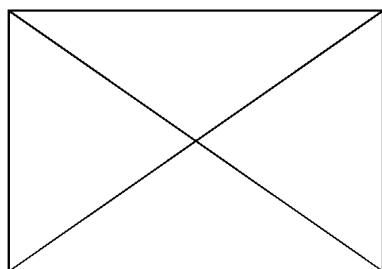
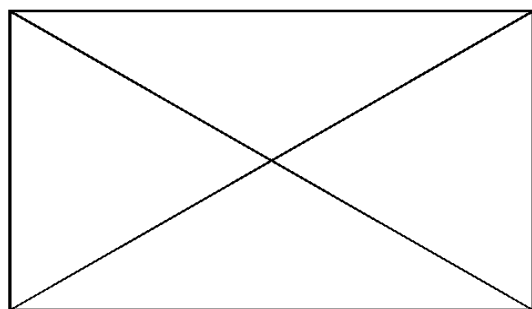
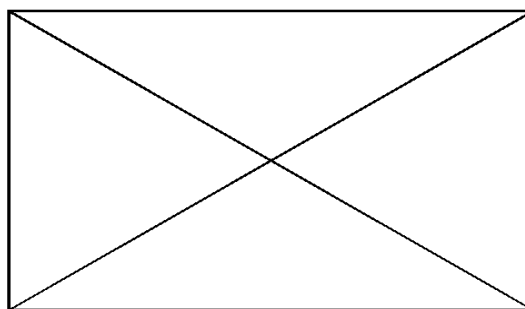


Fig. 2 F igure with side caption. This option is particularly appropriate for a single illustration with a maximum width of about 8 cm which cannot be grouped together with another figure. The figure is placed left-aligned with no indentation. The caption text must not exceed the available space beside the figure. Depending on the position of the figure at the top or the bottom of the page, the caption is also aligned top or bottom, respectively.



a)



b)

Fig. 3 Two parts of a figure side-by-side. They should be labelled a) and b) either in the figure or adjacent to it. Such figures are not left indented. Two figures of similar size with consecutive numbers may be arranged in the same way, with separate captions underneath each figure.

In the text, equations may be referred to by writing “... in Eq. (1)”. At the beginning of a sentence, use the full form “Equation (1) shows ...”.

3.4 Formatting of literature citations

References should be numbered (in square brackets, such as [1, 2] or [1–3]) and listed in the order of citations in the text at the end of the manuscript. In Word, do not insert references as endnotes. The preferred citation scheme for Journals is: Initials. Surnames, Journal Title, **Vol. No.** (in **bold** face), starting page (year of publication in brackets) [1]. For books, the following order is required (skip irrelevant information): Authors of Article or Chapter, in: Book Authors or Editor[s] (ed[s].) if no authors, Book Title, edited by Editors, Book Series Vol. No. (Publisher, Place, Year), chap. no., p/pp. page number[s] [2, 3]. When citing conference proceedings, please add all available data such as title, date, and place of the conference as well as publisher, place, and year of publication or, alternatively, the corresponding journal citation.

4. Further information

For additional information on the usual standards and conventions for articles in the Microbiology book series, you may refer to the Editorial Assistant at microbio@formatex.org

Acknowledgements The support by XXX is gratefully acknowledged.

References

- [1] I. Álvarez and B. Kilbourn, Journal of Digital Contents **2**, 132 (2004).
- [2] Erika Mechlová, Libor Koníček and Antonín Balnar, Journal of Digital Contents, **1**, 19 (2004)
- [3] B. Steren dos Santos, Proceedings of the 1st International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology, Badajoz, Spain, 15-18 March 2005, pp. 66-68.

...

7.2. Anexo 2
CARTA DE ACEITE DO ARTIGO



Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology

Microbiology Book Series – 2007 Edition

Badajoz (Spain), 10 July 2007

Dear Antonio Carlos de Freitas,

I am pleased to inform you that your paper titled "*Virus-Like Particles as a vaccinal strategy against tumors induced by papillomavirus infection*" has been accepted for inclusion in the forthcoming number of Microbiology Book Series titled "*Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*".

Please note that before the publisher can legally proceed with the typesetting of your chapter, a signed copy of the Copyright Transfer Agreement should be received properly filled (you can download this form from <http://www.formatex.org/microbio/how.htm>). For any tables, models, graphs, or other materials directly extracted from previously published materials, you must have written permission from the publisher of that material for reprint use. A copy of that permission should also be sent together with the Copyright Transfer Agreement.

Please also bear in mind that a copy of the Publication Charges Form should be also sent properly filled in due time (you can download this form from <http://www.formatex.org/microbio/how.htm>).

These forms should be sent by fax to the number +34 924 26 30 53 or to the below e-mail address (for the attention of A. Solano, Editorial Assistant) **before 20 July 2007**.

A copy of the book in which your paper will be published, as well as a publication charge invoice, will be posted to the corresponding author without additional charge as soon as the book is published. We would also like to inform you that all chapters of this book will be available in book website some time after the book publication.

Thank you very much for your contribution to this third number of the Microbiology Book Series.

Regards,

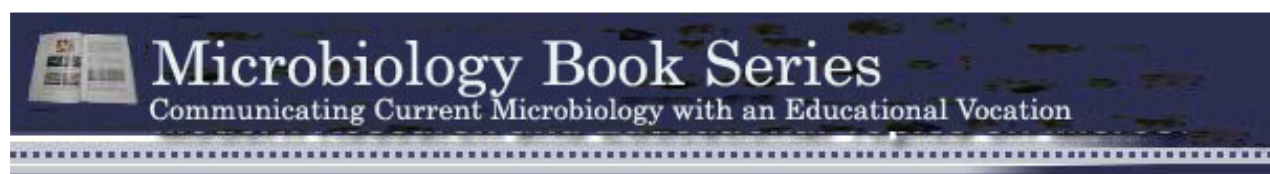
A handwritten signature in black ink, appearing to be 'A. Méndez-Vilas', is written over a horizontal line.

A. Méndez-Vilas

Editor for "*Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*"

e-mail: microbio@formatex.org

<http://www.formatex.org/microbio/>



Welcome to our new scientific and educational book series on Microbiology and its applications, with an emphasis on applied research with a strong interdisciplinary content.



Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology
- 2007 Edition -

Topics	How to submit proposals	Timeline - Deadlines	This edition is currently in production (Expected release in August 2007)
------------------------	---	--------------------------------------	--

About the Edition

Editor: A. Méndez-Vilas

Related titles-activities (2007)

- II International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology ([BioMicroWorld2007](#))
- Microscopy book series. [Current 2007](#)

Focus of the book series

This series is composed by full papers written by active researchers in applied microbiology, using current research materials, but presented in a pedagogical-generic way.

Type of contributions

- Original research full papers, with research data from the authors, but presented in a pedagogical or generic way.
- Mini-reviews, that may be thematic in nature, or centred in a specific research group activity. In this case, the work should provide an integrated view of the research carried out by a specific group across the years. The driving force(s) behind the evolution (seen as the reinforcement of some research approaches, refusals of others) of a concrete research group can



[edition.](#)

be of the highest interest for both experts and new arrivals in the field. Despite the great value of this kind of qualitative knowledge, this can be hardly obtained from the fragmented research works disseminated through traditional journals.

In either of the above mentioned types of contribution (research papers with a pedagogical focus or mini-reviews), active researchers/groups are invited to contribute.



Topics

The topics will include, but are not limited to the ones given below:

- Environmental Microbiology, Marine Microbiology, Water Microbiology, Geomicrobiology
- Industrial Microbiology - Future Bioindustries
- Food Microbiology
- Cell Engineering
- Pharmaceutical Microbiology
- Agriculture, Soil, Forest Microbiology
- Structure and Morphogenesis
- Analytical Techniques, Imaging Techniques, Microscopy
- Microbial Physiology, Metabolism and Gene Expression
- Microbial Biotechnology
- Aerospace Microbiology, Astro(micro)biology
- Quantitative Models and Bioinformatics in Microbiology
- Methods in Basic and Applied Microbiology
- Medical Microbiology
- Microbiology Education

7.3. Anexo 3
INSTRUÇÕES PARA AUTORES

Revista
GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY

ISSN 1415-4757
Ribeirão Preto, Brasil

SCOPE AND POLICY

Genetics and Molecular Biology (formerly named *Revista Brasileira de Genética/Brazilian Journal of Genetics* - ISSN 0100-8455) is published quarterly by the Sociedade Brasileira de Genética ([Brazilian Society of Genetics](#)).

The Journal considers contributions that present the results of original research in genetics, evolution and related scientific disciplines.

Although **Genetics and Molecular Biology** is an official publication of the Brazilian Society of Genetics, contributors are not required to be members of the Society.

It is a fundamental condition that submitted manuscripts have not been and will not be published elsewhere. With the acceptance of a manuscript for publication, the publishers acquire full and exclusive copyright for all languages and countries.

Manuscripts considered in conformity with the scope of the journal as judged by the Editor in conjunction with the Editorial Board are reviewed by the Associate Editors and two or more external reviewers. Acceptance by the Editor is based on the quality of the work as substantial contribution to the field and on the overall presentation of the manuscript.

SUBMISSION OF PAPERS

1. Manuscripts should be submitted to:

Angela M. Vianna-Morgante, Editor-in-Chief
Genetics and Molecular Biology
Rua Capitão Adelmio Norberto da Silva, 736
14025-670 Ribeirão Preto, SP – Brasil

2.A submission package sent to the Editorial Office must contain:

a) A cover letter stating that all authors have approved the submission of the manuscript. The letter must be signed by the Corresponding Author and must inform the e-mail addresses of all other authors so that they can be contacted by the Editorial Office for confirmation of the submission.

b) An electronic copy of the text, tables and figures. Formats for text are Word or RTF, in Windows platform. Images in TIFF or JPEG formats should be sent in separate files (For Figures, see detailed instructions in 3.1.h). Mailed CD-ROMs must be labeled with the first author's last name, platform and software (see detailed instructions below). This CD should also include files of Supplementary Material to be published online only, as well as of any unpublished or in press material cited in the text. Failure to adhere to these guidelines can delay the handling of your contribution and manuscripts may be returned before being reviewed.

c) Manuscripts including photos or any other identifiable data of human subjects must be accompanied by a copy of the signed consent by the individual or his/her guardian.

3. Categories of Contribution

3.1. Research Articles

Manuscripts must be written in English in double-spaced, 12-point type throughout, including the References Cited section, appendices, tables and legends; formatted to A4 paper with 2.5 cm margins; marked with consecutive page numbers, beginning with the cover page.

The following elements must start on a new page and be ordered as they are listed below:

a) The title page must contain: a concise and informative title; the authors' names (first name at full length); the authors' institutional affiliation, including department, institution, city, state or province and country; different affiliations indicated with superscript numbers; a short running title of about 35 characters, including spaces; up to five key words; the corresponding author's name, postal address, phone and fax numbers and email address. The corresponding author is the person responsible for checking the page proofs, arranging for the payment of color illustrations and author's alteration charges.

b) The Abstract must be a single paragraph that does not exceed 200 words and summarizes the main results and conclusions of the study. It should not contain references.

c) The text must be as succinct as possible. *Text citations*: articles should be referred to by authors' surnames and date of publication; citations with two authors must include both names; in citations with three or more authors, name the first author and use *et al.* List two or more references in the same citation in chronological order, separated by semi-colons. When two or more works in a citation were published in the same year, list them alphabetically by the first author surname. For two or more works by the same author(s) in a citation, list them chronologically, with the years separated by commas. (Example: Freire-Maia *et al.*, 1966a, 1966b, 2000). Only articles that are published or in press should be cited. In the case of personal communications or unpublished results, all contributors must be listed by initials and last name (*et al.* should not be used). *Numbers*: In the text, numbers nine or less must be written out except as part of a date, a fraction or decimal, a percentage, or a unit of measurement. Use Arabic numerals for numbers larger than nine. Avoid starting a sentence with a number. *Binomial Names*: Latin names of genera, species and intraspecific taxa in the text must be printed in italics; names of orders and families should appear in the Title and also when first mentioned in the text. URLs for programs, data or other sources should be listed in the Internet Resources Section, immediately after the References Section, not in the text. URLs for citations of publications in electronic journals should appear in the reference section.

The text includes the following elements:

Introduction – Description of the background that led to the study.

Material (or Subjects) and Methods –Details relevant to the conduct of the study. Statistical methods should be explained at the end of this section.

Results –Undue repetition in text and tables should be avoided. Comment on significance of results is appropriate but broader discussion should be part of the Discussion section.

Discussion – The findings of the study should be placed in context of relevant published data. Ideas presented in other publications should not be discussed solely to make an exhaustive presentation.

Some manuscripts may require different formats appropriate to their content.

d) The Acknowledgments must be a single paragraph that immediately follows the discussion and includes references to grant support.

e) The References Section: references must be ordered alphabetically by the first author surname; references

with the same first author should be ordered as follows: first, as single author in chronological order; next, with only one more co-author in alphabetical order by the second author; and finally followed by references with more than two co-authors, in chronological order, independent of the second author surnames. Use standard abbreviations for journal titles.

Only articles that are published or in press should be included in this section. Works submitted for publication but not yet accepted, personal communications and unpublished data must be cited within the text. "Personal communication" refers to individuals other than the authors of the manuscript being submitted; "unpublished data" refers to data produced by at least one of the authors of the manuscript being submitted.

f) Internet Resources Section

this section should contain a list of URLs referring to data presented in the text, software programs and other Internet resources used during data processing. When databases are cited, date of consultation must be stated.

Sample Internet Resource citation :

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM> (September 4, 2005)
LEM Software,
http://dir.niehs.nih.gov/dirbb/weinbergfiles/hybrid_design.htm

g) Tables: each table must start on a new page. A concise title should be provided above the table. Tables must be numbered consecutively in Arabic numerals. Each column must have a title in the box head. Footnotes typed directly below the table should be indicated in lowercase superscript numbers.

h) Figures must be numbered consecutively in Arabic numerals. Legends should be typed on a separate sheet. Images should be in TIFF or JPEG format and provided in separate files. Figures in Word format cannot be published. Journal quality reproduction will require grayscale and color at resolution yielding 300 dpi. Authors should submit bitmapped line art at resolution yielding 600-1200 dpi. These resolutions refer to the output size of the file; if it is anticipated that images will be enlarged or reduced, the resolutions should be adjusted accordingly. Scanned figures should not be submitted. Identify each illustration by affixing on the back a label containing: the number of the figure, the name of the first author and an arrow indicating top of illustration. Identify each illustration by the first author name and the number of the respective figure. Color illustration can be accepted, but authors may be asked to defray the cost.

i) Nomenclature should adhere to current international standards.

j) Sequences may appear in text or in figure. DNA, RNA and protein sequences equal to or greater than 50 units must be entered into public databases. The accession number must be provided and released to the general public together with publication of the article. Long sequences requiring more than two pages to reproduce will not be published unless the Editorial decision is that the publication is necessary. Complete mtDNA sequence will not be published.

k) Data access: reference should be made to availability of detailed data and materials used for reported studies.

l) Ethical issues: Reports of experiments on live vertebrates must include a brief statement that the institutional review board approved the work and the protocol number must be provided. For experiments

involving human subjects, authors must also include a statement that informed consent was obtained from all subjects. If photos or any other identifiable data are included, a copy of the signed consent must accompany the manuscript.

m) Supplementary Material: Data that the authors consider of importance for completeness of a study, but which are too extensive to be included in the published version, can be submitted as Supplementary Material. This material will be made available together with the electronic version. In case a manuscript contains such material, it should be appropriately identified within the text. Supplementary material in tables should be identified as Table S1, Table S2, etc., in case of figures, they should be named accordingly, Figure S1, Figure S2. For online access, Supplementary material should be in PDF, JPEG or GIFF formats

In addition, a list of this material should be presented at the end of the manuscript text file, containing the following statement: *Supplementary material - the following online material is available for this article:*

- Table S1

This material is available as part of the online article from <http://www.scielo.br/gmb>

3.2 Short Communications

Present brief observations that do not warrant full-length articles. They should not be considered preliminary communications. They should be 15 or fewer typed pages in double spaced 12-point type, including literature cited. They should include an Abstract no longer than five percent of the paper's length and no further subdivision with introduction, material and methods, results and discussion in a single section. Up to two tables and two figures may be submitted. The title page and reference section format is that of full-length article.

3.3 Letters to the Editor

Relate or respond to recent published items in the journal. Discussions of political, social and ethical issues of interest to geneticists are also welcome in this form.

3.4 Review Articles

Review Articles are welcome.

3.5 Book Reviews

Publishers are invited to submit books on Genetics, Evolution and related disciplines, for review in the journal. Aspiring reviewers may propose writing a review.

3.6 History, Story and Memories

Accounts on historical aspects of Genetics relating to Brazil.

4. Proofs and Copyright Transfer

Page proofs will be sent to the corresponding author. Changes made to page proofs, apart from printer's errors, will be charged to the authors. Notes added in proof require Editorial approval. A form of consent to publish and transfer of copyright will have to be signed by the corresponding author, also on behalf of any co-authors.

