

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**

**Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica**

**FELIPPE BARBOSA GOMES**

**ANÁLISE DA PRODUÇÃO EXTRACELULAR DA PROTEÍNA L1 DE  
HPV 16, A PARTIR DA CONSTRUÇÃO pPICZA $\alpha$ L1H16, EM  
CÉLULAS DE *Pichia pastoris*.**

**RECIFE**

**2011**

**FELIPPE BARBOSA GOMES**

**ANÁLISE DA PRODUÇÃO EXTRACELULAR DA PROTEÍNA  
L1 DE HPV 16, A PARTIR DA CONSTRUÇÃO  
pPICZA $\alpha$ L1H16, EM CÉLULAS DE *Pichia pastoris*.**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Inovação  
Terapêutica da Universidade Federal de  
Pernambuco, para a obtenção do Título de  
Mestre em Inovação Terapêutica.**

**Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas**

**RECIFE**

**2011**

Gomes, Felipe Barbosa

Análise da produção extracelular da proteína L1 de HPV 16, a partir da construção pPICZαL1H16, em células de *Pichia pastoris* / Felipe Barbosa Gomes. – Recife: O Autor, 2011.

99 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Antonio Carlos de Freitas

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Inovação Terapêutica, 2011.

Inclui bibliografia.

1. Papilomavírus – Vacinas
2. Câncer
3. Câncer em mulheres
4. Tumores
5. Proteínas I. Título.

579.2445

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2011-181

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**

**Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica**

**REITOR**

Prof. Dr. amaro henrique pessoa lins

**VICE-REITOR**

Prof. Dr. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

**PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

**DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Profa. Dra. Ângela Maria Isidro Farias

**VICE- DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Profa. Dra. Silvia Regina Arruda de Moraes

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

Profa. Dra. Suely Lins Galdino

**VICE- COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

Profa. Dra. Ana Cristina de Almeida Fernandes

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPEÚTICA**

**COLETA DE DADOS – CAPES**  
**BANCA EXAMINADORA**

NOME COMPLETO VALDIR DE QUEIROZ BAUBINO		
TITULAÇÃO Doutor	INSTITUIÇÃO DE ORIGEM UFPE	CPF: 592 367 284 72

NOME COMPLETO Marcel Antonio de Moraes Junior		
TITULAÇÃO doutor	INSTITUIÇÃO DE ORIGEM UFPE	CPF: 708.100.014-20

NOME COMPLETO Antonio Carlos de Freitas		
TITULAÇÃO Doutor	INSTITUIÇÃO DE ORIGEM UFPE	CPF: 527319286-40

NOME COMPLETO		
TITULAÇÃO	INSTITUIÇÃO DE ORIGEM	CPF:

NOME COMPLETO		
TITULAÇÃO	INSTITUIÇÃO DE ORIGEM	CPF:

## AGRADECIMENTOS

Assim como em todos os momentos da minha vida, em primeiro lugar sou grato à Deus, pois sem a fé que eu tenho Nele e a fé que Ele tem em mim, nada do que vivi até hoje teria sentido, inclusive essa pós-graduação.

Meus votos de agradecimento mais profundos e sinceros aos meus pais, Gilvete Gomes da Silva – pai, irmão, amigo e inclusive mãe – e Maria Goretti de Sousa Barbosa (*in memoriam*) que, apesar do pouco tempo de convívio físico que me foi concedido com ela, foi, juntamente com meu pai, foi o pilar fundador de todo meu caráter e personalidade.

Agradeço às minhas avós, Helena e Maria José (*in memoriam*) que mais do que tudo, foram também mães, presentes em todos os momentos da minha vida, e nelas tenho representados todos os demais membros da minha família.

Aos meus amigos de longa data, cultivados desde muito cedo, e que até hoje tenho como companheiros em todos os segmentos.

Muito obrigado ao meu orientador Professor Dr. Antonio Carlos de Freitas, que me acolheu um “estranho” na UFPE, vindo de outra universidade, de um estado diferente, e que aceitou a responsabilidade de me guiar e me confiou este projeto.

Agradeço a toda a equipe do Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental (LEMTE) e Laboratório de Genética dos Microrganismos (LGM). Em especial a: André, por sua exemplar dedicação e constante disposição em ajudar a todos os seus colegas com toda sua calma e paciência. Agradeço muito a Elyda, minha eterna “companheira” desde os tempos da UEPB, que desde de então me “persegue”. Sou grato a também a Marcelo, quem primeiro me acolheu e me mostrou os primeiros passos em um mundo completamente novo e o continuou fazendo até o último dia de trabalho no LEMTE. A todos os demais colegas de trabalho, como Janaíne “Menina Ruim”, Eliane, Filipe “demolidor”, Billy, Bárbara, Cybelle, Luciana, Kareem e Karim, cada um com uma participação diferente mas igualmente importante. Minhas conterrâneas: Angélica, Carol, Jackeline e Pavla, paraibanas que, assim como eu, saíram de casa em busca de uma melhor qualificação e compreendem os desafios e as recompensas dessa “aventura” que escolhemos por enfrentar.

Aos funcionários do Departamento de Genética, Dona Zizi e Seu Romildo, pessoas sem as quais o trabalho de todos nós, que fazemos parte do departamento de Genética da UFPE, seria bem mais difícil.

O meu reconhecimento e gratidão à Coordenação da Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, muito bem representada na pessoa da prof. Suelly, que me ajudou não apenas na esfera acadêmica mas, na minha formação como cidadão e pessoa. Também estendo meus votos de agradecimento aos demais funcionários e professores do PPGIT.

## **LISTA DE FIGURAS**

### **Revisão de Literatura**

**Figura 1.** Lesões clínicas provocadas por HPV.

**Figura 2.** Incidência dos vários tipos de cânceres em mulheres no mundo segundo a OMS.

**Figura 3.** Expansão da infecção no tecido epitelial cervical.

**Figura 4.** Evolução da lesão cervical pré-maligna ao câncer invasivo.

**Figura 5.** Figura representativa do Papilomavírus (PV).

**Figura 6 .** Genoma do HPV.

**Figura 7.** Ciclo de infecção do PV.

**Figura 8. .** Esquema da interferência de E6 no ciclo celular.

**Figura 9.** Esquema da interferência de E7 no ciclo celular.

**Figura 10.** Monômero de L1.

**Figura 11.** Ilustração da estrutura viral.

**Figura 12.** (A) Interação entre as  $\alpha$ -hélices interpentaméricas. (B) Interações de h4 com h2 e h3.

**Figura 13.** Apresentação de antígeno pelas Células de Langerhan.

**Figura 14.** Esquema de mecanismos de evasão imune do HPV.

**Figura 15.** (A) O monômero L1 . (B) Pentâmero de L1. (C) “Vírus-Like Particle”.

**Figura 16.** Mapa gênico do vetor de expressão pPICZA $\alpha$ .

**Figura 17.** Cassete de expressão.

### **Métodos**

**Figura 18.** Mapa Gênico do vetor de clonagem pBR32.

**Figura 19.** Estratégia para recircularização e amplificação do gene L1 de HPV-16.

## **Resultados**

**Figura 20.** Extração e Digestão do plasmídeo bacteriano pBR322HPV16.

**Figura 21.** Gene L1 amplificado.

**Figura 22.** Placa LB + Ágar com transformantes de *E. coli*.

**Figura 23.** Extração plasmidial das colônias clonadas com o plasmídeo pGEML1H16.

**Figura 24.** Subclonagem de L1 no vetor pPICZA $\alpha$ .

**Figura 25.** PCR de colônias.

**Figura 26.** PCR da construção pPICZA $\alpha$  com o gene L1.

**Figura 27.** Repiques das colônias de leveduras eletroporadas.

**Figura 28.** Gel de agarose da PCR de Colônias de *P. Pastoris*.

**Figura 29.** Gel representativo da análise da atividade transcricional do gene L1 por RT-PCR.

**Figura 30.** Dot blot (*deep-well*) usando anti-HIS (1;10000) conjugado à fosfatase alcalina.

**Figura 31.** Dot blot (frascos 500ml) usando anti-HIS (1;10000) conjugado à fosfatase alcalina.

**Figura 32.** Dot blot usando anti-HIS (1;10000) conjugado à fosfatase alcalina, com diluições seriadas.



## LISTA DE QUADROS

**Quadro 1.** Proteínas recombinantes expressas em *P. pastoris*, adaptado de Macauley-Patrick, 2005.

**Quadro 2.** Composição da reação de ligação do genoma de HPV16.

**Quadro 3:** Reação de ligação pGEM:L1.

**Quadro 4:** Reação de ligação pPICZA $\alpha$ L1.

**Quadro 5:** Reação da PCR de colônia.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**APC** – Célula apresentadora de antígenos

**BPV** – *Bovine Papillomavirus* - Papilomavírus Bovino

**COPV** - *Cannine Oral Papillomavirus* – Papilomavírus oral canino

**CRPV** - *Cottontail Rabbit Papillomavirus* – Papilomavírus do coelho *cottontail*

**CTL** – Linfócitos T Citotóxicos

**DCs** – Células dendríticas

**DNA** – Ácido desoxirribonucléico

**DO600** - Densidade ótica a 600 nm

**E** – Gene que codifica proteína Early ou imediata

**EDTA** – *Ethylenediamine tetraacetic acid* ou ácido etilenodiamino tetra-acético

**HIV** – Vírus da Imunodeficiência Humana

**HCV** – vírus da hepatite C

**HPV** – Papilomavírus humano

**IFN** – Interferon

**IL-12** – Interleucina-12

**Kb** – Kilobase

**kDa** – Kilodalton

**L** – Gene que codifica proteína Late ou tardia

**LC** – Células de Langerhans

**LCR** – Região longa de controle

**MHC I** – Complexo maior de histocompatibilidade de classe I

**mRNA** – RNA mensageiro

**Mut<sup>s</sup>** – *Methanol utilization slow phenotype* – fenótipo de utilização lenta de metanol

**Mut<sup>+</sup>** – *Methanol utilization plus phenotype* – fenótipo de alta utilização de metanol

**Mut<sup>-</sup>** - *Methanol utilization minus phenotype* - fenótipo de menor utilização do metanol

**ORF** – *Open reading frame* ou quadro aberto de leitura

**p53** - Proteína 53 – Fator de transcrição que regula o ciclo celular

**PBS** – Phosphate buffered saline

**PCR** – Reação em cadeia da polimerase

**pRb** - Proteína do retinoblastoma – supressora de tumor

**PV** – Papilomavírus

**RNA** – Ácido ribonucleico

**RT-PCR** – Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa

**SIV HIV** – VLP híbrida entre vírus da imunodeficiência dos símios (gag) e vírus da imunodeficiência humana (env)

**TCD4+** - Célula T auxiliar

**TCD8+** - Célula T citotóxica

**tRNA** – RNA transportador

**TMB** – Tetrametil dihidroclorato de benzidina

**VLP** – “*virus-like particle*” – partícula semelhante a vírus

## RESUMO

O câncer cervical é a segunda maior causa de mortes entre mulheres no mundo. Esta neoplasia maligna está relacionada com a presença do Papilomavírus Humano (HPV), sendo o tipo 16 responsável por 60% dos casos. O HPV infecta o tecido epitelial mucoso ou cutâneo e é responsável pelo aparecimento de verrugas ou papilomas benignos que tendem a regredir naturalmente na maioria dos casos, mas que ainda assim causam prejuízos aos indivíduos infectados e aos sistemas públicos de saúde, sendo a papilomatose considerada a doença sexualmente transmissível mais prevalente no mundo, tornando essencial a aplicação de estratégias de combate à esta infecção. Vacinas baseadas em *Virus-like particles* (VLPs), formadas a partir das proteínas capsidiais L1 e L2 - que induzem a formação de anticorpos neutralizantes - já estão comercialmente disponíveis. Contudo, possuem um preço elevado considerando, principalmente, os países em desenvolvimento. A imunidade humoral é direcionada contra os epítomos conformacionais da proteína L1 que compõe 90% da estrutura capsidial. Para produção das VLPs os genes das proteínas capsidiais são expressos em sistemas heterólogos e o produto resultante é purificado. A escolha de um sistema mais simples e barato para essa expressão é fundamental para a redução do custo das vacinas. Uma alternativa promissora é a levedura *Pichia pastoris*. Este trabalho propôs a produção extracelular da proteína L1 de HPV16, que teve seu gene inserido no vetor pPCIZA $\alpha$ . A construção pPICZA $\alpha$ L1H16 foi integrada no genoma da levedura *Pichia pastoris* e a transcrição do gene L1 e a expressão da proteína foram confirmadas por RT-PCR e imunodeteção em Dot Blot. A expressão extracelular da proteína L1 de HPV 16, em células de *P. pastoris*, é uma etapa essencial na busca do desenvolvimento de uma estratégia vacinal mais economicamente viável baseada em VLPs.

**PALAVRAS-CHAVE:** Papilomavírus Humano, Proteína L1, Sistema de Expressão, VLP, *Pichia pastoris*.

## ABSTRACT

The Cervical cancer is the second leading cause of death among women worldwide. This malignancy is related to the presence of human papillomavirus (HPV) being the type 16 responsible for 60% of the cases. HPV infects cutaneous or mucosal epithelial tissue and is responsible for the appearance of benign papillomas or warts that tend to regress naturally in most cases, but still cause damage to infected individuals and public health systems, with papillomatosis being considered the most prevalent sexually transmitted disease worldwide, making essential to implement strategies to combat this infection. Vaccines based on virus-like particles (VLPs), formed from the capsid proteins L1 and L2 - that induce the formation of neutralizing antibodies - are already commercially available. However, they are expensive considering mainly the developing countries. Humoral immunity is directed against conformational epitopes of the L1 protein which represents 90% of the capsid structure. In order to produce VLPs the capsid protein genes are expressed in heterologous systems and the resulting product is purified. The choice of a simpler and cheaper system for this expression is fundamental to reduce the cost of vaccines. A promising alternative is the *Pichia pastoris* yeast. This paper proposed the extracellular generation of HPV16 L1 protein, which had its gene inserted into the vector pPCIZA $\alpha$ . The pPICZA $\alpha$ L1H16 plasmid was integrated into the *Pichia pastoris* yeast genome and the L1 gene transcription and protein expression were confirmed by RT-PCR and immunodetection in Dot Blot. The extracellular expression of HPV 16 L1 protein, in cells of *P. pastoris*, is an essential step in the quest to develop a more economically viable vaccine strategy based on VLPs.

KEY-WORDS: Human Papillomavirus, L1 protein, Expression System, VLP, *Pichia pastoris*.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	1
2	OBJETIVOS .....	3
3	REVISÃO DE LITERATURA .....	4
4	MATERIAIS E MÉTODO .....	47
5	RESULTADOS .....	63
6	DISCUSSÃO .....	74
7	CONCLUSÃO .....	78
9	REFERÊNCIAS .....	79

## 1. INTRODUÇÃO

O Câncer do colo do útero ocupa o segundo lugar em mortes de mulheres no mundo com o câncer de mama ocupando o primeiro lugar nas estatísticas. Existem evidências de que há uma forte relação entre o desenvolvimento de câncer do colo do útero e a infecção por alguns tipos de papilomavírus humano (HPV). Dentre esses tipos, o HPV16 está presente em 50 a 60% dos casos. Mulheres com infecção por HPV, apresentam o risco de desenvolver câncer de colo uterino 19 vezes maior. Mulheres com os tipos oncogênicos 18, 31 ou 33 têm um risco 50 vezes maior comparado ao daquelas não-infectadas e, se considerado o HPV 16, este risco tem aumento de mais de 100 vezes. Além disso, a papilomatose humana, que provoca infecções clínicas e subclínicas em homens e mulheres, é considerada a doença sexualmente transmissível mais prevalente no mundo atualmente.

A prevenção é a estratégia mais eficiente contra a infecção por HPV. As vacinas vêm sendo a alternativa mais explorada por pesquisadores no mundo inteiro. VLPs (*vírus like particles*) são partículas que mimetizam a estrutura viral e são capazes de estimular o sistema imune do indivíduo sem o risco de ocorrer infecção, já que são desprovidas de material genético e, portanto, incapazes de se reproduzir. Diversos estudos revelaram que a injeção intramuscular das VLPs dos HPV 6, 11, 16 e 18 é capaz de estimular resposta de anticorpos muitas vezes superior à encontrada após a infecção natural, e que o uso de vacinas formuladas com essas VLPs mostrou-se seguro em animais e humanos. Hoje já existem dois produtos comercialmente disponíveis contra o HPV, ambos baseados na imunização por VLPs. Contudo, essas vacinas são muito caras além de serem específicas para apenas quatro tipos virais (HPVs 6, 11, 16 e 18), deixando de fora, por exemplo, os tipos 31 e 33, os mais prevalentes no Nordeste e Centro-oeste do Brasil.

As vacinas atualmente disponíveis utilizam células de leveduras geneticamente modificadas como sistema heterólogo de produção das VLPs baseadas na proteínas virais L1 e L2. O preço elevado das doses das vacinas é consequência das patentes que são propriedades exclusivas dos dois laboratórios que atualmente comercializam a vacina . Uma alternativa viável é a mudança da espécie de levedura utilizada, a *Saccharomyces cerevisiae*, por outro tipo de levedura, como a *Pichia pastoris*. Assim como a *S. Cerevisiae* ela reúne características fundamentais para um sistema de expressão de proteínas heterólogo eficaz: baixo custo, altos níveis de proteína recombinante produzida e, assim como células eucarióticas mais complexas, é capaz de realizar modificações pós-traducionais.

No sistema de expressão baseado em *Pichia* a proteína pode ser produzida de maneira intracelular ou extracelular. A expressão extracelular é bastante utilizada porque a levedura secreta baixos níveis de proteínas nativas e a purificação das proteínas expressas dentro da célula é mais difícil quando comparada a expressão extracelular. Neste trabalho, avaliamos a capacidade da levedura *Pichia pastoris* produzir de maneira extracelular a proteína L1 do HPV16 como estratégia para a produção de VLPs e o conseqüente desenvolvimento de uma vacina mais barata contra a infecção pelo HPV.



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Geral**

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 extracelular da proteína L1.

### **2.2. Específicos**

2.2.1. Transformação das células de *P. pastoris* com a construção pPICZA $\alpha$ L1H16;

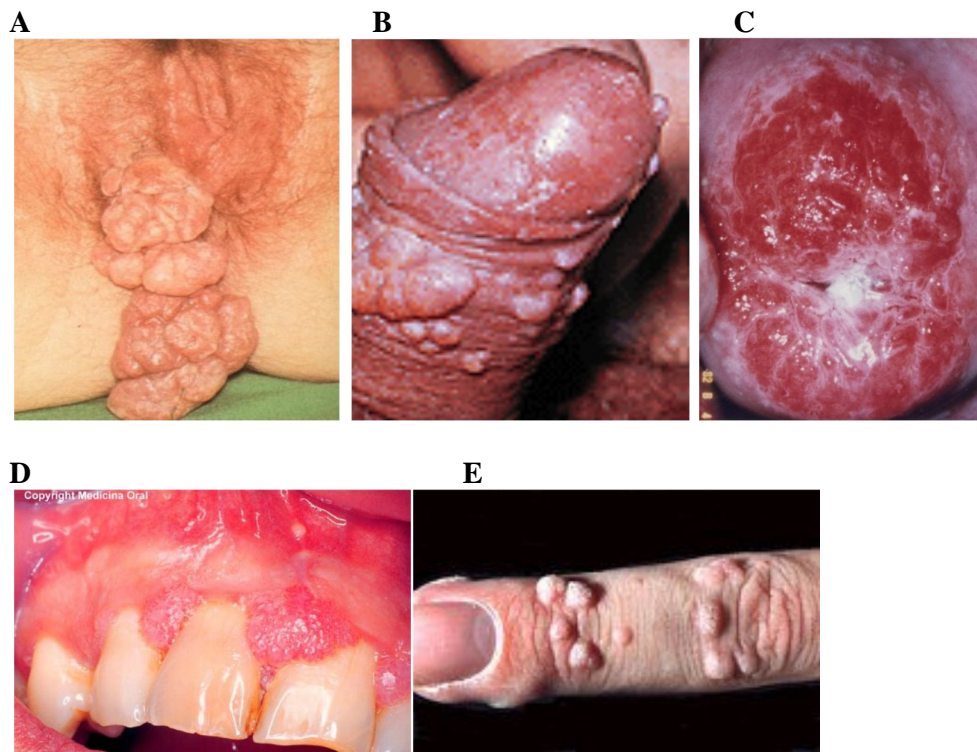
2.2.2. Seleção e análise das colônias recombinantes da levedura;

2.3.3. Indução e avaliação da produção extracelular da proteína L1.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Papilomatose e Câncer Cervical

Os papilomavírus constituem um grupo de vírus oncogênicos, que estão etiológicamente envolvidos na formação de verrugas, câncer cervical e outros tumores epiteliais (Figura 1) (Howley & Lowy, 2001). As lesões causadas são geralmente benignas, e a infecção é normalmente eliminada pela resposta celular imuno-mediada, a qual é direcionada contra antígenos virais (O'Brien & Campo, 2002). Entretanto na minoria dos casos, as lesões mucosas não regredem e podem progredir para câncer.



**Figura 1.** 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).

Os principais gêneros de HPV são o Alpha-papilomavirus (tipos de HPV associados à lesões genitais, mucosotrópicos, de alto e baixo risco), Beta-papilomavirus (tipos de HPV associados a lesões cutâneas benignas e malignas), bem como Gama-papilomavirus (tipos de HPV associados a lesões cutâneas benignas) (Bernard, 2005). Até o presente momento já foi relatada a existência de mais de 100 tipos de HPV, onde o genoma completo de cerca de mais de 100 tipos virais já foram isolados e completamente seqüenciados (Bernard, 2005).

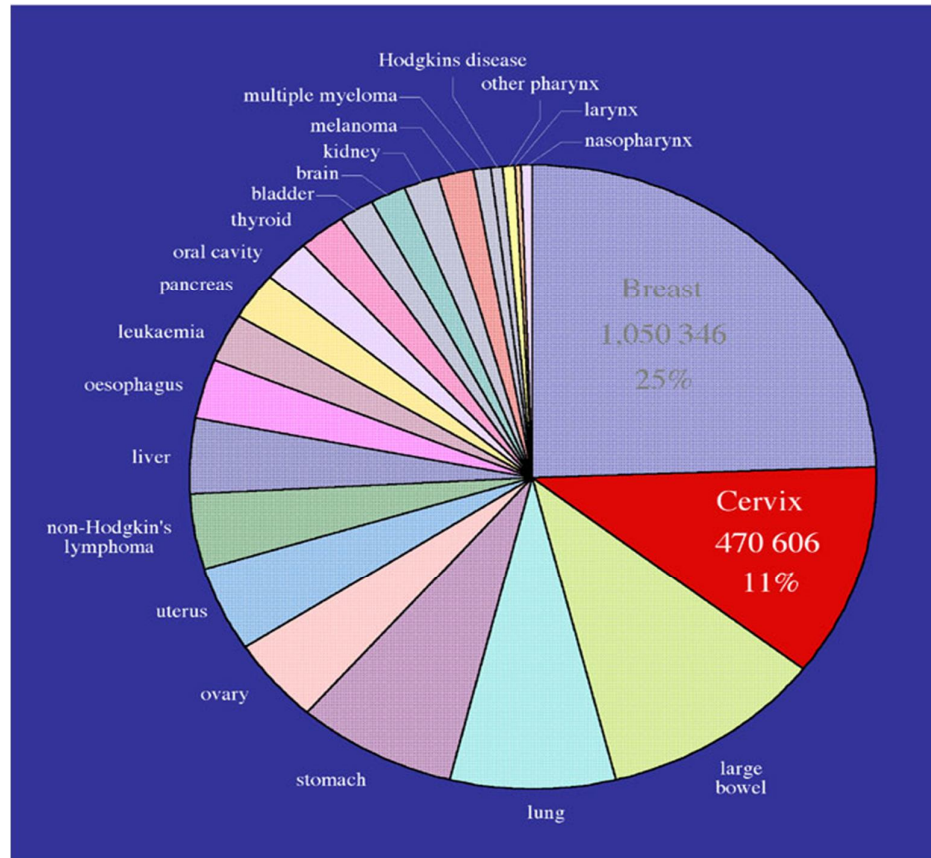
Os HPVs são subdivididos em cutâneos, que infectam a pele, e mucosotróficos, que infectam as mucosas urogenitais, anais e ororrespiratória (Sterling & Tyring, 2001). Dentre os tipos de HPV descritos, cerca de 40 podem infectar o trato genital (Bernard, 2005) e 15 são oncogênicos (Saslow *et al.*, 2007; FDA). Esses HPVs mucosotróficos podem ser ainda classificados como HPV de baixo e alto risco oncogênico, de acordo com o grau de lesão que induzem (Storey *et al.*, 1988; Stanley, 2001; Souto *et al.*, 2005). Os tipos de baixo risco induzem apenas lesões benignas e incluem os HPVs 6 e 11 (Kanodia *et al.*, 2007). Os tipos virais 16, 18, 31, 33, 45 e 46 são considerados como HPVs de alto risco, por serem comumente detectados em carcinoma cervical, onde o HPV-16 é responsável por 50 a 60% dos casos diagnosticados (Motoyama *et al.*, 2004), sendo o tipo viral mais prevalente no Brasil (Noronha *et al.*, 1999; Lorenzato *et al.*, 2000). No que se refere ao segundo tipo mais freqüente, existem variações de acordo com a região brasileira. No Nordeste e Centro-Oeste, os HPVs 31 e 33 são os que apresentam maior incidência depois do HPV-16, enquanto que nas regiões Norte, Sul e Sudeste, o HPV-18 é o segundo mais prevalente entre os casos de câncer cervical (Bosch *et al.*, 1995; Noronha *et al.*, 1999; Lorenzato *et al.*, 2000).

Há evidências de que a infecção por HPV tem progressivamente aumentado nas últimas décadas, o que leva a papilomatose humana ser considerada, hoje, a doença sexualmente transmissível (DST) mais prevalente no mundo (Cavalcanti *et al.*, 2000;

Scheurer *et al.*, 2005). Walboomer e colaboradores, em 1999, observaram que em cerca de 1000 mulheres com carcinoma cervical, a prevalência de HPV foi de 99,7%. As estimativas mundiais indicam que aproximadamente 20% de indivíduos assintomáticos estão infectados com HPV e que a cada ano surgem em torno de 500.000 novos casos de câncer do colo do útero ou câncer cervical (Linhares & Villa, 2006), com uma taxa de mortalidade de 50% (Lowndes, 2006; Parkin, 2006). Também se estima que haja entre 10 e 20 vezes mais lesões precursoras desses tumores, o que implica em um contingente muito grande de indivíduos afetados (Ferlay *et al.*, 2004). Nos EUA, o custo da assistência médica anual relacionada à infecção pelo HPV, entre indivíduos de 15 a 24 anos de idade, está estimado em US\$2,9 bilhões por ano, com um adicional de US\$108,3 milhões para custos médicos diretos associados ao tratamento do câncer cervical e US\$123,9 milhões para o tratamento de verrugas anogenitais (Scheurer *et al.*, 2005). Portanto, é quase universalmente aceito que a prevenção desta DST oriunda de infecções por tipos de HPV oncogênicos, reduziria dramaticamente a incidência de câncer cervical no mundo (Shiller & Hidesheim, 2000; Scheurer *et al.*, 2005; Stanley, 2005).

O câncer cervical é atribuído à infecção persistente por HPV's 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). Na América do Sul, o Brasil é o país que apresenta a maior incidência de casos de câncer cervical, sendo responsável por 50% dos 49.025 casos registrados no ano 2000 (Ferlay *et al.*, 2001). De acordo com o Ministério da Saúde/INCA (2002), os Estados de Mato Grosso, Goiás e Mato Grosso do sul lideram as estatísticas; Pernambuco está em sexto lugar, sendo responsável por 15% dos novos casos, dos quais se estimam 9,6% de óbitos. Entretanto,

Pernambuco lidera as estatísticas de incidência de câncer cervical na Região Nordeste, que corresponde a 15% da incidência de todos os tipos de câncer no Estado, perdendo apenas para o câncer de mama (Ministério da Saúde/INCA, 2002) dado que condiz também com as estatísticas mundiais sobre os tipos de câncer em mulheres segundo a Organização Mundial de Saúde (Figura 2).



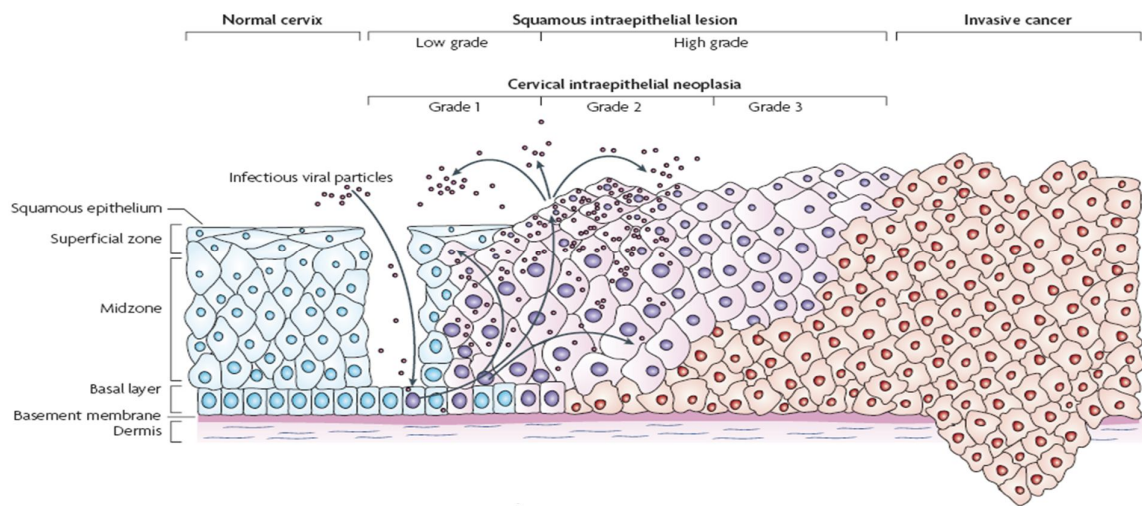
**Fig. 2.** Incidência dos vários tipos de cânceres em mulheres no mundo segundo a OMS (<http://www.nimr.mrc.ac.uk/virology/doorbar/fig1/>)

Numa estimativa feita pelo INCA (2002), para o ano de 2010, devem ser registrados cerca de 18.430 novos casos de câncer cervical no Brasil (dados ainda não confirmados) geograficamente distribuídos da seguinte forma: 10% na região Norte, 27,5% para o Nordeste, 7,5% no Centro-oeste, 38% no Sudeste e 17% na região Sul. Ainda no mesmo levantamento, sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer do colo do útero é o mais

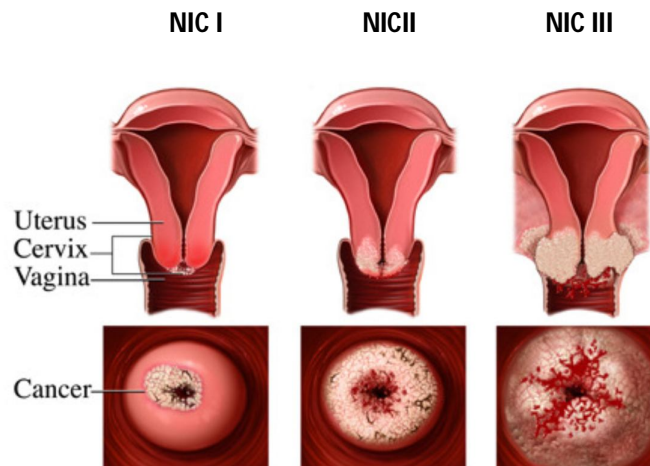
incidente na Região Norte (23/100.000 habitantes). Nas regiões Centro-Oeste (20/100.000 habitantes) e Nordeste (18/100.000 habitantes), ocupa a segunda posição mais frequente e nas regiões Sul (21/100.000 habitantes) e Sudeste (16/100.000 habitantes), a terceira posição. A relação entre o surgimento do câncer cervical e a infecção por certos tipos de HPV ficou evidente a partir de estudos epidemiológicos e funcionais (Zur Hausen, 2002; Bosch & De Sanjose, 2003), onde o HPV foi detectado em mais de 99,7% do carcinoma de células escamosas (Walboomers *et al.*, 1999, Muñoz *et al.*, 2003) e em 94-100% do carcinoma cervical adeno e adenoescamoso (Van Muyden *et al.*, 1999; Zielinski *et al.*, 2003). Estima-se que a infecção por HPV também é responsável por 90% dos casos de câncer anal, 40% de câncer nas genitálias (pênis, vulva e vagina), pelo menos 12% e 3% em câncer orofaríngeo e oral respectivamente (WHO, 2008). 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).

Alguns tipos de HPV, principalmente os de alto risco, empregam diversas estratégias para escapar do sistema imune do hospedeiro, como a produção de baixos níveis de proteínas virais. Outros estudos demonstram que os HPV são capazes de alterar as respostas do sistema imune inato, diminuindo a expressão e inibindo a função de genes induzidos por interferon. Os interferons tipo I,  $\alpha$  e  $\beta$  são citocinas produzidas por células infectadas por vírus em resposta ao reconhecimento de componentes virais. Entre suas ações, está a sinalização para a interrupção do ciclo celular e acionamento de vias apoptóticas. 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 3). 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 4).



**Figura 3.** Expansão da infecção no tecido epitelial cervical (Woodman *et al.*, 2007).



**Figura 4.** 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).

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 (Muñoz, 2000; Bosch *et al.*, 2002). No entanto, em alguns casos de infecção por HPVs carcinogênicos, as lesões não regridem e podem persistir por longos períodos, causando lesões cervicais pré-cancerígenas e até mesmo 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.*, 2005).

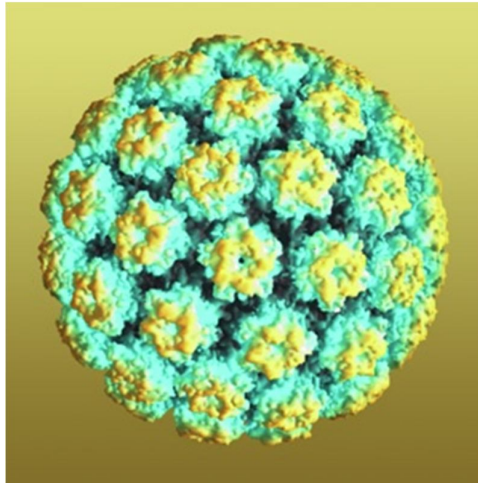
A persistência de HPVs de alto risco é o maior fator para o desenvolvimento de lesões malignas (zur Hausen, 1996), embora seja sugerida a influência de alguns fatores de risco adicionais para a susceptibilidade aos cânceres anogenitais como: uso de anticoncepcional oral (Brinton, 1991), uso de cigarro (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 socioeconômico do indivíduo são fatores que facilitam a infecção pelo vírus (Castellsague *et al.*, 2002).

### **3.2. Os Papilomavírus**

O Papilomavírus (PV) é um pequeno vírus oncogênico (diâmetro de 55–60nm), não envelopado, com morfologia icosaédrica (Figura 5). O capsídeo apresenta 72 capsômeros, formado pelos pentâmeros de 360 cópias de uma proteína chamada L1 e mais 12 cópias de outra proteína, denominada L2, (Baker *et al.*, 1991; Modis *et al.*, 2002) que atravessa o

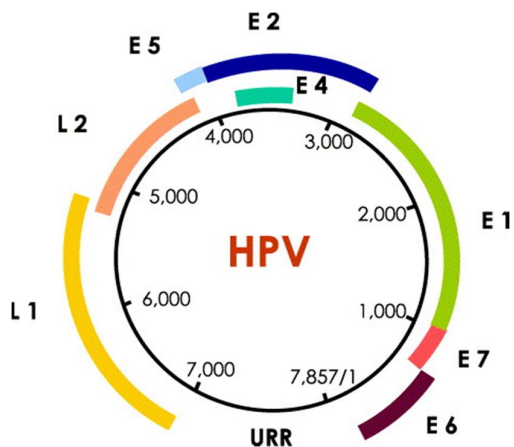


capsídeo e liga-se ao genoma viral. A massa molecular total do ácido nucléico é de  $5.0 \times 10^6$  daltons com tamanho de cerca de 8.000 pb (Stringfellow *et al.*, 1988).



**Figura 5.** Figura representativa do Papilomavírus (PV)

Seu genoma circular é constituído por DNA de fita dupla que contém 10 seqüências abertas de leitura (*open reading frames* – ORF), distribuídas em duas regiões principais (E e L), conforme o momento da transcrição. O segmento precoce (*early* - E) é constituído por oito ORFs e o segmento tardio (*late* – L) contém duas ORFs. Os genes L e E seguem um padrão temporal de expressão. Entre os segmentos E e L existe ainda um outro segmento denominado LCR (*long control region*) (Figura 6).



**Figura 6.** Genoma do HPV. DNA circular de aproximadamente 8 Kb, mostrando o arranjo dos genes não estruturais (E) e estruturais (L), e a região de regulação (URR) (Muñoz *et al.*, 2006).

O segmento E, inclui genes da fase precoce de transcrição, que representam 45% do genoma viral, codifica proteínas não-estruturais, necessárias para os processos de controle da replicação e transcrição viral e para a transformação da célula hospedeira.

O produto do gene E1 possui uma atividade helicase dependente de ATP, responsável pela fase inicial de replicação do DNA viral. A replicação do DNA viral é iniciada após a ligação da proteína E1 a seqüências ricas em AT da origem de replicação (Wilson *et al.*, 2002). A proteína E2 está envolvida no controle da transcrição e, também, da replicação viral. Em baixos níveis, E2 ativa a transcrição viral, enquanto que, em altas concentrações, a transcrição é reprimida. Isto sugere que E2 atue como um regulador de atividades do ciclo celular, mediadas por E6 e E7, além de contribuir para o número de cópias.

A perda da expressão de E2 está correlacionada com o aumento da proliferação celular induzido por E6 e E7 (Hedge, 2002). A proteína codificada pelo gene E4 associa-se com a rede de queratina celular, provocando sua desestabilização, o que sugere um papel na liberação de partículas virais (Doorbar, 2004). A proteína E4 é formada pelo *splicing* de seqüências de RNA codificando os cinco primeiros aminoácidos de E1 com a janela de leitura E4, formando os transcritos E1<sup>E4</sup>, que são expressos durante todo o ciclo do PV, porém, em

maior grau, nas camadas suprabasais diferenciadas. E5 é uma proteína hidrofóbica de membrana expressa nos estágios iniciais de infecção viral. Sua expressão modifica a resposta celular a fatores de crescimento e bloqueia a expressão na superfície de moléculas de MHC (Complexo principal de histocompatibilidade) (Bravo *et al.*, 2005.). Possui fraca atividade oncogênica, porém é capaz de aumentar a malignização de queratinócitos mediada pela proteína E7 (Bouvard *et al.*, 1994).

Os produtos dos genes E6 e E7 são essenciais para o processo de transformação e immortalização das células induzidas por certos tipos de PV. A proteína E6 dos papilomavírus de alto risco inativa a proteína de supressão de tumor p53, facilitando sua degradação (Howley *et al.*, 2002). Outros potenciais alvos celulares da proteína E6 foram identificados e, aparentemente, estão também envolvidos no processo de transformação celular. A proteína E7, entre outras funções, liga-se à forma hipofosforilada da proteína do retinoblastoma (pRB), resultando na inativação desta última, o que permite a progressão para a fase S do ciclo celular. Foi demonstrado que a proteína E7 de papilomavírus de alto risco liga-se com maior eficiência à pRB do que a proteína E7 dos papilomavírus de baixo risco. O rompimento da região E1 – E2 é necessário para o evento de integração ao genoma do hospedeiro e tem como consequência a desregulação do controle transcricional dos genes virais, mais criticamente, dos oncogenes E6 e E7 (Peña, 2002).

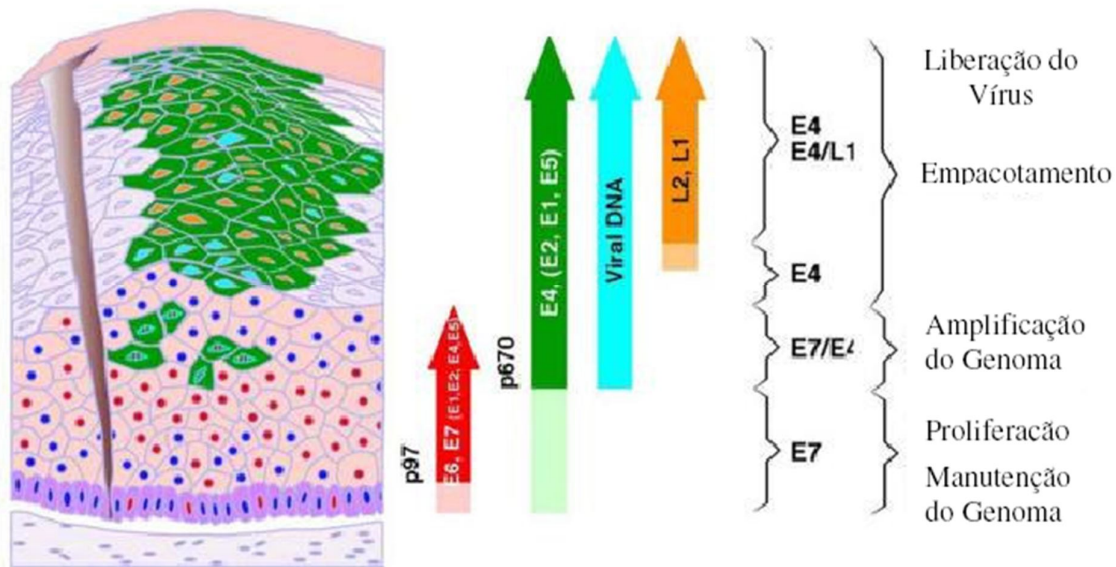
O segmento L, transcrito na etapa tardia do ciclo reprodutivo do vírus, codifica as proteínas estruturais L1 (proteína principal) e L2 (proteína menor), que compõem o capsídeo viral e representam 40% do genoma viral. Os epítomos de neutralização imunodominantes estão localizados na proteína L1, enquanto a proteína L2 participa da encapsidação do genoma viral.

A LCR contém elementos promotores e reguladores da replicação viral, correspondendo a 15% do genoma (Campo *et al.*, 1994) e, apesar de não apresentar genes que

irão codificar proteínas, vem demonstrando um papel fundamental segundo estudos sobre a regulação da expressão gênica do papilomavírus, como a função de promotores dessa região no processamento de RNA (Rong J., Zheng Z., 2009). Todos os transcritos de PV são processados de forma bi ou policistrônica contendo duas ou mais ORFs e são poliadenilados tanto nos sítios Poli (A) precoces (E) como nos tardios (L). Na última década vem se alcançado um progresso considerável a respeito de como esse complexo de expressão de genes virais é regulado a nível de transcrição (como via metilação de DNA) e particularmente pós-transcrição (incluindo splicing de RNA, poliadenilação e tradução). Tal conhecimento da estrutura do mRNA e processamento de RNA do PV forneceu algumas pistas de como controlar a expressão ontogênica do vírus. No entanto, pouco ainda se sabe sobre como os mRNAs são utilizados para traduzir cada proteína viral (Zheng Z.*et al.*, 2006).

### **3.4. Ciclo viral dos papilomavírus**

O ciclo de vida do papilomavírus está intimamente ligado à diferenciação epitelial, já que se replicam no epitélio escamoso estratificado da pele e mucosas (Figura 7). A liberação dos vírions não envelopados depende da desintegração celular normal, tipicamente observada próxima à superfície do epitélio. A dificuldade de mimetizar a diferenciação do epitélio estratificado em culturas de células tem sido um desafio para o estudo do ciclo de vida desses vírus. Dessa forma, muito do que se sabe sobre sua morfogênese deriva do estudo de versões recombinantes das proteínas estruturais L1 e L2 (Buck *et al.*, 2005). O complexo ciclo de replicação dos papilomavírus dificulta a montagem de um sistema de propagação em laboratório que permita a produção de vírions para fins vacinais (Da Silva *et al.*, 2001).



**Figura 7.** Ciclo de infecção do PV. Entrada do vírus no tecido epitelial através de microtrauma e estabelecimento da infecção na camada basal (células com núcleo vermelho). As células de núcleo laranja indicam a expressão das proteínas L1 e L2 para montagem dos vírions que são liberados posteriormente (adaptado de LOWY & SCHILLER, 2006).

Os papilomavírus infectam queratinócitos basais primitivos, onde sofrem três estágios de replicação. Dentro das camadas epidérmicas basal e primeira suprabasal, o DNA viral é propagado até ter 50 a 100 cópias por célula. Durante o segundo estágio, o estágio de manutenção, a replicação do DNA viral é realizada em sincronia com a diferenciação celular do hospedeiro, ocorrendo apenas durante a fase S do ciclo celular deste último. Durante ambos os estágios, o DNA do PV é mantido como plasmídeo episomal nos núcleos das células infectadas. O terceiro e último estágio é o estágio vegetativo de replicação viral. Este estágio ocorre apenas em tecidos com diferenciação terminal e incluem tanto um aumento no número de cópias do genoma viral, como a expressão dos genes tardios e formação de um novo vírus (Bedell *et al.*, 1991).

Em análise foi demonstrado que, para o papilomavírus humano, o genoma viral encontra-se integrado ao genoma do hospedeiro nas linhagens celulares do carcinoma do colo uterino, porém encontra-se na forma episomal extracromossômico nas lesões benignas (Choo

*et al.*, 1997). Esse achado sugere que, para o HPV, a inserção do genoma viral no genoma da célula hospedeira é, pelo menos, uma das maneiras de desencadear o processo maligno.

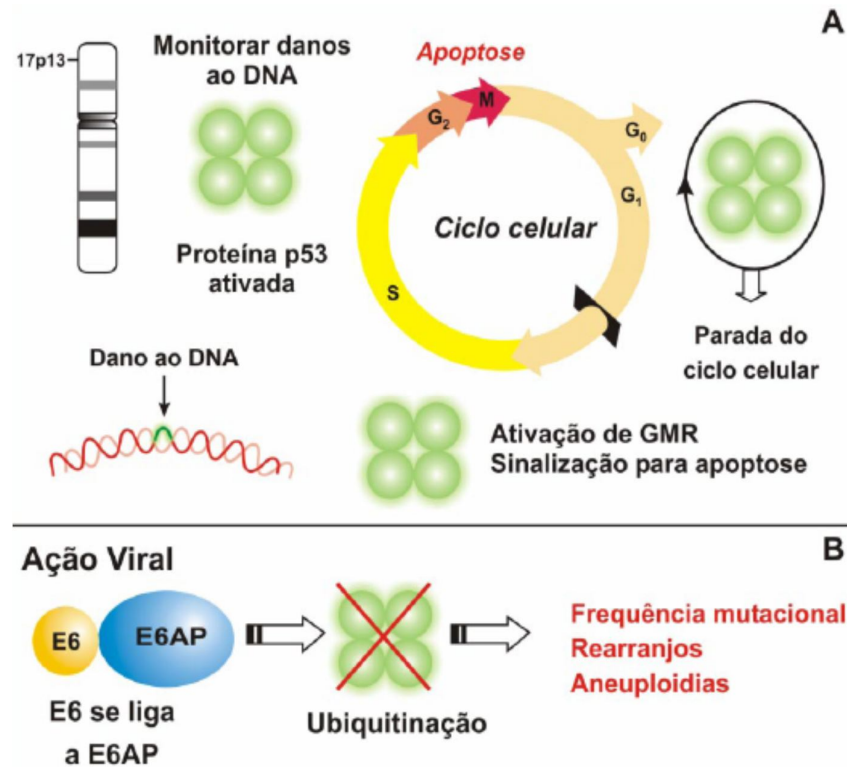
### **3.5. HPV e Transformação Celular**

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 & 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 & 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).

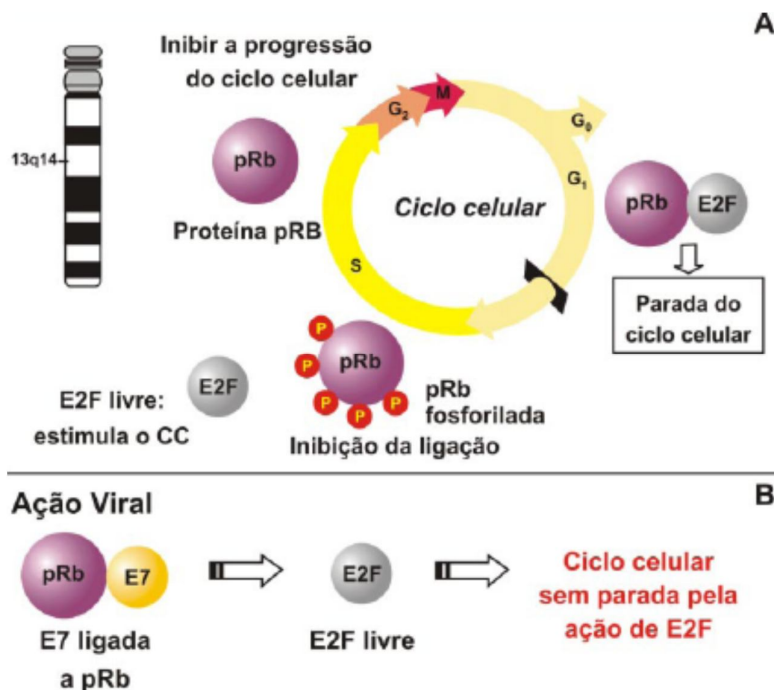
A proteína p53 tem como função ativar genes de mecanismo de reparo do DNA ou sinalizar para a apoptose após identificar danos no mesmo, provenientes de diferentes tipos de stress, como a exposição à UV (Silva *et al.*, 2003). Quando presente na célula, a proteína viral E6 recruta a proteína celular E6AP (ubiquitina-ligase), para ubiquitinação e degradação de

p53 (Stubenrauch & 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 8).



**Figura 8.** 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 9), o que levaria à progressão do ciclo celular ou um estímulo contínuo para a proliferação das células infectadas (Sandal, 2002).



**Figura 9.** 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 episomal 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 & 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 & 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 e sim, na transformação celular que ocorre nos estágios iniciais da doença (DiMaio & Mattoon, 2001).

### **3.6. A proteína L1**

A ORF L1 é a mais conservada no genoma do papilomavírus e tem sido utilizada para a identificação de novos tipos virais. Classificam-se os PV em vários tipos e subtipos e variantes de um mesmo tipo, dependendo da semelhança na sequência dos nucleotídeos. Isto foi possível graças ao desenvolvimento das técnicas de hibridização molecular. Um novo tipo de papilomavírus é reconhecido quando o sequenciamento da ORF L1 demonstrar diferença de similaridade de nucleotídeos superior a 10%. Diferenças de similaridade entre 2 e 10%

definem um subtipo e inferiores a 2% caracterizam uma variante viral (De Villiers *et al.*, 2004, Bernard, 2005). Desta forma, os papilomavírus são genotipados e não sorotipados.

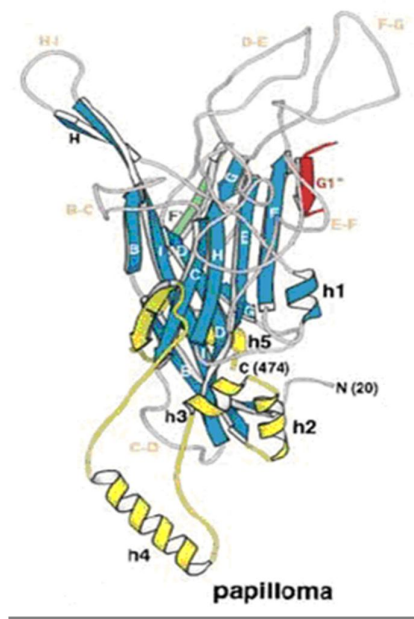
A proteína gênero-específica L1 é a principal proteína do capsídeo, com peso molecular de cerca de 54-58 kDa, representando cerca de 90% do total, contém epítomos que induzem anticorpos neutralizantes e, mesmo na ausência do genoma e da proteína L2, pode formar partículas semelhantes a vírus (VLPs) e capsômeros espontaneamente (Campo, 1995, David *et al.*, 2001). Além de sua função estrutural, L1, e provavelmente, L2, promovem a ligação do vírus a receptores celulares (CAMPO, 1997).

O gene L1 possui cerca de 500 aminoácidos (Chen *et al.*, 2000), enquanto L2 possui 469 aminoácidos (aa). Os primeiros 60 aa de L2 ficam dentro do capsídeo formado por L1 e ligam-se ao DNA viral, a sequência de 61 a 123 aa está exposta na superfície do vírus e a porção C-terminal localiza-se internamente (Liu *et al.*, 1997). As histonas celulares condensam o genoma viral composto de DNA circular dupla fita em um minicromossomo (Howley, 1996; Modis *et al.*, 2002).

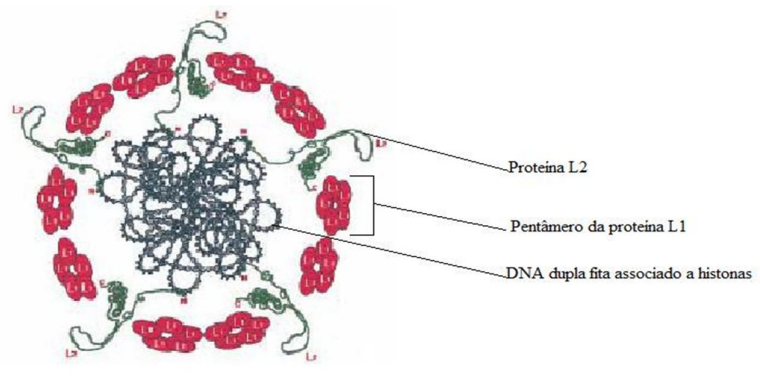
Existem evidências bioquímicas que pontes dissulfeto estabilizam o capsídeo dos papilomavírus (Sapp *et al.*, 1995; Fligge *et al.*, 2001). Experimentos de mutagêneses com HPV 16 realizados por Li *et al.* (1998) e Sapp *et al.* (1998) identificaram que os resíduos Cys175 e Cys428 de L1 são prováveis parceiros em ligações dissulfeto, pois são as únicas cisteínas expostas em L1. As interações interpentaméricas ocorrem através da porção C-terminal de L1, onde cada braço C-terminal invade o pentâmero adjacente (Modis *et al.*, 2002).

Os monômeros de L1 (Figura 10) contém 12  $\beta$ -fitas, 6 *loops* e 5  $\alpha$ -hélices (h1-h5). Estudos realizados por Bishop *et al.* (2007) demonstram que as  $\alpha$ -hélices h2, h3 e h4 localizadas próximas a porção C-terminal de L1 são responsáveis pelas interações interpentaméricas requeridas para montagem do capsídeo (Figura 11). Caracterizações

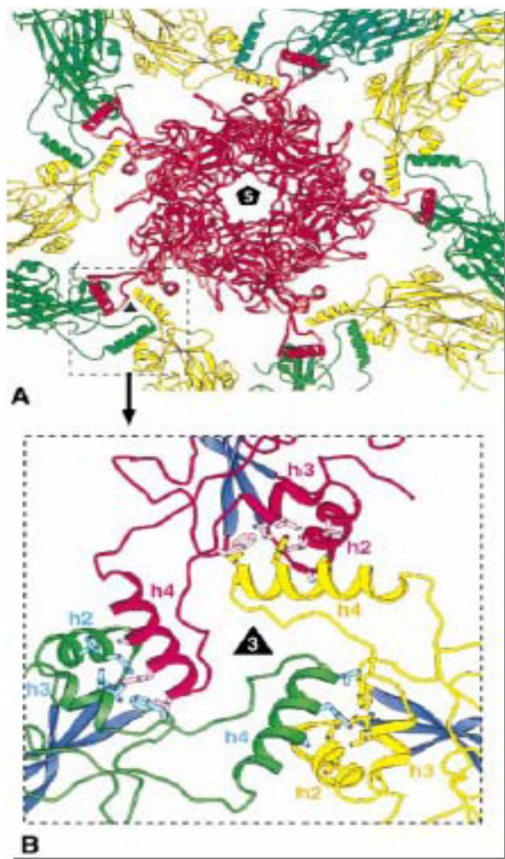
bioquímicas e estruturais de L1 mostram que as  $\alpha$ -hélices na região C-terminal tem papel importante nessa conformação. As  $\alpha$ -hélices h2, h3 e h5 são essenciais para o dobramento de L1 e formação do pentâmero, enquanto a h4 é indispensável para montagem do capsídio viral, devido seu papel na interação entre os pentâmeros adjacentes (Bishop *et al.*, 2007) (Figura 12).



**Figura 10.** Monômero de L1. A estrutura inclui os aminoácidos de 20 a 474, o primeiro é indicado por N (20) e o último por C (474). Os elementos estruturais são marcados, B-I para  $\beta$ -fitas e h1-h5 para as cinco  $\alpha$ -hélices. Os *loops* entre as  $\beta$ -fitas são indicados por B-C, C-D, etc (Chen *et al.*, 2000).



**Figura 11.** Ilustração da estrutura viral. Apresentando a proteína L2 ligada ao DNA viral e atravessando o capsídeo; os monômeros da proteína L1 organizados em pentâmeros formando o capsídeo; o DNA dupla fita circular condensado por histonas (Trus, *et al.*, 1997).



**Figura 12.** (A) Interação entre as  $\alpha$ -hélices interpentaméricas. Mostra como a  $\alpha$ -hélice 4 (h4) de cada subunidade do pentâmero em vermelho projeta-se e permanece no arcabouço formado pelas  $\alpha$ -hélices h2 e h3 dos pentâmeros adjacentes; (B) Mostra com detalhes as interações de h4 com h2 e h3 entre 3 subunidades de pentâmeros adjacentes (Chen *et al.*, 2000).

Estudos concluíram que DNA celular pode ser encapsidado por proteínas do capsídeo de algumas partículas do Poliomavírus. Esses trabalhos introduziram a idéia de reconstruir partículas (pseudovíriões) contendo um DNA exógeno, o que se tornou uma promessa para a terapia gênica de algumas doenças humanas (Zhao K. *et al.*, 1998). Conforme seu potencial imunogênico, precisamente, por ser capaz de ativar a resposta imune humoral, a proteína L1 é uma das mais fortes candidatas à aplicação de vacinas profiláticas contra a papilomatose (Kirnbauer *et al.*, 1992). Já é possível sintetizar VLPs consistindo de L1/L2 e de uma das proteínas precoces que se dispõe internamente à estrutura do capsídeo viral. Essas partículas são chamadas de VLPs quiméricas, constituindo-se em um antígeno vacinal muito atraente, já que pode ser utilizado tanto na profilaxia quanto no tratamento das lesões associadas ao HPV. Modelos experimentais empregando a indução de tumores causados por HPV 16 em

camundongos comprovam sua eficácia terapêutica, o que estimulou alguns grupos a proporem sua utilização em humanos como vacinas ao mesmo tempo profiláticas e terapêuticas (Gissmann *et al.*, 2002). As vacinas compostas pela proteína do capsídeo, L1 do HPV, que se aglomera em partículas virus-like (VLP) quando expressa em sistemas recombinantes, induz forte resposta humoral com anticorpos neutralizadores (Nadal *et al.*, 2006).

### **3.7. 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 das infecções virais a resposta inata do hospedeiro é feita pelos interferons tipo I (IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ), 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-  $\gamma$  também atua contra as infecções virais ativando macrófagos e células NK 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 (*cellmediated 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 & 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).

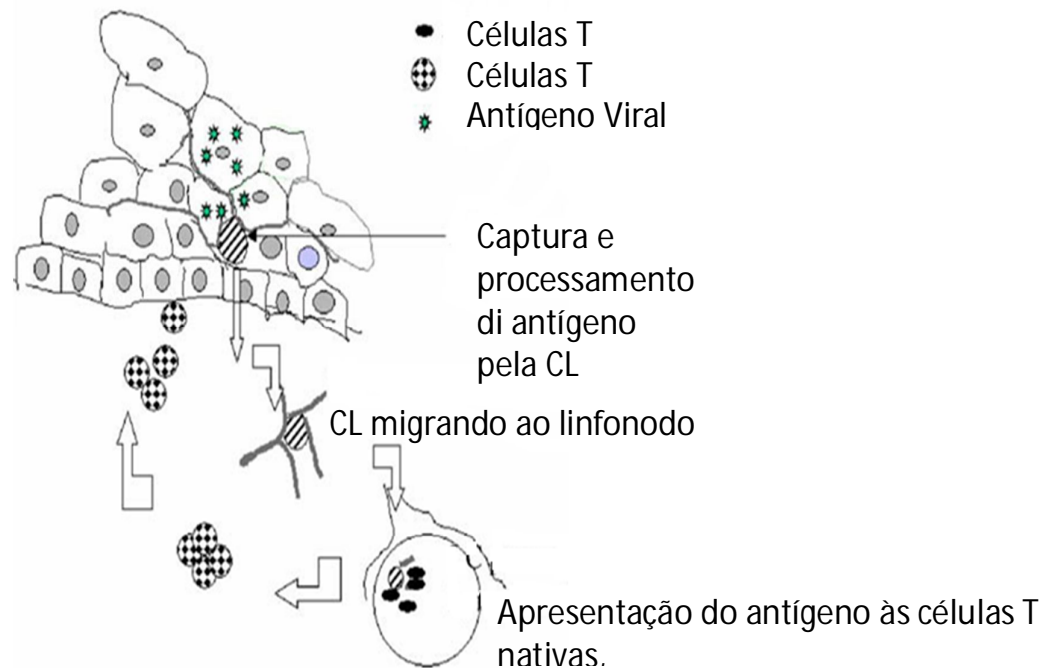
A incidência e a progressão das infecções por HPV em indivíduos imunossuprimidos, demonstram o crítico papel da resposta imune celular na resolução e controle da infecção (Benton & Arends, 1996). Os pacientes infectados por HIV geralmente apresentam múltiplas recorrências de infecções por HPV (Fruchter *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 13), 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 13.** Apresentação de antígeno pelas Células de Langerhan. A célula de Langerhan processa o antígeno e migra para o linfonodo (ativada pela ligação com citocinas próinflamatórias) 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).

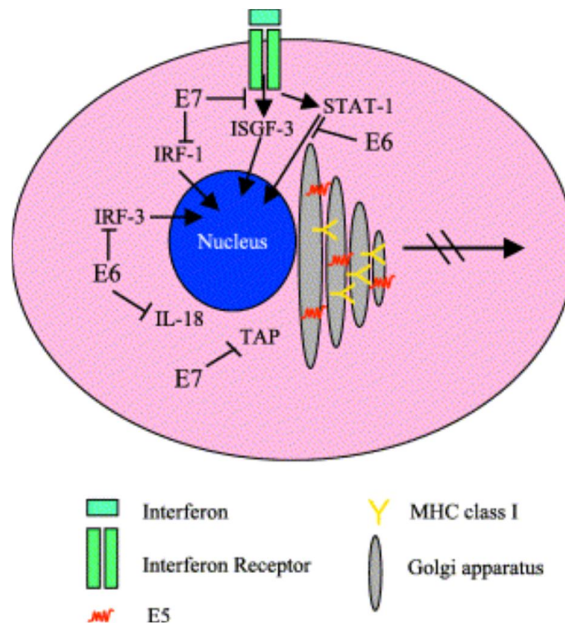
Mesmo na ausência de citólise induzida pelo vírus, os queratinócitos infectados devem ativar o sistema de defesa anti-viral, o interferon tipo I. Os interferons tipo I (IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ), têm propriedades anti-viral, anti-proliferativas, e imunoestimulatórias, agindo como uma ponte entre 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 & Kerr, 1992). Sabe-se que a proteína E7 de HPV-16 inibe a atividade do



IFN-  $\alpha$  (Barnard *et al*, 2000) pela perda do complexo (ISGF)-3 (Barnard & McMillan, 1999) e que ainda, inibe a ativação do promotor IFN-  $\beta$  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-  $\alpha$ , 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- $\alpha$  e IFN-  $\beta$ , 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-  $\beta$  (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 14) que podem ser citados.

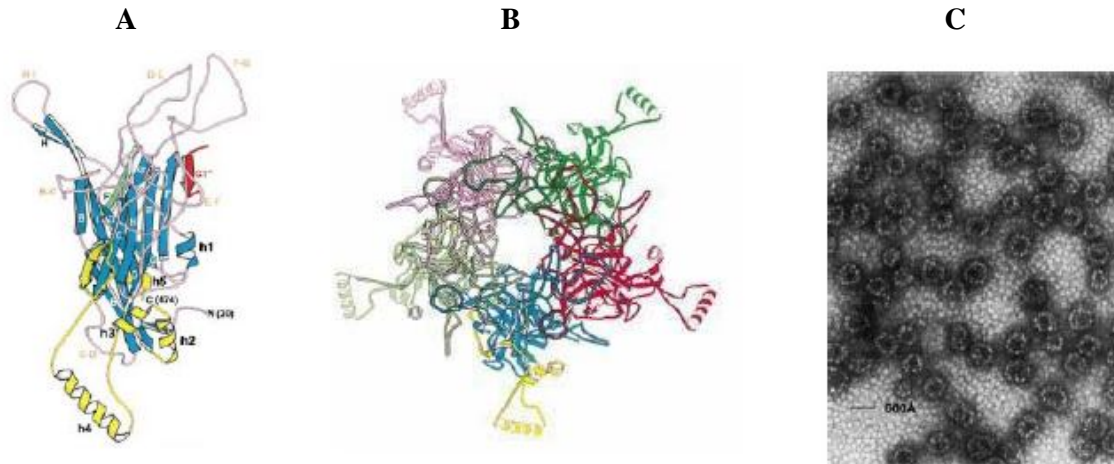


**Figura 14.** Esquema de mecanismos de evasão imune do HPV. Retenção do MHC classe I no complexo de Golgi por E5; via de transdução de sinal implicada na expressão de genes IFN, impedida por E6 e E7; inibição da interleucina IL-18 e da proteína TAP-1 por E6 e E7, respectivamente (adaptado de O'Brien & Campo, 2002).

### 3.8. Vacinas de VLPs

Na maioria dos países em desenvolvimento, o controle do câncer cervical através de programas de triagem, como a realização de exames tipo papanicolau, não tem sido muito efetivo. A produção de uma vacina eficiente contra HPVs de alto risco pode levar a uma grande redução de incidência e mortalidade do câncer do colo de útero (Bazan, 2007). Uma possibilidade promissora é a imunização com partículas semelhantes ao vírus (VLPs) preparadas por clonagem dos genes das principais proteínas virais em vetores eucariotos (Harro *et al.*, 2001). As *virus-like particles* são estruturas protéicas com morfologia similar aos vírions intactos, e são obtidas a partir da expressão de proteínas do capsídeo viral, que espontaneamente levam a montagem de estruturas similares aos vírus autênticos (Zhou *et al.*, 1991; Kirnbauer *et al.*, 1992, 1993) (Figura 15). As VLPs não são infecciosas ou oncogênicas, portanto, são candidatas atrativas para o desenvolvimento de vacinas profiláticas contra os papilomavírus (Da Silva *et al.*, 2001). Em 8 de junho de 2006, a *US Food and Drug Administration* (FDA) aprovou a Gardasil®, vacina quadrivalente desenvolvida pela Merck,

contendo VLPs de L1 dos tipos 6, 11, 16 e 18, para uso em mulheres de 9-26 anos de idade. A GlaxoSmithKline, em 2007, obteve a licença da *European Medicine Agency* (EMA) para a comercialização da Cervarix, vacina bivalente baseada em VLPs de L1 HPV 16 e 18.



**Figura 15.** (A) O monômero L1 . (B) Pentâmero de L1. (C) “Vírus-Like Particle” (Chen *et al.*, 2000)

Vírus não envelopados que expressam uma ou duas proteínas principais em seus capsídeos representam os modelos cujas VLPs apresentam-se mais similares ao vírus intacto, devido à simplicidade de sua estrutura. Vacinas contra hepatite B foram um dos primeiros produtos contendo VLPs sintetizadas, produzidas a partir de proteínas recombinantes em sistemas de expressão controlados (McAleer *et al.*, 1984). Outras doenças que são alvo para imunização com VLPs são gastroenterites (Tacket *et al.*, 2003), hepatite C (Lechmann *et al.*, 2001) e malária (Oliveira-Ferreira *et al.*, 2000).

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 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, com morfologia similar aos vírions intactos (Kirnbauer *et al.*, 1992).

As VLPs 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). 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. 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).

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: eficácia após uma única dose; longo tempo de proteção e polivalência para prevenir contra os principais tipos (Lowy & 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 & Garland, 2006).

### **3.9. Sistemas Heterólogos de Expressão**

O avanço das técnicas de biologia molecular e de engenharia genética contribuiu para o desenvolvimento de vacinas a partir da expressão de proteínas recombinantes em sistemas que utilizam tanto organismos procariotos, quanto eucariotos (Schatzmayr, 2001; Morton & 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 & 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 heterólogo adequado a este tipo de produto (Shuler & 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 & Bernard, 1999; Schatzmayr, 2001; Morton & 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 & Kargi, 2001).

O uso de animais transgênicos é uma alternativa à cultura de células de mamíferos, pois a geneticamente manipulados 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 & 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 facilitada pelo fato da proteína ficar retida em compartimentos estéreis ou comestíveis, o que, por sua vez, possibilita a administração oral de um produto terapêutico ou vacina, além disso, é um organismo que realiza modificações pós-traducionais (Mason & 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 & 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 nos demais sistemas de expressão mantendo muitas de suas vantagens (Schatzmayr, 2001).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é a mais utilizada e bem conhecida geneticamente (Sudbery, 1996). 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 & Kargi, 2001).

### 3.10. *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 & Cregg, 2000). Mais de 400 proteínas já foram produzidas nesta levedura (Cereghino & 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) [Quadro 1].

**Quadro 1.** Proteínas recombinantes expressas em *P. pastoris*, adaptado de Macauley-Patrick, 2005.

Proteína expressa	Função	Nível de expressão
<b>Bactéria</b>		
Cadeia pesada do fragment C de <i>Clostridium botulinum</i> sorotipo F [BoNTF(Hc)]	Antígeno	205 mg/kg de célula
<i>Escherichia coli</i> AppA	Usado na indústria de alimentação animal como fonte de fosfato inorgânico	117 ± 1 U/mL
<i>Escherichia coli</i> phytase	Usado na indústria de alimentação animal para aumentar a utilização de fósforo	6.4 g/L



<i>Gluconoacetobacter diazotrophicus</i> exo-levanase	Potencial fonte de frutose para produção de xarope de alta frutose	0.46 g/L
Aqualisina I <i>Thermus aquaticus</i> YT-1	Protease de serina subtipo lisina termoestável	1 g/L
<b>Fungos</b>		
Tanase de <i>Aspergillus oryzae</i>	Hidrolisa as ligações do tipo éster e depsídeos de gallotaninas e ésteres de ácido gálico	72 mg/L
Proteína fusionada de <i>Candida antarctica</i> CBM-CALB	Lipase	1.3 g/L
Lipase/ aciltransferase de <i>Candida parapsilosis</i>	Catalisa a alcoólise de ésteres	5.8 g/L
Lipase de <i>Rhizopus oryzae</i>	Catalisa a quebra de triglicerídeos	19 U/mL
Cellobiose dehifrogenase (CDH) de <i>Trametes versicolor</i>	Oxidação de grupos terminais redutores de Cellobiose	225 U/mL
Lacase (lcc1) de <i>Trametes versicolor</i>	Fenoloxidase	23.9 U/mL
D-amino ácido oxidase (DAAO) de <i>Trigonopsis variabilis</i>	Flavoproteína, oxidoreductase	1.46 U/MG
<b>Invertebrados</b>		
Antígeno BM95 de <i>Boophilus microplus</i>	Proteção de gado contra infestação de <i>B. microplus</i>	550.0 mg/L
Catepsina L de <i>Pandalus borealis</i> (camarão)	Proteinase de cisteína	60.0 mg/L
<b>Vertebrados (não humanos)</b>		
Veneno batroxobina de <i>Bothrops atrox</i> moojeni	Quebra a cadeia alfa do fibrinogênio	7 mg/L
Cadeia leve da enteroquinase bovina (EKL)	Proteinase duodenal de serina	350.0 mg/L
Lactoferrina equina (ELF)	Proteína ligante do ferro, família das transferrinas	40.0 mg/L
Lisozima H5 do ovo de galinha	Efeitos bactericidas	2.1 mg/L
Ovotransferrina do ovo de galinha branco	Proteína ligante do ferro, família das transferrinas	57.0 mg/L
Endostatina de camundongo	Supressor de crescimento tumoral	133.33 mg/L
Interferon- $\tau$ (r-oIFN- $\tau$ ) ovino	Atividade antiviral e antiproliferativa	391.7 mg/L
Lactoferrina Porcina (PLF)	Glicoproteína ligante do ferro, família das transferrinas	12.0 mg/L
<b>Humanos</b>		
Receptor $\mu$ -Opioid (HuMOR)	Receptor acoplado à proteína G (GPCR)	4.0 pmol/mg
Receptor opióide fusionado à proteína verde-fluorescente	Receptor acoplado à proteína G (GPCR),	1250 pmol/l
Angiostatina	Usado em terapias de longo prazo para supressão de metástases	108.0 mg/L
Fragmento Fab Anti-HBs	Prevenção e tratamento do vírus da hepatite B	50.0 mg/L
DNA topoisomerase I (hTopo I)	Atua na replicação, transcrição,	11–58 mg/L

	recombinação do DNA e agrupamento do cromossomo	
receptor D2S de dopamina	Proteína G	3–13 pmol/MG
Fator estimulador de colônia do macrófago-granulócito (hGM-CSF)	Regulação da atividade de maturação de granulócitos diferenciados e macrófagos	180.0 mg/L
Inibidor a protease de serina SERpin C1-INhítor (C1-Inh)	Glicoproteína plasmática, inibidor de reação inflamatória	180.0 mg/L
Albumina sérica	Ligante e transportador, coloide osmótico	13.4 mg/g
Amilóide P sérico (SAP)	Proteína G, inibidor da formação de auto-anticorpos contra DNA	12.0 mg/L
Domínio extracelular do receptor tipo II do Fator- $\beta$ de crescimento transformante (SolRII)	$\beta$ -TGF antagonista, regula a proliferação celular e diferenciação	20.0 mg/L
<b>Plantas</b>		
Aglutinina da campânula-branca Amaryllidaceae	Ligante de grupos $\alpha$ -D-mannose	80.0 mg/L
$\alpha$ 1,3-fucosiltransferase de <i>Arabidopsis thaliana</i>	Biosíntese de oligossacarídeos <i>O-linked</i> e <i>N-linked</i>	1.0 U/L
Gsp (Panax ginseng C, peptídeo medicinal)	Uso potencial como droga contra diabetes	800.0 mg/L
Proteinase de cisteína de milho (Mir1)	Germinação, senescência	Insolúvel/inativo
$\alpha$ -amylase (Amy 1A/3D) de arroz	Hidrólise do amido	340.0 mg/L
$\beta$ -D-fructofuranosidase (Os $\beta$ fruct3) de arroz	Hidrólise da sucrose	0.35 U/L
<i>Solanum tuberosum</i> (apyrase de batata)	Fosfohidrolase, inibição da agregação plaquetária	1.0 mg/L
Taumatina II <i>Thaumatococcus daniellii</i>	Proteína “sweet-tasting”	25 mg/L
<b>Vírus</b>		
Nucleoproteína do vírus do sarampo (MeN)	Responsável pelo empacotamento do genoma viral	29% de proteína total

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 etanol 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 & 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 & 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 & 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 & Cregg, 2000; Inan & Meagher, 2001). A levedura que tem o fenótipo Muts (*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 & 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 peroxisomal (Liu *et al*, 1995), não são muito utilizados, provavelmente pelos baixos níveis de expressão obtidos (Cereghino & 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).

Vantagens	Desvantagens
A transcrição de proteínas heterólogas é fortemente controlada por um mecanismo de repressão/ desrepressão	O monitoramento dos níveis de metanol durante a indução é um problema freqüente, devido a imprecisão de sondas
Altos níveis de proteína heteróloga podem ser obtidos, ainda que a mesma seja tóxica à célula	Metanol é um produto inflamável, de modo que, para a indústria, não é uma característica desejável à produção
A repressão da transcrição do gene heterólogo por uma fonte inicial de carbono assegura a obtenção de um bom crescimento celular antes da sobrecarga de expressão do gene	Metanol é principalmente derivado de uma fonte petroquímica, cujo envolvimento em produção de alimentos ou insumos médicos é evitado quando possível
A indução da transcrição é prontamente alcançada pela adição de metanol ao meio de cultura	Duas fontes de carbono são necessárias, uma vez que o processo é dividido em duas etapas (crescimento/ indução), havendo necessidade de troca dos meios de cultura em um ponto específico

**Tabela 1.** Vantagens e desvantagens do uso do promotor AOX1 para expressão heteróloga; Adaptado de Macauley-Patrick, 2005.

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-trasducionais 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 hiperglicolisação 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 & Cregg, 1998). 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 etanol 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).

No entanto, a principal vantagem da utilização da *P. pastoris*, principalmente quando comparada a *S. cerevisiae*, para a produção de L1 de HPV16, está na redução do preço do produto final, já que a patente existente envolve apenas a produção de VLPs a partir de células de *S. cerevisiae*.

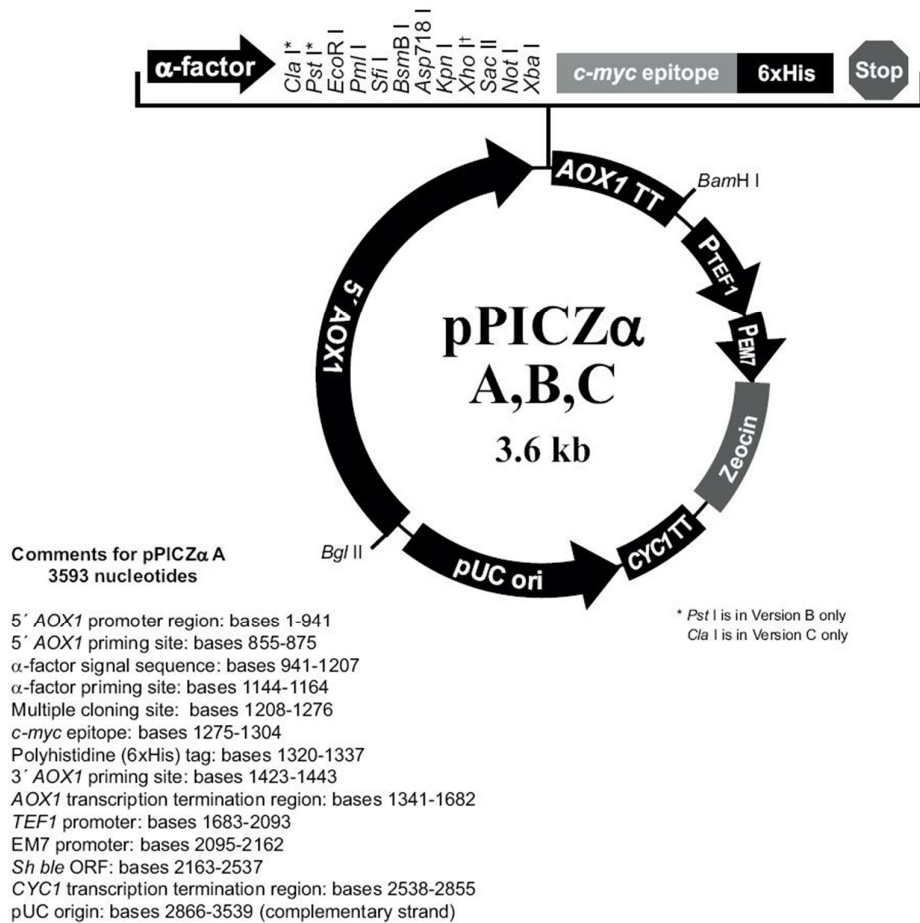
### **3.11. Vetor de Expressão pPICZAα**

Existem muitos vetores comerciais disponíveis para expressão em *P. Pastoris*. Estes vetores têm sido desenhados para serem usados tanto em *E. coli* como em *P. pastoris*. Eles contêm uma origem de replicação bacteriana e uma de levedura, para manutenção do plasmídio, e marcas de seleção para um ou ambos organismos. A maioria dos vetores de expressão tem um cassete de expressão composto por um fragmento de 0,9 kb referente à sequência do promotor do gene *AOX1* e a sequência de terminação da transcrição do *AOX1* (Cereghino & Cregg, 2000). Entre o promotor e a sequência terminadora existe um sítio ou múltiplos sítios de clonagem para inserção da sequência codificante do gene heterólogo, são

exemplos deste tipo de vetor os da linha pPICZ. Alguns dos vetores dessa linha possuem ainda sinais de secreção, que permitem a secreção da proteína heteróloga.

Tem sido utilizado com sucesso o sinal  *$\alpha$ -mating factor* de *S. cerevisiae* (Invitrogen, 2007), que codifica o peptídeo pré-pro fator  $\alpha$ , cuja função é ordenar a secreção da proteína sintetizada. Dados demonstraram que o poder de secreção da *P. pastoris* é muito superior ao da *S. cerevisiae* (Muller et al. 2005).

Além de uma variedade de opções de enzimas de restrição, o vetor pPICZA $\alpha$  (figura 16) conta ainda com duas seqüências que possibilitam duas estratégias interessantes de detecção e recuperação da proteína heteróloga produzida. Trata-se do epítipo c-myc (Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu), cuja fusão à proteína recombinante permite a sua imunodetecção pelo anticorpo anti-myc. A outra estratégia é demonstrada pela cauda c-terminal de poli-histidina (6XHis), cujo epítipo c-terminal pode ser detectado através do anticorpo anti-His, além de permitir a purificação da proteína recombinante fusionada por meio de cromatografia de afinidade. (Invitrogen, 2007)



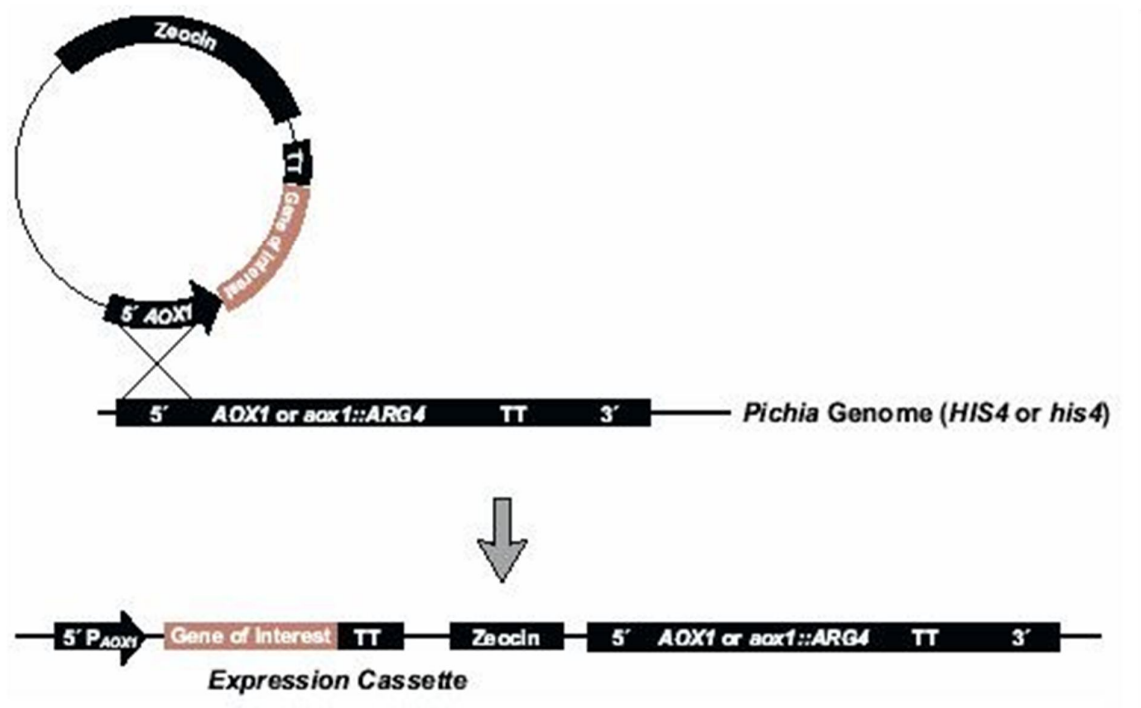
**Figura 16.** Mapa gênico do vetor de expressão pPICZα (Invitrogen, 2005)

O vetor de expressão pPICZα, um plasmídeo integrativo para células da levedura *Pichia pastoris*, é direcionado para uma sequência homóloga do loci genômico da levedura, justamente, de transcrição controlada pelo promotor AOX. Portanto, o vetor deve ser linearizado, antes da transformação, pois as extremidades do DNA são substratos favoráveis para enzimas de recombinação. Assim, vetores de expressão linearizados podem gerar transformantes estáveis via recombinação homóloga entre as sequências compartilhadas pelo vetor e pelo genoma do hospedeiro (Orr-Weaver et al. 1981).

A transformação em *P. pastoris* ocorre pela integração do cassete de expressão em locus específico e origina transformantes geneticamente estáveis. Para que isso ocorra o cassete de expressão/vetor deve ser digerido em único sítio, que pode ser uma marca gênica



(ex., *HIS4*) ou o promotor *AOX1*. A integração no genoma ocorre via recombinação homóloga quando o cassete de expressão/vetor contém regiões homólogas ao genoma da *P. pastoris* (figura 17), e a integração pode ser via inserção ou substituição gênica (Daly & Hearn, 2005).



**Figura 17.** Cassete de expressão. Integração de um cassete de expressão por inserção nos *locus AOX1* ou *AOX1:ARG4* (Invitrogen, 2007).

A integração por inserção ocorre em altas frequências (50-80%) por eventos de *crossover* (permuta) único nos loci *ARG4* ou *AOX1* (Cereghino & Cregg, 2000), e também pode resultar em integrações múltiplas em *tandem* devido a eventos de recombinação repetidos numa taxa de 1-10% dos transformantes (Daly & Hearn, 2005).

Eventos de integração por substituição gênica ocorrem por duplo *crossover* (permuta) no *locus* gênico alvo, dando origem à transformantes de cópia única que são geralmente mais estáveis. A substituição gênica em *P. pastoris* é obtida pela digestão do vetor de expressão nas regiões 5' e 3' terminais que correspondem às regiões 5' e 3' do *locus AOX1*. A

transformação resulta na deleção sítio-específica do gene *AOX1*, numa frequência de 5-25% dos transformantes (Daly & Hearn, 2005).

## **4. MATERIAIS E MÉTODO**

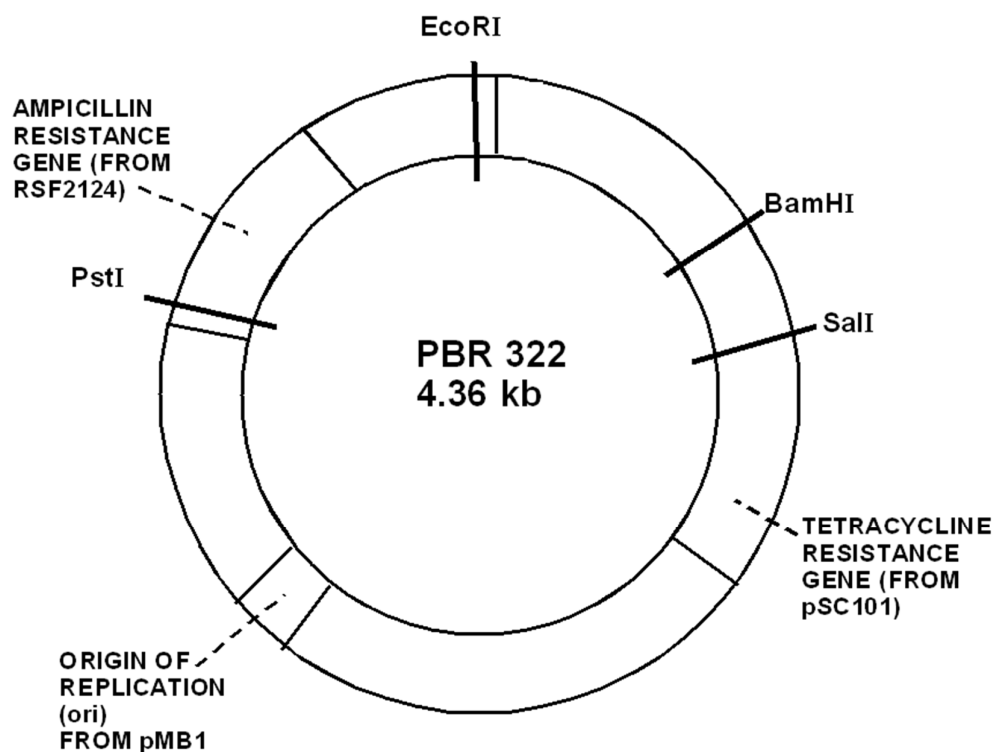
### **4.1. Construção dos oligonucleotídeos específicos para o gene L1 de HPV-16.**

As seqüências do genoma de HPV-16 (8kb) e do seu gene L1 (1,5kb) foram obtidas através do banco de dados do site NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov))[acesso NC 001526]. Foram incluídos nas extremidades dos primers sítios para as enzimas de restrição *KpnI* (primer direto) e *SaLI* (primer reverso), que facilitam a clonagem nos vetores pGEM-T e pPICZA $\alpha$ , bem como todas as análises seguintes dos clones por restrição. Segue abaixo a seqüência dos referidos primers com os seus respectivos sítios de restrição em negrito:

<i>Forward</i>	* <b>GGTACC</b> CTTTGGCTGCCT
<i>Reverse</i>	** <b>GTCGACCAGCTTACGTTTTTTGCG</b>

### **4.2. Extração de plasmídeo bacteriano pBR322HPV16**

O genoma completo do HPV 16 clonado em pBR322 (figura 18) foi transformado em *E. coli* DH5 $\alpha$  pra ser amplificado e posteriormente purificado.



**Figura 18.** Mapa Gênico do vetor de clonagem pBR322 (New England Biolabs)

As células bacterianas foram cultivadas em 20 mL de meio Luria-Bertani (LB - extrato de levedura 0,5%; Triptona 1%; NaCl 1%; água destilada) líquido, contendo ampicilina (100 µg/mL) e incubadas a 37°C por 16 horas com agitação (160 rpm). Após o crescimento bacteriano, a cultura foi transferida para microtubo de 1,5 mL e centrifugado a 13.000 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado, deixando o sedimento bacteriano o mais seco possível; esse procedimento foi repetido quatro vezes.

O sedimento bacteriano foi ressuspenso em 100 µL de solução I gelada (Glicose, Tris-HCl, e 50 mM, 25 mM e 10 mM de EDTA estéril) por meio de agitação no vortex. A solução I garante a ressuspensão das células sem a ocorrência de lise. Em seguida, foram adicionados 200 µL de solução II recém preparada (NaOH 0,2 M, SDS 1%) e misturado gentilmente apenas por inversão de quatro a cinco vezes, nesse ponto observou-se uma

viscosidade da reação devido à lise das células promovida pela última solução adicionada. A solução II promove a lise alcalina das células bacterianas, uma vez que contém detergente e hidróxido de sódio, solubilizantes dos lipídeos das membranas das células. A reação permaneceu no gelo por cinco minutos, após este passo, foi adicionado a solução III gelada (Acetato de Potássio 5M), misturando completamente por inversão, e então foi incubada por mais 5 minutos no gelo. A solução III é utilizada para a neutralização do pH do lisado e também, em razão de sua alta concentração salina, precipita o DNA cromossomal. Foi observada a formação de duas fases, um sobrenadante de cor branca correspondente aos restos celulares e uma fase aquosa correspondente ao DNA plasmidial das células lisadas ou DNA de interesse.

O microtubo foi centrifugado (16.000 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente) para que se houvesse precipitação do lisado celular e assim ser possível a remoção da fase aquosa da reação, este sobrenadante foi transferido para um microtubo novo e então adicionado um volume de isopropanol a temperatura ambiente. Neste ponto a reação foi mantida por dois minutos a temperatura ambiente e então centrifugada a 16.000 rpm por cinco minutos para precipitação e sedimentação do DNA. O precipitado foi seco e então adicionado 1mL de etanol 70% gelado. Repetindo-se a centrifugação por mais 5 minutos (13.000 rpm a temperatura ambiente), o sedimento foi posto para secar por 30 minutos na estufa a 37°C.

O DNA foi ressuspendido em 30 µL de H<sub>2</sub>O milliQ contendo RNase (20 µg/mL) e incubado 30 minutos a 37°C para tratamento com a mesma. O produto da reação foi submetido à análise em gel de agarose, sendo posteriormente guardado em freezer a -20°C.

#### **4.3. Digestão do pBR322HPV16**

O plasmídeo pBR322HPV16 foi digerido com a enzima *Bam*HI (10U/µL, temperatura ótima 37°C, Fermentas ) em uma reação de 30 µL de volume final, onde foram utilizados

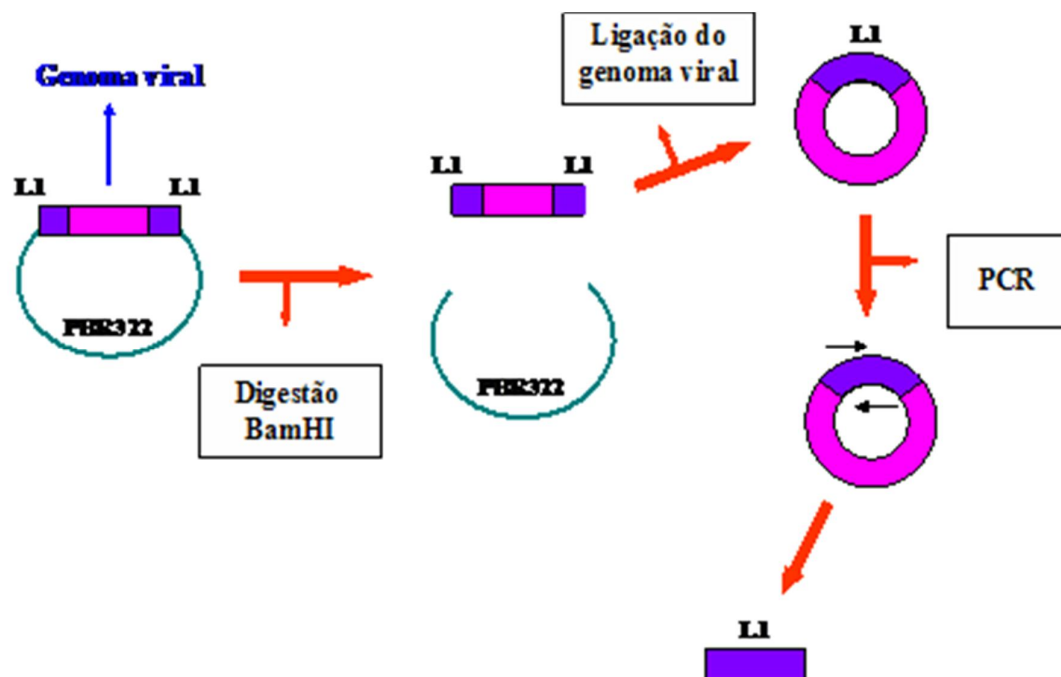
10µL do plasmídeo, 2µL da enzima, 3µL do tampão adequado (conforme estabelecido pela Fermentas), 0,3µL de BSA e 14.7µL de H<sub>2</sub>O. A reação permaneceu em banho-maria a 37°C por 16 horas. Dois sítios de restrição para esta enzima flanqueiam a região onde foi clonado o genoma de HPV 16, possibilitando por meio desta digestão, confirmar a presença do inserto. As bandas correspondentes ao vetor e ao genoma viral (8Kb) foram visualizadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TAE a 100v por 30 minutos (preparo do gel e corrida eletroforética realizadas com o tampão TAE - contendo Tris Base, Ácido acético glacial, EDTA 0,5 M pH 8,0, H<sub>2</sub>O destilada). Após separação em gel de agarose (0,8%), a banda de 8Kb foi excisada e purificada por meio do uso do *kit Purification and Quantification PureLink* (Invitrogen).

#### 4.4. Ligação do genoma viral

O genoma de HPV 16 purificado foi submetido à recircularização, para que a ORF de L1 fosse recomposta, (Figura 19), via reação de ligação (usando a enzima T4 Ligase, Invitrogen)[Quadro 2], seguindo o protocolo descrito pelo fabricante.

**Quadro 2.** Composição da reação de ligação do genoma de HPV16

Reagente	Volume
DNA plasmidial	5µL
Enzima ligase 10u µL	0,5µL
Tampão 10x	1µL
Água	3.5µL
Total	10µL



**Figura 19:** Estratégia para recircularização e amplificação do gene L1 de HPV-16.

#### 4.5. Amplificação do Gene L1 de HPV-16 por PCR

O genoma de HPV 16, recircularizado, foi submetido a uma reação de PCR com a enzima *Taq* DNA polimerase comum (Invitrogen), e os primers específicos (*Forward* L1H16pPa/ *Reverse* L1H16pPa), para identificação da temperatura ótima de anelamento.

Após temperatura ótima estabelecida, em tubo de reação de PCR (0,2ml) foram adicionados, 1μL do DNA, 1,5μL do *Primer forward* (10μM), 1,5μL do *Primer reverse* (10μM), 0,5μL dNTPs 2mM, 0,5μL MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 0,5μL da *Taq* comum (5U/μL), 2,5μL de Tampão 10X fornecido pela Eppendorf e 17μL água milliQ para ajustar o volume final à 25 μL. A reação de amplificação foi realizada em termociclador com os devidos ajustes de temperaturas e ciclos (94°C por 1 minuto para desnaturação, 94°C por 20 segundos, 57°C por 20 segundos para anelamento dos iniciadores, 1 minuto e 30 segundos a 68°C para amplificação – 30 ciclos –, extensão final por 5 minutos à 68 °C após o último ciclo a reação

mantida a 4°C por 20 minutos). O produto de PCR foi analisado através de corrida eletroforética (gel de agarose 0,8% em tampão TAE a 100v por 30 minutos).

Após a confirmação da amplificação do gene L1 de HPV-16 foi realizada uma segunda reação de PCR utilizando a enzima *Triple Master* - Eppendorf - DNA polimerase (*Taq DNA Polymerase High Fidelity*, ou seja, *Taq* de alta fidelidade). Para a reação foram utilizados 2µL do DNA, 2µL do *Primer forward* (10µM), 2µL do *Primer reverse* (10µM), 5µL dNTPs 2 mM, 2µL MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 0.2µL da *Taq High Fidelity* (5U/µL), 5µL de Tampão 10X fornecido pela Eppendorf e 31,8µL água milliQ para ajustar o volume final de 50 µL. O produto de PCR foi analisado através de corrida eletroforética (gel de agarose 0,8% em tampão TAE a 100v por 30 minutos).

#### **4.6. Purificação do DNA**

O procedimento adotado para as etapas de purificação do DNA seguiu as instruções do protocolo sugerido pelo *kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega). O conteúdo da reação de PCR foi transferido para uma *SV Minicolumn* e posteriormente centrifugado. Conforme o protocolo a solução de lavagem de membrana foi adicionada e novas centrifugações foram realizadas. Após a lavagem, a coluna foi transferida para um microtubo estéril e então o DNA foi eluído com água estéril livre de nuclease e em seguida o filtrado foi estocado em freezer a -20°C até o uso.

#### **4.7 Clonagem do gene L1, de HPV 16 no vetor pGEM –T.**

O L1H16 purificado e o vetor pGEM-T (Promega) foram usados em uma reação de ligação na proporção de 3:1 e 5:1 (vetor:inserto) [Quadro 3]

### **Cálculo Vetor-inserto, relação de 3:1:**

$$\frac{\text{Concentração do vetor} \times \text{Tamanho em Kb do inserto}}{\text{Tamanho em Kb do vetor}} \times 3 = \text{ng do inserto necessária}$$

### **Cálculo Vetor-inserto, relação de 5:1:**

$$\frac{\text{Concentração do vetor} \times \text{Tamanho em Kb do inserto}}{\text{Tamanho em Kb do vetor}} \times 5 = \text{ng do inserto necessária}$$

**Quadro 3.** Reações de ligação pGEM:L1.

#### **Relação de 3:1**

<b>Reagente</b>	<b>Volume</b>
Vetor pGEM T (50ng)	1 µL
L1 amplificado (100ng)	1,5 µL
Enzima T4 ligase 10u/µL	1 µL
Tampão 2x	5 µL
Água	0.5 µL
Total	10 µL

#### **Relação de 5:1**

<b>Reagente</b>	<b>Volume</b>
Vetor pGEM T (50ng)	1 µL
L1 amplificado (100ng)	2,5 µL
Enzima T4 ligase 10u/µL	1 µL
Tampão 2x	5 µL
Água	0,5 µL
Total	20 µL

A reação foi processada à 8°C por 16 horas. O produto da ligação foi inserido nas células de *E. coli* DH5α, através de transformação.

### **4.8. Transformação bacteriana com a construção pGEML1H16**

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 pré-inóculo com 1ml 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 CaCl<sub>2</sub> (100mM) e incubado no gelo por 30min. Nova centrifugação a 5500rpm por 7min foi realizada para ressuspensão das células em 5ml de solução CaCl<sub>2</sub> 100mM, 15% de glicerol bem gelados. Aliquotas de 100µl de células competentes foram armazenadas em freezer -80°C.

O próximo passo foi a adição do produto da ligação (10µL) às alíquotas de 100µl de células competentes. Após incubação no gelo por 30 minutos, as células foram submetidas a um choque térmico a 42°C por 3 minutos e rapidamente transferidas para banho de gelo, onde permaneceram por 1 minuto. As células foram submetidas a um processo de recuperação onde foi acrescentado 800µL de meio LB líquido sem o antibiótico por 45 minutos a 37°C. Os tubos foram centrifugados (5.000rpm por 5 minutos em temperatura ambiente) para precipitar as células. Uma alíquota do sobrenadante (200µL) foi plaqueado em meio sólido (LB + Agar bacteriológico 1,5%) contendo Xgal (20 mg/mL), IPTG (40 µg/mL) e ampicilina (100 µg/mL). As placas foram incubadas a 37°C por 16 horas e posteriormente guardadas no refrigerador até serem analisadas.

Uma vez reconhecidos os clones portadores da construção pGEM-L1H16, por PCR para detecção do gene L1 e por digestões que linearizam o vetor mais o inserto, correspondendo à altura de 4,5 Kb no gel de agarose, realizou-se um novo inóculo dos clones, desta vez, para mini extração plasmidial para fins de subclonagem.

Os clones foram analisados pelo método de mini prep (*kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* - Promega) e então o plasmídeo foi submetido a digestões, tanto para confirmação da presença do inserto clonado quanto para a preparação deste para a etapa de ligação do L1HPV-16 com o vetor de expressão pPICZAα.

#### 4.9. Subclonagem gene L1 ao vetor pPICZA $\alpha$

As enzimas utilizadas foram a *Sal* I (10unid/ $\mu$ L, temperatura ótima 37°C, Promega) e a *Kpn* I (10unid/ $\mu$ L, temperatura ótima 37°C, Promega). Devido ao tampão da *Kpn*I diminuir a eficiência da *Sal*I à 10%, não foi possível realizar uma digestão dupla, então foi realizada a digestão seriada. Na primeira reação foram utilizados 10 $\mu$ L da extração do pGEM-L1H16 (100ng), 3 $\mu$ L da enzima *Sal*I (10unid/ $\mu$ L), 2 $\mu$ L do Tampão 10x, 0,2 $\mu$ L de BSA e 4,8 $\mu$ L de água milliQ para ajustar o volume final de 20  $\mu$ L. A reação foi mantida por 3 horas à 37° e analisada através de corrida eletroforética (gel de agarose 0,8% em tampão TAE a 100v por 30 minutos).

Após confirmação da linearização do vetor mais o inserto, correspondendo à altura de 4,5Kb no gel de agarose, realizou-se então a segunda digestão utilizando a enzima *Kpn*I, foram aqui utilizados 18 $\mu$ L da reação acima descrita, 2 $\mu$ L da enzima *Kpn*I (10unid/ $\mu$ L), 1 $\mu$ L do Tampão 10x e 9 $\mu$ L de água milliQ para ajustar o volume final de 30 $\mu$ L.

O inserto foi devidamente liberado do vetor e, em seguida, purificado pelo uso do kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega). Paralelamente, o vetor pPICZA $\alpha$  foi também digerido com as duas enzimas acima citadas na expectativa de linearizar e disponibilizar os dois sítios para posterior ligação com o inserto L1.

O L1H16 purificado e o vetor pPICZA $\alpha$  foram usados em uma reação de ligação na proporção de 3:1 e 5:1 (vetor:inserto)[Quadro 4] .

**Quadro 4.** Reações de ligação pPICZA $\alpha$ L1

**Relação de 3:1**

Reagente	Volume
Vetor pPICZA $\alpha$ (60ng)	2 $\mu$ L
L1 amplificado (30ng)	2,5 $\mu$ L
Enzima T4 ligase 10u/ $\mu$ L	1 $\mu$ L
Tampão 10x	1 $\mu$ L
Água	3.5 $\mu$ L
Total	10 $\mu$ L

**Relação de 5:1**

Reagente	Volume
Vetor pPICZA $\alpha$ (60ng)	2 $\mu$ L
L1 amplificado (30ng)	4,1 $\mu$ L
Enzima T4 ligase 10u/ $\mu$ L	1 $\mu$ L
Tampão 10x	1 $\mu$ L
Água	1,9 $\mu$ L
Total	10 $\mu$ L

Após a incubação à 10°C por 16 horas, o produto da ligação foi usado como agente transformante de células de *Escherichia coli* linhagem DH5 $\alpha$ , previamente tratadas segundo o protocolo de preparo de células competentes. Após o procedimento de transformação, já descrito em etapas anteriores, as células foram plaqueadas em meio sólido LB *low salt* (Extrato de levedura 0,5%; Peptona de caseína 1%; NaCl 0,5%; Água destilada); Antibiótico correspondente ao vetor utilizado (zeocina em concentração 25  $\mu$ g/ml).

Seguiu-se incubação por 16 horas a 37°C. As colônias resistentes à zeocina foram, então, transferidas para uma nova placa de LB *low salt*, no intuito de otimizar seu crescimento, e incubadas a 37°C por 16 horas.

#### **4.10. Análise da construção pPICZA $\alpha$ L1H16**

A análise dos clones foi feita através de uma PCR de colônia (Quadro 5) onde é possível detectar o inserto L1HPV16 diretamente de uma amostra. Para isso, é necessário submeter uma suspensão da colônia isolada, a uma temperatura de 95°C por 5 minutos, com o objetivo de fragmentar a parede bacteriana pelo calor, liberando o material genético. Após essa etapa foi feita uma PCR.

**Quadro 5.** Reação da PCR de colônia

Reagente	Volume
Suspensão de colônia	5µL
<i>Primer forward</i> (10µM)	1.5µL (0.6 µM)
<i>Primer reverse</i> (10µM)	1.5µL (0.6 µM)
Tampão 5x	5µL (1X)
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	1µL (1mM)
Taq comum (5U/µL)	0.5µL (0.04U/µL)
dNTP (2mM)	0.5µL (40 µM)
Água	10µL
Total	25 µL

A PCR se seguiu da seguinte maneira: desnaturação inicial a 95°C por 3'; 35 ciclos de 94°C por 1', 58°C por 1' e 72°C por 2'; extensão final a 72°C por 10'.

Uma vez indicados com resultados positivos para detecção do inserto L1 na PCR de colônias, os possíveis clones foram inoculados em meio LB *low salt* acrescido de zeocina, de acordo com o protocolo de mini extração plasmidial anteriormente descrito. O DNA plasmidial obtido foi então digerido para confirmação da altura das bandas referentes à construção pPICZAαL1HPV16 em gel de agarose submetido a eletroforese.

#### **4.11. Preparo de células eletrocompetentes de *Pichia pastoris***

Para preparação de células eletrocompetentes, foram realizados os seguintes procedimentos: uma colônia da levedura *P. pastoris* X-33 (tipo selvagem) foi pré-inoculada em 10 mL de YPD (250rpm, a 30°C) *overnight* ou até uma DO<sub>600</sub> igual a 3; de 3-5 mL do pré-

inóculo foi adicionado a 250 mL de meio YPD para crescimento por 6 horas ou até uma  $DO_{600}$  igual 1.3; a cultura de leveduras foi centrifugada (3000 rpm por 5 min., a 4°C) para sedimentação das células; a lavagem do *pellet* foi gentilmente realizada por pipetagem, através de uma ressuspensão inicial das células em 100 mL de água deionizada (autoclavada) gelada, seguida de centrifugação e descarte do sobrenadante; a segunda ressuspensão do *pellet* foi realizada com 50mL de água deionizada (autoclavada), seguindo-se de nova centrifugação e descarte do sobrenadante; a última lavagem do *pellet* foi realizada com 20mL de sorbitol gelado 1M, seguindo-se da última centrifugação e descarte do sobrenadante; as células foram finalmente ressuspensas em 0.5mL de sorbitol 1M e mantidas no gelo.

Para a eletroporação, 5-10µg de DNA previamente linearizados (em um volume de 10µL) foram homogeneizados a 80µL de células eletrocompetentes mediante pipetagem. Essa mistura foi transferida para uma cubeta de 0.2cm pré-resfriada e incubada no gelo por 5 min. A cubeta foi inserida no eletroporador (Multiporator Eppendorf) para transformação, seguindo os parâmetros determinados pelo fabricante: 1500v por 5 ms. Imediatamente após o pulso elétrico, 1mL de sorbitol 1M gelado foi adicionado a cubeta. Em seguida, esse material foi transferido para um tubo estéril de 15mL e incubado por 2 horas a 30°C, sem agitação. Para aumentar o rendimento da transformação, foi adicionado 1mL de YPD ao tubo, o qual foi incubado por mais 2-3 horas a 30°C, sob agitação. A partir desse material, alíquotas de 10, 25 e 100µL foram semeadas em placas de meio YPDS contendo 100 µg/mL de Zeocina<sup>TM</sup> para incubação a 30°C por 2-3 dias. Os recombinantes foram então selecionados através da presença de colônias na placa de transformação devido à resistência ao antibiótico Zeocina<sup>TM</sup> que foi conferida graças à integração da construção pPICZAαL1H16 no genoma da levedura.

#### **4.12. Seleção de clones pPICZαL1H16 de maior poder de expressão através de indução em *deep-well***

Para a análise da expressão da proteína heteróloga foram selecionadas 10 colônias a partir das placas de transformação, mais uma colônia contendo apenas o vetor pPICZαA como controle negativo. Estas foram submetidas a crescimento em placa *Deep-well* com 1ml de meio BMGY em cada poço por um período de 24h à uma temperatura de 30°C. Após esse período centrifugou-se a placa (10000rpm por 10') e retirou-se o sobrenadante. O pellet formado foi lavado com água milliQ gelada e estéril. Adicionou-se 1ml de meio BMMY em cada poço da placa para indução por 72h à 28°C. A cada 24h desse período foi adicionado 100μl de metanol (100%) em cada poço. Posteriormente esse material foi submetido à uma nova centrifugação e, tanto o sobrenadante quanto o precipitado, foram armazenados à -20°C. O sobrenadante foi tratado com Acetona 100% para precipitação da proteína produzida deixando-a na sua forma mais truncada e pesada possível. Isso auxilia na recuperação e aumento da concentração de proteínas diluídas no meio de cultura. O sobrenadante resultante do processamento das amostras protéicas foi aplicado na membrana de nitrocelulose encaixada ao dispositivo dot-blotter (48 poços). A bomba de sucção foi acoplada e a pressão foi ajustada para 0,8mbar durante uma hora para sensibilização da membrana. Desligou-se a bomba e a membrana foi lavada com 150μl de TBS 1X por 5'. Para o bloqueio utilizou-se solução leite (2,5%) por 40' (150μl). O leite foi retirado com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, a bomba foi religada, e lavou-se novamente a membrana com 150μl de TBS 1X por 5'. Desligou-se a bomba e foi adicionado 50μl de solução com anticorpo Anti-HIS (1:10000 em leite 5%) por 1h à 37°C. Finalmente a membrana foi lavada três vezes com solução TBS-Tween (150μl) por 10'. A revelação foi feita utilizando 100μl de solução NBT-BCIP.

#### 4.13 Extração de RNA total dos recombinantes

O RNA das colônias foi extraído segundo o protocolo fornecido pelo fabricante do Kit *RNeasy mini kit* (Qiagen). Para a lise celular utilizou o método mecânico, com o auxílio de *Glass-beads*, também conforme indicado pelo protocolo da Qiagen. Depois de extraído e quantificado o material foi submetido a um tratamento com DNase (Promega) para evitar a contaminação das amostras com DNA. Utilizou-se 2µl (1µg) do RNA purificado, 1µl do tampão para DNase (RQ1 DNase Reaction Buffer10x - Promega), 1µl de RQ1 RNase-Free DNase (Promega) e 6µl de água livre de nuclease (Promega). Essa reação foi submetida à 37°C por 60', quando foi adicionado 1µl de *RQ1 DNase stop solution* (Promega). Finalmente, a solução foi incubada à 65°C durante 10' para inativação da DNase.

#### 4.14. Síntese de cDNA

À uma alíquota de 4µl do RNA previamente extraído e tratado com DNase foi adicionado 1µl de *Random Primers* (500µg/ml – Promega). Essa reação foi incubada à 70°C por 5' e resfriada no gelo por mais 5'. Também foi preparada uma amostra com os *random primers* adicionados de 4µl de água livre de nuclease (Promega) como controle negativo.

Adicionou-se a essa solução (RNA + *Random Primers* [5µl]) - os seguintes reagentes (Promega) para síntese do cDNA: 4µl de *Improm II 5x Reaction buffer*, 2µl de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 0,75µl de dNTP (10mM), 1µl de Transcriptase Reversa (*Improm II reverse transcriptase*) e 7,25µl de água livre de nuclease (Promega). Duas outras reações foram preparadas substituindo-se a solução de RNA + *Random Primers* por: 5µl de água livre de nuclease (Promega) + *Random Primers* (controle negativo) e uma apenas com os reagentes Promega acima citados (controle da manipulação) para se certificar que não houve contaminação com DNA em nenhuma etapa na síntese do cDNA. Essas soluções foram submetidas a um ciclo de 25°C por 5', 42°C por 60' e 70°C por 15'.

#### **4.15. Reação de RT-PCR (*Reverse Transcriptase Polimerase Chain Reaction*)**

Primers específicos que amplificam uma região interna do fragmento de L1 (500bp) foram desenhados para a confirmação da presença do inserto nas construções. Para a reação de RT-PCR utilizou-se: 5µl de cDNA, 12,5µl de *Master Mix* (Promega), 1,5µl do Primer Interno *Foward*, 1,5µl do Primer Interno *Reverse* e 4,5µl de água livre de nuclease (Promega). Também foi feito um controle negativo sem adição de cDNA. O ciclo utilizado na reação foi: 95°C por 2'; 30 ciclos de 94°C por 1', 55°C por 1' e 72°C por 2'; e uma extensão final de 72°C por 5'.

#### **4.16. Processamento das amostras protéicas (Recuperação da proteína L1 recombinante)**

Ao final das 96 horas de crescimento e indução, 100mL da cultura foram centrifugados (3000 rpm por 30' a 4°C) em tubo estéril de 50 mL. Após a centrifugação, o sobrenadante foi recuperado para posteriores análises imunológicas de detecção direta da proteína recombinante presente no meio extracelular. Para a recuperação do conteúdo protéico presente no meio extracelular foi feita a adição de acetona gelada da seguinte forma: 1 mL do meio de cultura foi misturado a 8 mL de acetona 100% gelada e a suspensão foi acondicionada a -20°C por cerca de 16 horas. Procedeu-se a centrifugação por 20 minutos a 5000rpm e secagem do precipitado a 37°C por 15 minutos. A amostra pôde ser então ressuspensa em tampão de fosfato para uma concentração final de 10X ou ressuspensa diretamente no tampão de amostra com β-mercaptoetanol para corrida SDS-PAGE.

#### **4.17. Análise da produção da proteína L1 por Imunodetecção em Dot-blotter**

As colônias utilizadas na etapa de crescimento e indução, descrita no item 4.2.12, foram utilizadas para uma nova etapa de produção da proteína heteróloga. Repetiu-se todos os

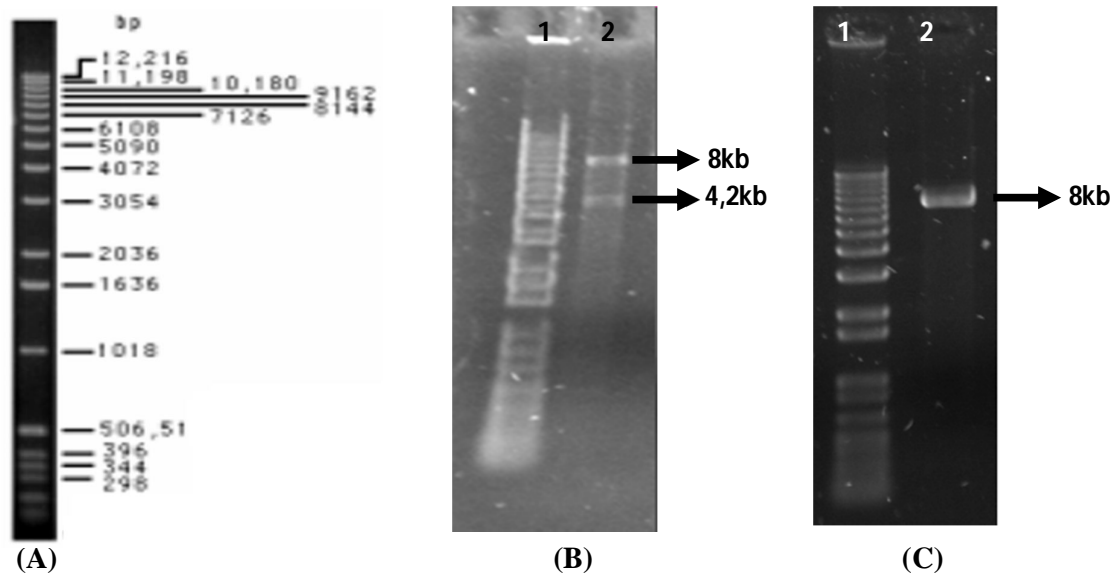


procedimentos contudo, desta vez utilizou-se frascos de 500ml, contendo 50ml de meio BMGY para o período de crescimento e 50ml de meio BMMY para o período de indução.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Extração e Digestão do plasmídeo bacteriano pBR322HPV16

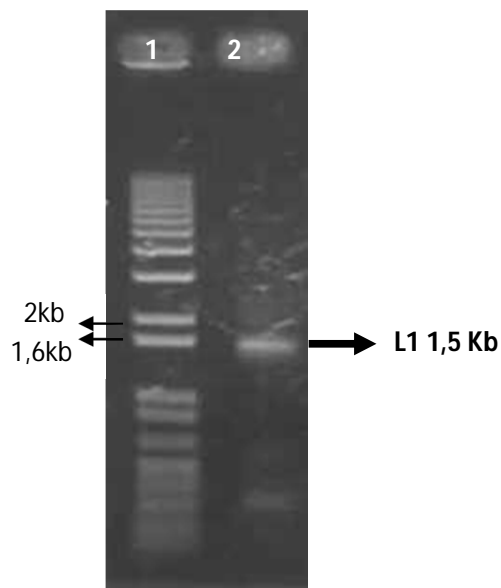
As células de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  transformadas contendo o genoma do HPV 16 clonado em pBR322, foram analisadas através de extração plasmidial (miniprep) e digestão com enzima *Bam*HI (Figura 20). A presença da construção plasmidial pBR322H16 de 12,4Kb, correspondente ao vetor pBR322 (4,2Kb) mais o inserto (genoma viral 8Kb), foi confirmada (Figura 20).



**Figura 20.** (A) Peso das bandas do marcador 1Kb; (B) Extração e digestão de plasmídeo pBR322H16. Poço 1 – marcador 1kb *Plus* , poço 2 – genoma HPV 16 (8 Kb) e pBR322 (4,2 Kb). (C) Genoma purificado, 8 Kb. Poço 1 – marcador 1kb *Plus* , poço 2 – genoma HPV 16 (8 Kb).

## 5.2. Amplificação do gene L1 de HPV 16

Após a digestão e confirmação da presença do genoma viral de HPV 16, o material foi submetido a uma amplificação com oligonucleotídeos específicos (PCR). A reação de ligação foi usada diretamente como *template* da PCR com uma Taq DNA polimerase de alta fidelidade (*Tripple Master* - Invitrogen). O resultado da amplificação foi uma banda de 1,5Kb correspondente ao gene L1 (Figura 21).



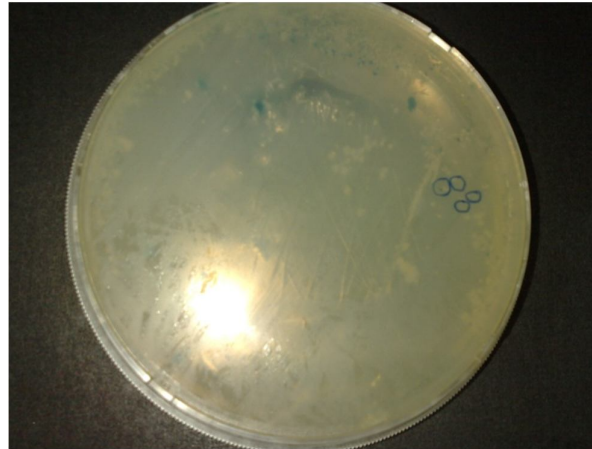
**Figura 21.** Gene L1 amplificado. Poço 1 – gene L1 (1,5 kb), poço 2 – marcador 1kb *Plus*.

## 5.3. Construção do vetor de expressão pPICZA $\alpha$ L1H16

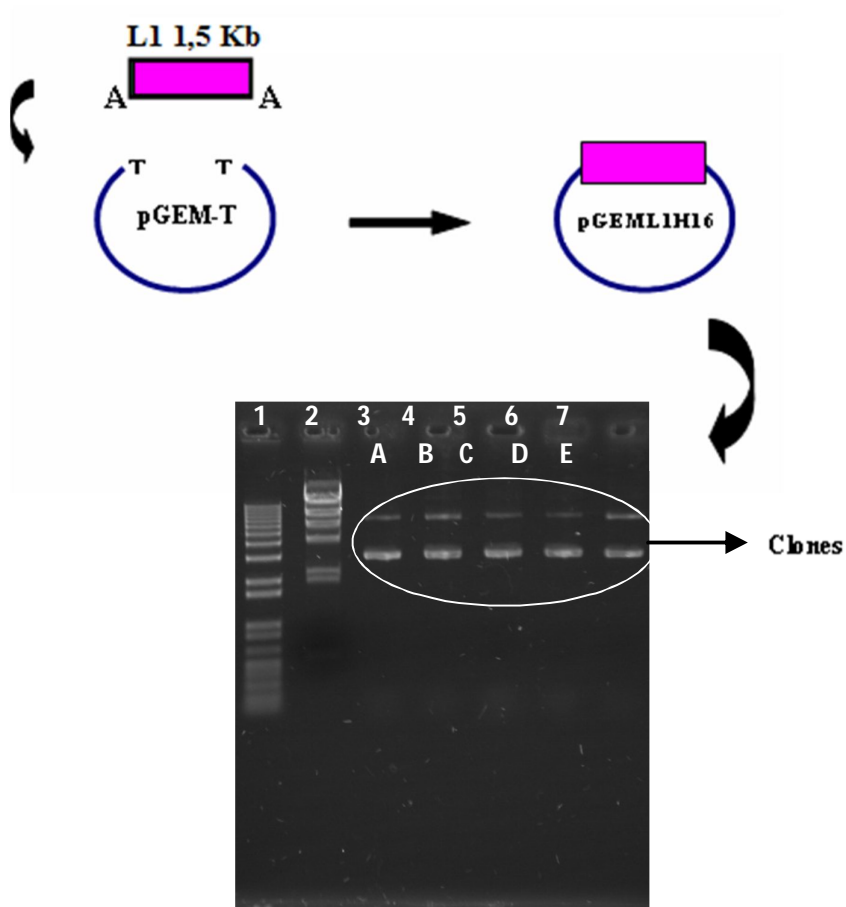
### 5.3.1. Clonagem do gene L1 no vetor pGEM-T.

O gene L1, após PCR com *Taq Tripple Master* e purificação, foi usado em uma reação de ligação ao vetor pGEM-T. Os clones foram obtidos por transformação em placas de meio LB com Xgal, IPTG e ampicilina (Sambrook *et al.*, 1989) e selecionados com relação à resistência ao antibiótico (colônias brancas – figura 22). A partir do inóculo destes repiques

foram realizados extração plasmidial e preservação das células. Cinco clones foram obtidos (colônias A, B, C, D e E – Figura 23).



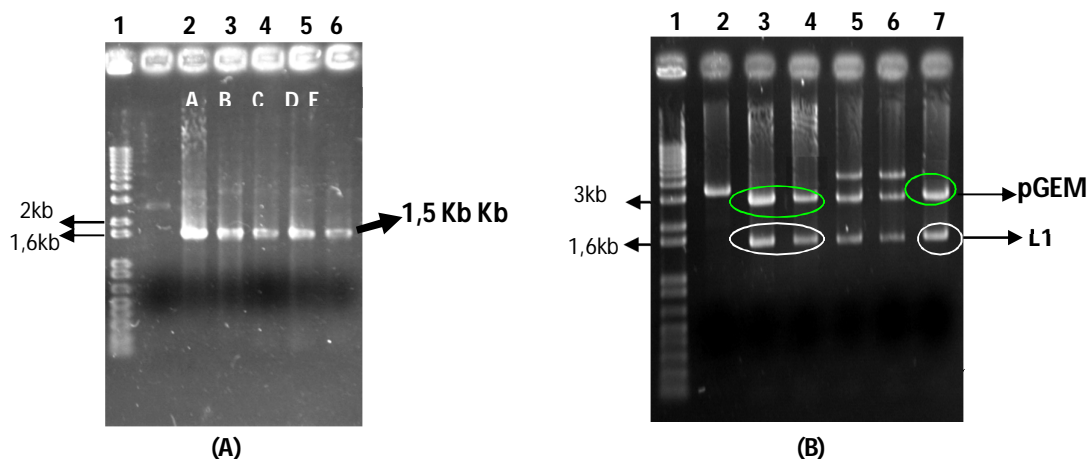
**Figura 22.** Placa LB + Ágar com transformantes de *E. coli*. Colônias brancas – representam possíveis clones com a construção pGEML1B2 em contraste com as colônias azuladas.



**Figura 23.** Extração plasmidial das colônias clonadas com o plasmídeo pGEML1H16. Poço 1 – marcador 1kb Plus marcador de 1Kb; poço 2 – marcador  $\lambda$  HIND III; poços 3, 4, 5, 6 e 7 - pGEM com inserto.

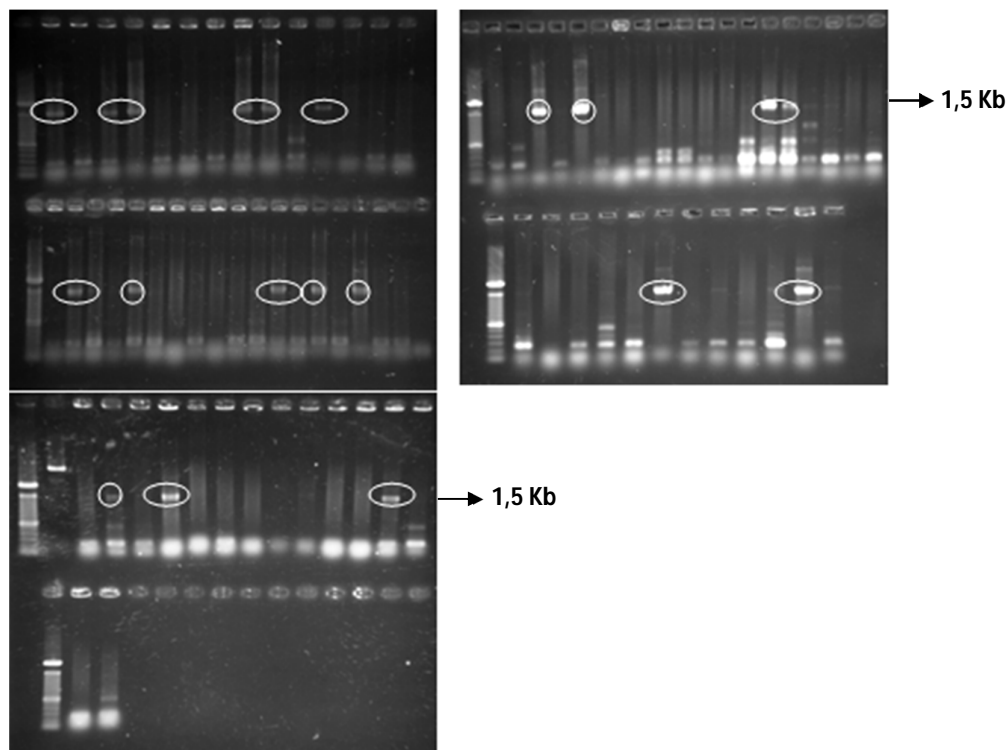
### 5.3.2. Subclonagem de L1 no vetor pPICZA $\alpha$

Após confirmação da construção pGEML1H16 em *E.coli* DH5 $\alpha$ , foi realizada uma extração com o kit *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purifications System* (Promega) para posterior amplificação, purificação e digestão de L1 com as enzimas *Sal*I e *Kpn* I. Paralelamente, o vetor pPICZA $\alpha$  também foi digerido com as mesmas enzimas após sua extração e purificação (Figura 24).



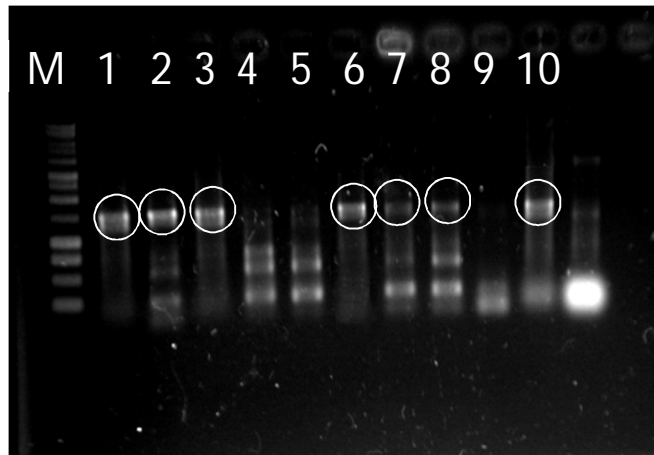
**Figura 24.** (A) PCR das colônias clonadas com o plasmídeo pGEML1H16. Poço 1 – marcador 1kb *Plus*; poços 2, 3, 4, 5 e 6 - gene L1 amplificado. (B) Digestão das colônias clonadas com o plasmídeo pGEML1H16 Poço 1 – marcador 1kb *Plus*; poço 2 – pPICZA $\alpha$  linearizado, poços - 3, 4 e 7 digestão com *Kpn* I e *Sal* I, poços – 5 e 6 digestão parcial.

Os produtos purificados (L1H16 e pPICZA $\alpha$ ) foram ligados com uso da enzima T4 ligase (Promega) e transformados (Sambrook *et al.*, 1989). Um *screening* por PCR de colônias, indicou a possível existência de 20 clones nos quais estaria presente a construção pPICZA $\alpha$ L1H16 (Figura 25). Os oligonucleotídeos utilizados (*Forward* L1H16pPa/ *Reverse* L1H16pPa) amplificam todo o fragmento do gene L1, porém, não garantem a presença do gene íntegro no vetor e são passíveis de apresentar resultados falso-positivos.



**Figura 25.** PCR de colônia, a partir de células de DH5 $\alpha$  transformadas com o produto da subclonagem (L1 +pPICZA $\alpha$ ). Destaque para os possíveis clones; Marcador lambda Hind III.

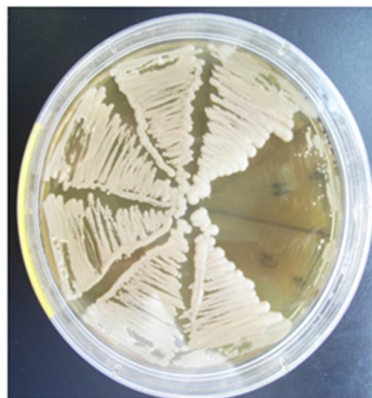
Uma evidência mais segura só é possível pela PCR com os plasmídeos extraídos (Figura 26), o que leva a amplificação do gene L1, caso ele esteja clonado no vetor, permitindo comparar a altura das bandas formadas no gel de agarose por eletroforese. Dessa forma, deduziu-se o tamanho das construções presentes. Foram utilizadas apenas 10 amostras para a PCR, porque foram as únicas, das 20 colônias, que apresentaram resultado positivo, quanto a presença do plasmídeo L1H16pPICZA $\alpha$  após extração.



**Figura 26.** PCR da construção pPICZA $\alpha$  com o gene L1. M – marcador 1kb *Plus* (Promega); poços 1, 2, 3, 6, 7, 8 e 11 – gene L1 HPV 16; poço 9 - controle negativo; poço 10 - controle positivo; poços 4 e 5 – não houve a amplificação do gene L1.

#### 5.4. Transformação de células de *P. pastoris* recombinantes X33/pPICZA $\alpha$ L1H16

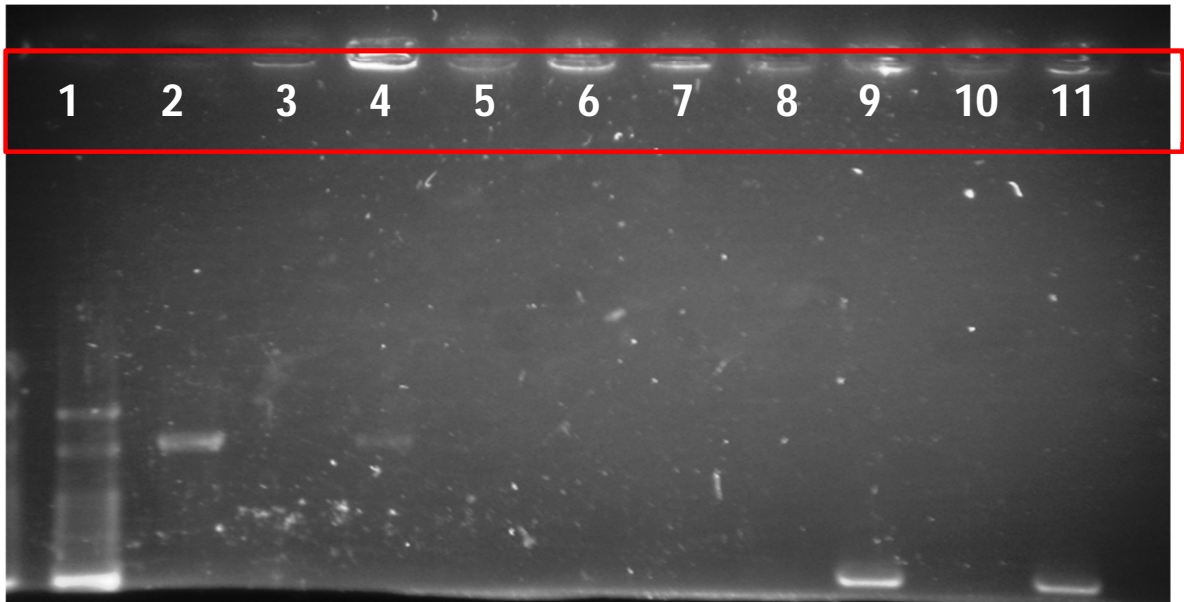
Após a extração, os plasmídeos oriundos de células de *E. coli* recombinantes, foram linearizados por digestão enzimática (*KpnI*) e inseridos por transformação em células de *P. pastoris* por eletroporação (conforme descrito na metodologia). Foram utilizados 5 $\mu$ g da construção pPICZA $\alpha$ L1H16 e também do vetor pPICZA $\alpha$  como controle para expressão.



**Figura 27.** Repiques das colônias de leveduras eletroporadas com a construção pPICZA $\alpha$ L1H16 em placa YPDS com 100  $\mu$ g/mL de Zeocina<sup>TM</sup>

### 5.5. Análise de integração da construção pPICZA $\alpha$ L1H16 ao genoma da levedura por PCR de Colônia

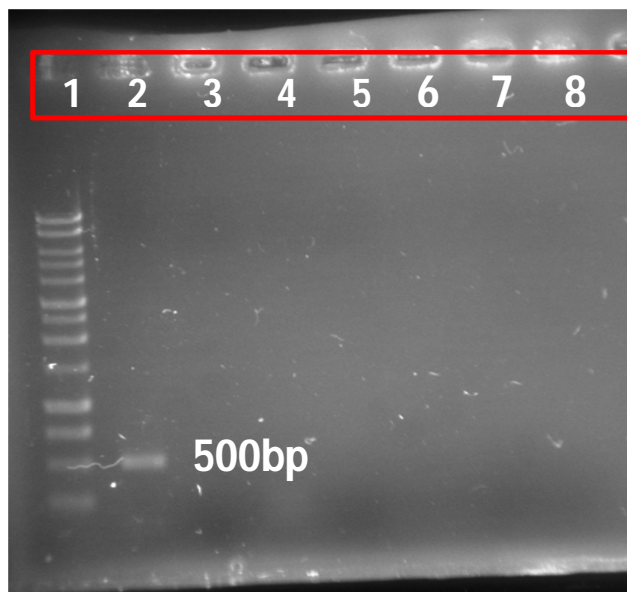
A partir da placa de repique foram selecionados quatro possíveis clones para o *screening* por PCR de Colônias (Figura 28). Às mesmas foram adicionadas tanto primers externos, quanto internos para o gene L1H16.



**Figura 28:** Gel de agarose da PCR de Colônias de *P. pastoris*. (1): Marcador 100bp (Invitrogen); (2, 3, 4 e 5): Tratamento com primers externos para L1H16; (8, 9, 10 e 11): Tratamento com primers internos para L1H16; (6 e 7) controles negativos.

### 5.6. Análise da Expressão do gene L1 por RT-PCR

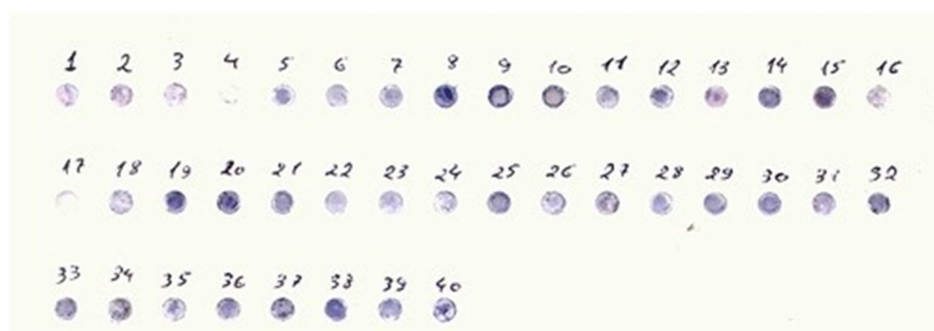
A partir dos resultados obtidos com o *screening* por PCR de Colônias, selecionamos uma amostra para a análise da transcrição de gene L1 através de RT-PCR (Figura 29).



**Figura 29.** Gel representativo da análise da atividade transcricional do gene L1 por RT-PCR a partir de material proveniente dos recombinantes de *P. pastoris* X-33/pPICZA $\alpha$ L1H16 (2) e X-33/pPICZA $\alpha$  (3). Fragmento 500 pb referente à região interna do gene L1 amplificada a partir de RT-PCR. 1- Marcador 1Kb; 4 – Controle Negativo da RT-PCR; 5 – Controle da Manipulação; 6 – Controle negativo do tratamento com Random Primers; 7 – Controle negativo do tratamento com DNase (X33/pPICZA $\alpha$ ) e; 8 – Controle Negativo do tratamento com DNase (X33/pPICZA $\alpha$ L1H16).

### 5.7. Análise da produção da proteína L1 por Imunodeteção em dot-blotter (Indução em *Deep-well*)

A proteína L1 de HPV16 foi produzida com sucesso por algumas colônias de *P. pastoris* segundo o ensaio de Imunodeteção, em placa *Deep-well*, utilizando o anticorpo específico para a cauda de Histidina (anti-HIS) numa diluição de 1:10000, como mostra a imagem da membrana de nitrocelulose (figura 30).

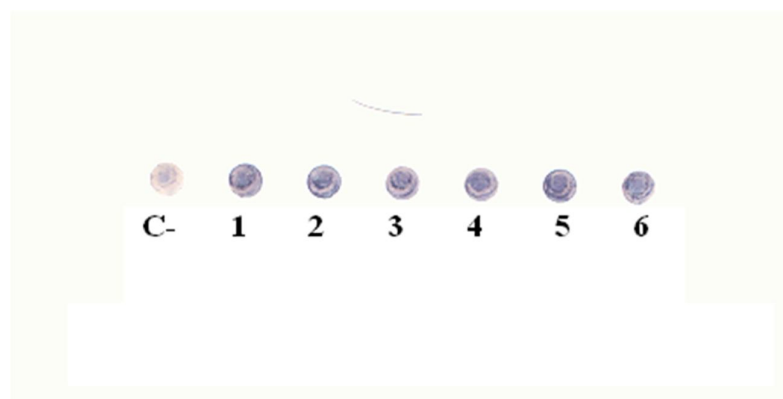


**Figura 30.** Dot blot (*deep-well*) usando anti-HIS (1:10000) conjugado à fosfatase alcalina, com 100 $\mu$ L do sobrenadante de 40 clones pPICZA $\alpha$ L1H16 induzidos durante 72 horas com metanol 1%; Destaque para sinais mais intensos, indicando clones com maior poder de expressão recombinante.



### 5.8. Análise da produção da proteína L1 por Imunodeteção em dot-blotter (Indução em Frascos de 500ml)

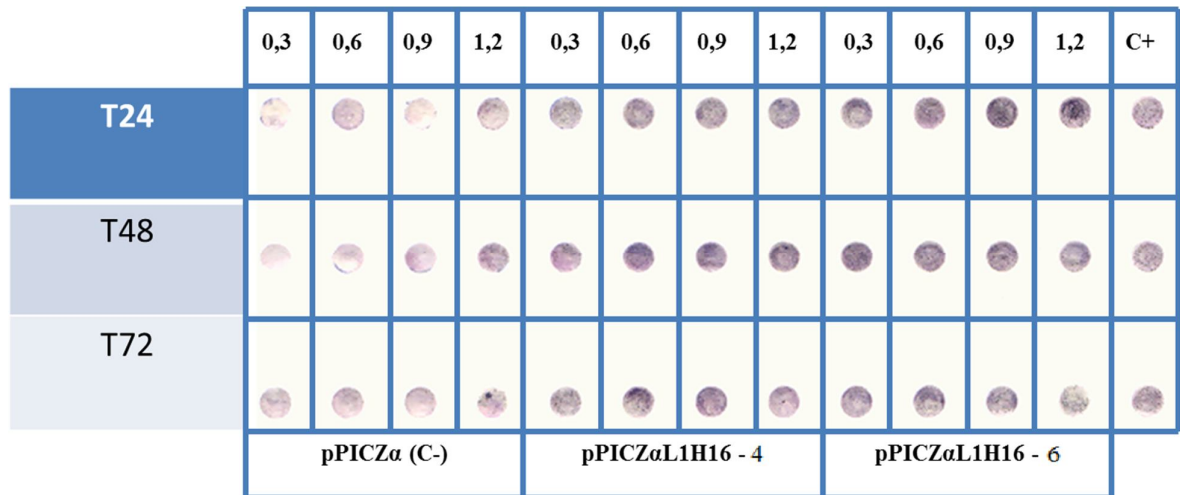
Das 40 colônias analisadas, seis foram escolhidas com base na maior intensidade do sinal para reação com o anticorpo anti-HIS, à olho nu, para uma nova etapa de crescimento e indução em frascos de 500ml, com 50ml de meio BMGY para a fase de crescimento e 50ml de meio BMMY para a fase de indução da produção da proteína heteróloga por adição de metanol 1%. A numeração dos clones desse novo ensaio se deu de maneira aleatória já que os mesmos apresentaram sinais de igual intensidade no ensaio anterior portanto, o clone de número um neste novo ensaio não tem nenhuma relação com o clone de número um no ensaio anterior e assim por diante (Figura 31).



**Figura 31.** Dot blot (frascos 500ml) usando anti-HIS (1:10000) conjugado à fosfatase alcalina, com 100μL do sobrenadante de 6 clones pPICZAαL1H16 induzidos durante 72 horas com metanol 1%. (C-) Clone contendo apenas o vetor pPICZAα.

Das seis colônias utilizadas no Dot Blot anterior, foram selecionadas, aleatoriamente, duas amostras (clones quatro e seis, denominados pPICZAαL1H16-4 e pPICZAαL1H16-6, respectivamente) para realização de um novo Dot Blot a partir dos seus respectivos sobrenadantes. As amostras foram primeiramente quantificadas pelo método de Bradford. Além de um controle negativo (vetor pPICZAα), adicionamos uma amostra contendo HSA clonada no pPICZAα como controle positivo. Foram coletadas alíquotas de cada amostra nos

intervalos de 24h, 48h e 72h contadas a partir do início da fase de indução com Metanol (100%). Após quantificar as amostras no espectrofotômetro, foram aplicados no dot blotter volumes correspondentes às proporções de 0,3, 0,6, 0,9, e 1,2 µg/µl de proteína (figura 32).



**Figura 32.** Dot blot usando anti-HIS (1;10000) conjugado à fosfatase alcalina, com diluições seriadas. (C+ = Amostra contendo HSA clonada no vetor pPICZAα).

## 6. DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar a possibilidade de expressar o gene L1 do HPV 16 em células da levedura *Pichia pastoris* para a produção da proteína L1. Utilizamos o vetor pPICZAα que possui um sinal para expressão extracelular da proteína. A presença da proteína heteróloga no extrato protéico da levedura foi confirmada por análise com anticorpos específicos através do ensaio de Dot Blot com os clones recombinantes que foram positivos para a transcrição do gene L1.

O extrato protéico extracelular do clone com o gene L1 do HPV-16 apresentou uma quantidade pequena de proteínas segundo a visualização no SDS-PAGE. Sabe-se que a levedura *Pichia pastoris* secreta níveis muito baixos de proteínas nativas e esta é uma das vantagens de expressar proteínas heterólogas, já que representa uma vantagem para a

recuperação e a purificação das mesmas a partir do meio de crescimento da levedura (Barr *et al.*, 1992). Outra hipótese para o padrão observado do extrato extracelular é que as proteínas podem ter sofrido degradação proteolítica, processo frequentemente observado com as proteínas recombinantes, secretadas em cultivo com alta densidade celular (Zhang *et al.*, 2007). Acredita-se que a principal causa dessa degradação proteolítica advenha da lise de células mortas que liberam proteases intracelulares para o meio. Estratégias que envolvem a redução de pH e temperatura durante o crescimento demonstram que a degradação proteolítica cai drasticamente, provavelmente por aumento da viabilidade celular (Jahic *et al.* 2003; Jahic *et al.*, 2003).

Dos testes de western blot com o anticorpo anti-His não obtivemos o resultado positivo devido, provavelmente, a um baixo nível de expressão do gene L1. Embora a expressão de proteínas heterólogas em *P. pastoris* possa ser realizada com sucesso em frascos, os níveis de expressão são tipicamente mais baixos com relação àqueles obtidos quando fermentadores são utilizados, nos quais se pode controlar precisamente a demanda oxigênio, além de outros parâmetros (Cereghino, 2002). No presente trabalho, a detecção das proteínas L1 do HPV 16 nos extratos protéicos após indução em frascos, só foi possível através da técnica de Dot Blot utilizando-se anticorpo anti-His para detecção da cauda de poli-histidina (6-his) ligada à proteína com resultados positivos em todas as amostras testadas.

A expressão da albumina (HSA) pelo controle positivo utilizado neste trabalho confirma a eficácia do sistema de produção com as células de *P.pastoris*, induzido por metanol. Sendo assim, as condições estabelecidas de cultivo em frasco, mostraram-se adequadas para o normal funcionamento do mesmo. Este dado reforça a hipótese de que o motivo da não-detecção das proteínas L1 esteja relacionado a um ou mais eventos incluídos no processo de expressão do gene heterólogo.

Para resolver potencialmente o problema de baixa expressão, vários trabalhos citam a necessidade de otimizar o gene heterólogo através do aumento no conteúdo GC e da substituição de códons raros pelos mais frequentemente utilizados em *P.pastoris*. No primeiro caso, A transcrição pode ser terminada se o DNA tem uma alta proporção de bases AT (Romanos, 1995; Sreekrishna *et al*, 1997). Em um estudo relatado por Scorer *et al* (1993) com relação à produção da proteína do envelope de HIV-1, o RNAm era truncado quando expresso em *P. pastoris*, e o sítio de término era semelhante à sequência consenso de levedura 5'TTTTATA. Em vários estudos onde regiões ricas em AT dos genes heterólogos foram retiradas, observou-se um aumento nos níveis de expressão em *Pichia* (Outchkourov *et al*, 2002; Gurkan and Ellar, 2005; Boettner *et al*, 2007; Su *et al*, 2007). Neste trabalho, a transcrição do gene L1 pelos clones recombinantes foi confirmada por RT-PCR, a qual detectou que todos os clones testados foram positivos quanto à transcrição de RNAm de L1. Aumentar a proporção de bases GC no DNA é uma estratégia que pode ser utilizada para melhorar os níveis de expressão.

No segundo caso, diversas publicações (Byrne *et al*, 2000; Valencik & McDonald, 2001; Massaer *et al*, 2001) têm mostrado que a otimização de códons pode melhorar os níveis de expressão através da substituição de códons raros para tradução eficiente em *P. pastoris*. A otimização de genes resulta em altos níveis de expressão, de acordo com vários autores, como Teng *et al* (2007), que aumentaram em 10 vezes a expressão do gene  $\beta$ -1, 3-1, 4 – glucanase de *Bacillus licheniformis* e Outchkourov *et al* (2002), que aumentaram em 20 vezes a expressão de equistatina, um inibidor de proteinase da anêmona-do-mar *Actinia equine*, ambos comparando-se à expressão do gene selvagem utilizando células de *Pichia pastoris*. Desta forma, os baixos níveis de expressão podem ser uma consequência da diferença no uso preferencial de códons em diferentes organismos. Confirmando esta hipótese Bazan *et al* (2009) demonstraram que a expressão da proteína L1 do HPV 16 em *P.pastoris* só foi

possível após a otimização dos códons. Trabalhos anteriores também mostram a presença de fatores inibitórios, identificados entre os primeiros 514 nucleotídeos do gene L1 de HPV 16, que impedem a produção da proteína L1 em células de mamíferos (Collier *et al*, 2002; Schwartz, 2000).

Outro ponto importante a salientar é o uso recente de diferentes promotores que podem ser mais eficazes na expressão de determinadas proteínas. Promotores constitutivos como o GAP e o PGK1 necessitam de glicose como fonte de carbono e podem atingir níveis de maior expressão do que aqueles observados com o promotor AOX1 induzível (Vassileva *et al*, 2001; de Almeida *et al*, 2005; Liu *et al*, 2010).

## **7. CONCLUSÃO**

Os dados obtidos no presente trabalho mostraram que a levedura metilotrófica *P. pastoris* é capaz de produzir, de modo extracelular, a proteína L1 de HPV16, a partir do cassete de expressão pPICZA $\alpha$ L1H16, utilizando como única fonte de carbono o Metanol. Esta etapa é crucial para a produção de VLPs visando o desenvolvimento de uma estratégia vacinal mais barata e eficiente contra a infecção por HPV.

## 8. 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.

Bosch FX and de Sanjose S (2003) Chapter 1: human papillomavirus and cervical cancerburden 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 viruslike 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 clathrindependent 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 behavior 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, Muñoz 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, Bonnez 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.

Frattini 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](http://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 methylophilic 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.

Kisseljev 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 BovinePapillomavirus 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 MIA, 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.

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):438-448.

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](http://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](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 (2004) 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) Differentiationlinked 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: activeandlatent 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 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. *Biotechnol Cienc Desenvol* 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/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, Trimbois 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 multicenter 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, Ronsink 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.