

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia  
Área de Fisiopatologia e Toxicologia

Expressão e caracterização da glicoproteína D do HSV-1  
geneticamente fusionada às oncoproteínas E6 e E7 do HPV-16 e  
HPV-18 (gDE7E6) em células de mamífero

Tácita Borges Barros

Dissertação para obtenção do Título de  
Mestre

Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup> Irene da Silva Soares

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup> Bruna Felício Milazzotto  
Maldonado Porchia Ribeiro

São Paulo

2019

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia  
Área de Fisiopatologia e Toxicologia

Expressão e caracterização da glicoproteína D do HSV-1  
geneticamente fusionada às oncoproteínas E6 e E7 do HPV-16 e  
HPV-18 (gDE7E6) em células de mamífero

Tácita Borges Barros

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018/2011

Dissertação para obtenção do Título de  
Mestre

Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup> Irene da Silva Soares

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup> Bruna Felício Milazzotto  
Maldonado Porchia Ribeiro

São Paulo

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

**Ficha Catalográfica**

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e  
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:  
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

Barros, Tácia Borges  
B277e Expressão e caracterização da glicoproteína D do HSV-1  
geneticamente fusionada às oncoproteínas E6 e E7 do HPV-16  
e HPV-18 (gDE7E6) em células de mamífero / Tácia Borges  
Barros. -- São Paulo, 2019.  
88p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas  
e Toxicológicas.

Orientador: Soares, Irene da Silva

1. Colo uterino : Câncer 2. Pichia pastoris 3. Células de  
mamíferos 4. Proteína recombinante I. T. II. Soares, Irene da  
Silva, orientador.

616.99466 CDD

Tácita Borges Barros

Expressão e caracterização da glicoproteína D do HSV-1  
geneticamente fusionada às oncoproteínas E6 e E7 do HPV-16 e  
HPV-18 (gDE7E6) em células de mamífero

Comissão Julgadora

da

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr.

orientador/presidente

---

1º. examinador

---

2º. examinador

---

3º. examinador

---

4º. examinador

São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2019.

Dedico este trabalho

Aos meus pais, Valdenita e Zulmar.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, pela dádiva da vida e por me guiar, iluminar e tranquilizar diante das dificuldades.

Aos meus pais, Valdenita e Zulmar, meu infinito agradecimento. Sem vocês esse trabalho não teria o mesmo valor. Muito obrigada por todo amor, apoio, incentivo e por sempre acreditarem no meu potencial, amo vocês de todo meu coração.

À minha orientadora, professora Dr<sup>a</sup> Irene, pela paciência, disponibilidade em ajudar, exemplo de competência, muito obrigada pela oportunidade e por confiar em mim para desenvolver este trabalho.

À Bruna, muito obrigada por ter me acolhido e aceitado ser minha co-orientadora. Obrigada pela parceria, pelas horas investidas delineando experimentos, por toda ajuda e palavras de conforto diante das dificuldades. Você é um exemplo de serenidade para mim!

Ao professor Dr. Luís Carlos, obrigada pela primeira oportunidade de estágio e por toda ajuda e orientações imprescindíveis para desenvolvimento deste trabalho.

À professora Dr<sup>a</sup> Rita de Cássia pelos conselhos, amizade e risadas.

À professora Dr<sup>a</sup> Mari Cleide, do NUCEL, obrigada pelo espaço concedido em seu laboratório para realização de parte deste trabalho e pelo conhecimento compartilhado. Ao Dr. Marcos Demasi, obrigada pela disponibilidade para idealização dos experimentos com células CHO, pela paciência na explicação e pelo tempo dedicado. Ao Luís Pomatay, obrigada por me acompanhar e ensinar sobre cultivo de células, sua ajuda foi muito importante.

À professora Dr<sup>a</sup> Ana Maria Moro, do Instituto Butantan, obrigada pela colaboração e por abrir as portas do seu laboratório para realização dos experimentos de clonagem. A Dr<sup>a</sup> Mariana Lopes, obrigada pela disponibilidade e por me acompanhar nos experimentos.

Às HPVetes: Bruna, Luana, Mariana, Jamile, Carol, Angel, Pati, Naty, Karine e Roberta. Obrigada por todo apoio, parceria, amizade, ajuda nos experimentos, conversas sérias e risadas.

Aos amigos do LDV: Lennon, Aléxia, Samuel, Nayara, Fagner, Lukas, Rubens, Deni, Robert, Dalva, Helic, Marianna, Mônica, Sara, Juliana e Maria Fernanda. Obrigada pelos momentos de risadas e café, com certeza vocês fazem o ambiente de trabalho mais leve e divertido.

Aos técnicos, Kátia e Eduardo, obrigada pela eficiência, responsabilidade e por toda ajuda técnica.

Às agências de financiamento CAPES, CNPq e FAPESP, pelo apoio financeiro.

A todos que colaboraram durante minha caminhada, meus sinceros agradecimentos!

Este trabalho é resultado de uma parceria entre o Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas (LDV) no Instituto de Ciências Biomédicas II (ICB), chefiado pelo Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira e o Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, chefiado pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Irene da Silva Soares, com o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).



*“O sucesso é a soma de pequenos esforços repetidos dia após dia.”*

*Robert Collier*

## RESUMO

BARROS, T. B. **Expressão e caracterização da glicoproteína D do HSV-1 geneticamente fusionada às oncoproteínas E6 e E7 do HPV-16 e HPV-18 (gDE7E6) em células de mamífero.** 2019. 88f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

O câncer cervical é um dos tipos de câncer mais comuns entre as mulheres, e a infecção persistente pelos HPV-16 e HPV-18 é responsável por 70% dos casos. As vacinas profiláticas disponíveis possuem alta eficácia na prevenção da infecção pelos tipos mais prevalentes de HPV. No entanto, este tipo de abordagem não beneficia mulheres que já apresentam lesões precursoras ou tumores cervicais avançados, e a busca por abordagens terapêuticas para esse tipo de câncer é considerada uma necessidade. A qualidade do antígeno representa um aspecto fundamental para o sucesso de vacinas terapêuticas baseadas em proteínas recombinantes. Neste sentido, os sistemas de expressão em células eucarióticas, como leveduras e células de mamíferos são considerados adequados para a produção de proteínas com aplicação biotecnológica. O objetivo principal deste trabalho contemplou a expressão das proteínas de fusão gDE7E6 do HPV-16 e do HPV-18 e a oncoproteína E7 do HPV-16 em células da levedura *Pichia pastoris* e expressão da gDE7E6 do HPV-16 e do HPV-18 em células de mamífero HEK293T e CHODG-44 para obtenção de antígenos purificados com futura aplicação em vacinas terapêuticas contra tumores associados ao HPV-16 e HPV-18. Os genes que codificam as proteínas gDE7E6 dos HPV-16 e HPV-18 e da E7 do HPV-16 foram clonados no vetor pPIC9K, os quais foram linearizados por digestão enzimática e utilizados na transformação da *P. pastoris*. A expressão das proteínas foi analisada nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas, no entanto, não foi observada a produção das proteínas no sobrenadante e nem no lisado celular. Diante desta constatação, iniciamos a expressão das proteínas gDE7E6 do HPV-16 e gDE7E6 do HPV-18 em células de mamíferos HEK293T e CHODG-44. As sequências genéticas das proteínas gDE7E6 do HPV-16 e do HPV-18 foram clonadas no vetor de expressão pNU1 e analisadas por digestão enzimática. Análises de SDS-PAGE e *western blot* demonstraram a expressão das proteínas gDE7E6 do HPV-16 e do HPV-18 em até 96 horas em células HEK293T. Em paralelo, realizamos a transfecção estável dos plasmídeos contendo as sequências da gDE7E6 do HPV-16 e gDE7E6 do HPV-18 em células CHO-DG44. Com o intuito de aumentar a expressão das proteínas de interesse na população mista de CHODG-44, realizamos amplificação genômica com metotrexato (MTX), sendo possível observar aumento da expressão das proteínas, conforme aumento gradativo nas concentrações de MTX. Posteriormente, foram feitas tentativas para isolar um clone produtor das proteínas gDE7E6 HPV-16 e HPV-18, através de clonagem por diluição limitante e sistema automatizado, sendo possível isolar um clone para cada construção através de matriz semisólida, confirmado por *western blot* e citometria de fluxo. Apesar de demonstrar a expressão das proteínas de interesse em sistema de expressão baseado em células de mamífero, o rendimento obtido após a purificação por afinidade ao níquel foi extremamente baixo, o que dificulta a obtenção dos antígenos para fins vacinais.

**Palavras-Chaves:** Câncer de colo de útero, *Pichia pastoris*, Células de mamífero, Proteína recombinante.

## ABSTRACT

BARROS, T. B. **Expression and characterization of the genetically fused HSV-1 glycoprotein D to E6 and E7 oncoproteins HPV-16 e HPV-18 (gDE7E6) in mammalian cells.** 2019. 88f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Cervical cancer is one of the most common cancers among women, and persistent infection with HPV-16 and HPV-18 accounts for 70% of the cases. Available prophylactic vaccines are highly effective in preventing infection by the most prevalent types of HPV. However, this type of approach does not benefit women who already have precursor lesions or advanced cervical tumors, and the search for therapeutic approaches to this type of cancer is considered a necessity. Antigen quality represents a key aspect for the success of therapeutic vaccines based on recombinant proteins. In this sense, expression systems based in eukaryotic cells such as yeast and mammalian cells are considered suitable for the production of proteins with biotechnological applications. The main objective of this work was to express the gDE7E6 fusion proteins HPV-16 and HPV-18 and the E7 oncoprotein HPV-16 in *Pichia pastoris* and expression of gDE7E6 HPV-16 and HPV-18 in mammalian cells HEK293T and CHODG-44 to obtain purified antigens with future applications in therapeutic vaccines against HPV-16 and HPV-18 associated tumors. The genes encoding the gDE7E6 proteins HPV-16 and HPV-18 and E7 HPV-16 were cloned into the pPIC9K vector, which were linearized by enzymatic digestion and used in the transformation of *P. pastoris*. Expression of the proteins was analyzed at 24, 48, 72 and 96 hours, however, the production of the proteins in the supernatant and in the cell lysate was not observed. In light of this finding, we initiated the expression of gDE7E6 proteins HPV-16 and HPV-18 in mammalian cells HEK293T and CHODG-44. The genetic sequences of gDE7E6 proteins HPV-16 and HPV-18 were cloned into the pNU1 expression vector and analyzed by enzymatic digestion. SDS-PAGE and western blot analyzes demonstrated expression of gDE7E6 proteins HPV-16 and HPV-18 within 96 hours in HEK293T cells. In parallel, we performed stable transfection of plasmids containing gDE7E6 HPV-16 and HPV-18 sequences into CHO-DG44 cells. In order to increase the expression of the proteins in the mixed population of CHO-DG44, we performed genomic amplification with methotrexate (MTX), and it was possible to observe an increase in protein expression, as a gradual increase in MTX concentrations. Therefore, attempts were made to isolate a clone producing gDE7E6 proteins HPV-16 and HPV-18 by limiting dilution and automated system, being possible to isolate one clone for each construct through a semisolid matrix, confirmed by western blot and flow cytometry. Despite observing protein expression in mammalian cell-based expression system, the yield obtained after nickel affinity purification was extremely low, which makes it difficult to obtain the antigens for vaccine purposes.

**Key words:** Cervical cancer, *Pichia pastoris*, Mammalian cells, Recombinant protein.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Sinais promovidos por HVEM são bidirecionais.....	21
<b>Figura 2.</b> Digestão dos plasmídeos pPIC9KgDE7E6 HPV-16, pPIC9KgDE7E6 HPV-18 e pPIC9KE7 HPV-16 .....	44
<b>Figura 3.</b> Digestão dos plasmídeos pPIC9KgDE7E6 HPV-16 e 18 com <i>Sall</i> e <i>BglI</i> ....	45
<b>Figura 4.</b> Avaliação da expressão de gDE7E6 HPV-16 e 18 (24 horas) em sobrenadante concentrado de culturas de <i>P.pastoris</i> .....	46
<b>Figura 5.</b> Avaliação da expressão de gDE7E6 HPV 16 e 18 a partir do extrato de <i>P. pastoris</i> com tempo de expressão de 24 horas por SDS-PAGE e <i>western blot</i> .....	47
<b>Figura 6.</b> Avaliação da expressão da E7 HPV 16 no sobrenadante de cultura de <i>P. pastoris</i> com tempos de expressão de 24, 48, 72, 96 horas.....	47
<b>Figura 7.</b> Digestão dos plasmídeos pUC57gDE7E6 HPV-16 e pUC57gDE7E6 HPV-18 .....	48
<b>Figura 8.</b> Digestão dos plasmídeos pNU1gDE7E6 HPV-16 e pNU1gDE7E6 HPV-18. ....	49
<b>Figura 9.</b> Cromatograma da purificação por afinidade ao níquel das proteínas recombinantes gDE7E6 HPV-16 e gDE7E6 HPV-18.....	50
<b>Figura 10.</b> Avaliação da purificação das proteínas recombinantes gDE7E6 HPV-16 e gDE7E6 HPV-18 por SDS-PAGE.....	51
<b>Figura 11.</b> Avaliação da purificação das proteínas recombinantes gDE7E6 HPV-16 e gDE7E6 HPV-18 por SDS-PAGE e <i>western blot</i> .....	51
<b>Figura 12.</b> Adaptação da linhagem celular HEK293T ao meio livre de soro.....	52
<b>Figura 13.</b> Seleção das células CHODG-44 transfectadas através da avaliação da porcentagem de células viáveis, no período de 30 dias.....	53
<b>Figura 14.</b> Avaliação da amplificação genômica com MTX por <i>western blot</i> revelado por quimiluminescência utilizando anticorpo primário anti-gD (ID-3).....	55
<b>Figura 15.</b> (A) Cromatograma da purificação por afinidade ao níquel da proteína recombinante gDE7E6 HPV-16 (B) <i>western blot</i> revelado por quimiluminescência utilizando anticorpo primário anti-gD (ID-3).....	56
<b>Figura 16.</b> <i>western blot</i> revelado por quimiluminescência utilizando anticorpo primário anti-gD (ID-3).....	57
<b>Figura 17.</b> Avaliação de células CHODG-44 produtoras de gDE7E6 HPV-16 e HPV-18 marcadas com anti-gD FITC dentro da população mista e clone.....	58

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Adaptação sequencial em meio livre de SFB utilizado para linhagem celular HEK293T .....	38
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AOX – Álcool oxidase
- BTLA – *B and T lymphocyte attenuator* (atenuador de linfócitos B e T)
- CHO – *Chinese hamster ovary cell* (células de ovário de hamster chinês)
- DHFR – Dihidrofolato redutase
- ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ensaio de imunoabsorção enzimática)
- gD – glicoproteína D
- HEK – *Human Embryonic Kidney cell* (células de rim embrionário humano)
- HIS4 – Histidinol desidrogenase
- HPV – *Human papilloma virus* (vírus do papiloma humano)
- HSV – *Herpes simplex virus* (vírus herpes simplex)
- HT – Hipoxantina/timidina
- HVEM – *Herpes Virus Entry Mediator* (mediador de entrada do vírus herpes)
- ICB – Instituto de Ciências Biomédicas
- INCA – Instituto Nacional do Câncer
- IRES – *Internal ribosome entry site* (sítio interno de entrada no ribossomo)
- LB – Meio Luria-Bertani
- LDV – Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas
- MTX – Metotrexato
- PBS- *Phosphatase buffered saline* (tampão salina fosfato)
- PEI – Polímero catiônico linear
- PDI – Dissulfeto isomerase
- PMSF – Fluoreto de fenilmetilsulfonil
- pRB – Proteína retinoblastoma
- RE – Reticulo endoplasmático
- SFB – Soro fetal bovino
- SV40 – Vírus vacuolante símio 40
- SUS – Sistema Único de Saúde
- TNFR – Fatores de necrose tumoral
- VLPs – *Virus like particles* (partículas semelhantes a vírus)

## LISTA DE SÍMBOLOS

% – porcentagem

® – marca registrada

G- força gravitacional

V- voltagem

g – grama

ng – nanogramas

µg – micrograma

mL – mililitro

µL – microlitro

m/v – massa/volume

mg – miligrama

M – molar

mM – milimolar

nM – nanomolar

seg – segundos

ms – milissegundo ( $10^{-3}$  segundos)

°C – graus Celsius

cm<sup>2</sup> – centímetros quadrados

RPM – rotação por minuto

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
1.1 VÍRUS DO PAPILOMA HUMANO (HPV) E CÂNCER CERVICAL .....	17
1.2 HPV E VACINAS .....	18
1.3 GLICOPROTEÍNA D (gD) DO VÍRUS HERPES SIMPLES 1 (HSV-1).....	20
1.4 SISTEMA DE EXPRESSÃO BASEADO EM <i>P. PASTORIS</i> .....	22
1.5 SISTEMA DE EXPRESSÃO BASEADO EM CÉLULAS DE MAMÍFERO .....	26
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>31</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>32</b>
<b>3.1 ESTRATÉGIAS DE EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS gDE7E6 HPV-16, gDE7E6 HPV-18 E E7 HPV-16 EM <i>P. PASTORIS</i> .....</b>	<b>32</b>
3.1.1 Vetores de clonagem e transformação de <i>Escherichia coli</i> ( <i>E.coli</i> ).....	32
3.1.2 Confirmação dos clones positivos .....	32
3.1.3 Extração do DNA plasmidial, linearização e precipitação da construção .....	32
3.1.4 Eletroporação da levedura <i>P. pastoris</i> .....	33
3.1.5 Seleção dos recombinantes positivos .....	33
3.1.6 Expressão das proteínas em <i>P. pastoris</i> .....	33
3.1.7 Concentração das proteínas secretadas no sobrenadante.....	34
3.1.8 Lise celular do <i>pellet</i> .....	34
<b>3.2 ESTRATÉGIAS DE EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS gDE7E6 HPV-16 E gDE7E6 HPV-18 EM CÉLULAS HEK293-T .....</b>	<b>35</b>
3.2.1 Vetores de clonagem .....	35
3.2.2 Digestão das construções gDE7E6 HPV 16 e 18 e vetor pNU1 .....	35
3.2.3 Purificação do DNA a partir de gel de agarose e reação de ligação gDE7E6 dos HPV's 16 e 18 no vetor pNU1 .....	36
3.2.4 Eletroporação da bactéria <i>E. coli</i> XL10Gold.....	36
3.2.5 Seleção dos clones recombinantes e extração de DNA plasmidial .....	36
3.2.6 Confirmação dos clones positivos .....	36
3.2.7 Transfecção transitória de células HEK293T .....	37
3.2.8 Purificação das proteínas gDE7E6 HPV-16 e HPV-18 por cromatografia de afinidade ao níquel.....	37
3.2.9 Adaptação de células HEK293T a meio livre de SFB.....	37



<b>3.3 ESTRATÉGIAS DE EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS gDE7E6 HPV-16 E gDE7E6 HPV-18 EM CÉLULAS CHODG-44 .....</b>	<b>39</b>
3.3.1 Transfecção estável de células CHODG-44 em suspensão .....	39
3.3.2 Avaliação das células CHODG-44 transfectadas .....	39
3.3.3 Clonagem das células CHODG-44 transfectadas por diluição limitante .....	39
3.3.4 Amplificação genômica com MTX .....	40
3.3.5 Expansão das células CHODG-44 gDE7E6 HPV-16 em <i>spinner</i> .....	40
3.3.6 Purificação da proteína gDE7E6 HPV-16 por cromatografia de afinidade ao níquel .....	40
3.3.7 Clonagem em sistema automatizado .....	41
3.3.8 Avaliação da expressão de gDE7E6 HPV-16 e gDE7E6 HPV-18 em células CHODG-44 por citometria de fluxo .....	41
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>43</b>
<b>4.1 ESTRATÉGIAS DE EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS gDE7E6 DO HPV-16, gDE7E6 DO HPV-18 E E7 HPV-16 EM <i>P. PASTORIS</i>.....</b>	<b>43</b>
<b>4.2 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS gDE7E6 HPV-16 E gDE7E6 HPV-18 EM CÉLULAS HEK293T.....</b>	<b>48</b>
<b>4.3 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS gDE7E6 HPV-16 E gDE7E6 HPV-18 EM CÉLULAS CHODG-44.....</b>	<b>53</b>
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>59</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>66</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>67</b>
<b>APÊNDICE – A .....</b>	<b>82</b>
<b>APÊNDICE – B.....</b>	<b>83</b>
<b>APÊNDICE – C .....</b>	<b>83</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 VÍRUS DO PAPILOMA HUMANO (HPV) E CÂNCER CERVICAL

Em 1970, a associação entre HPV e câncer cervical foi descrita pela primeira vez por Harald zur Hausen (NOUR, 2009). Nos dias atuais, se sabe que a origem de alguns tipos de câncer, principalmente os anogenitais e de orofaringe, estão relacionados com a infecção persistente pelo HPV (BURD & DEAN, 2016). Dentre estes, o câncer cervical é o mais frequentemente associado, sendo o quarto tipo de câncer mais letal em mulheres no mundo (WHO, 2019). Aproximadamente 570 mil mulheres foram diagnosticadas com câncer cervical em 2018, representando 6,6% de todos os casos de câncer em mulheres, sendo em 2012 cerca de 266 mil mortes em decorrência desta doença (WHO, 2019). De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), foram registrados 72 mil novos casos em 2013 na América Latina e, no Brasil, foi estimado 16.370 novos casos em 2018.

Atualmente estão descritos mais de 200 genótipos de HPV, sendo que 40 genótipos são capazes de infectar a região anogenital e 12 genótipos são classificados como carcinogênicos, de acordo seu potencial oncogênico (MA et al., 2012; BURD & DEAN, 2016). De acordo com a capacidade destes vírus de induzir lesões, eles podem ser classificados em genótipos de baixo e alto risco. Os HPVs de baixo risco estão associados às verrugas genitais, sendo os genótipos 6 e 11 responsáveis por 90% dos casos (PITISUTTITHUM et al., 2015). Os HPVs de alto risco são encontrados em virtualmente todos os casos de tumores cervicais, sendo os genótipos 16 e 18 associados a 70% destes tumores (CROSBIE et al., 2013; PITISUTTITHUM et al., 2015; EGGERSMANN et al., 2019; ZENG et al., 2019)(PITISUTTITHUM; VELICER; ALAIN LUXEMBOURG, 2015).

O genoma circular do HPV é composto por 8 genes expressos na fase inicial (L1 e L2) e tardia (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) do ciclo viral. As proteínas do capsídeo (L1 e L2) facilitam a entrada na camada basal dos queratinócitos, além disso a L2 auxilia na integração do genoma viral na célula hospedeira, onde a replicação acontece via E1/E2, bem como através da maquinaria de replicação da célula hospedeira. A integração viral ocorre na região de E1/E2, causando a deleção da sequência gênica de E2, que resulta em perda do controle do *feedback* e superexpressão dos oncogenes E6/E7, bem como silenciamento dos genes iniciais que são necessários para regulação da replicação viral. A superexpressão de E6/E7 leva a progressão da carcinogênese, através da replicação do

DNA viral nas camadas mais profundas do epitélio (BURD,2003; YUGAWA & KIYONO, 2009; CROSBIE et al.,2013; FANG et al.,2014; BURDEN & DEAN, 2016).

A maioria das infecções por HPV é transiente, cerca de 50% são eliminadas em 1 ano e 90% em até 2 anos sem qualquer intervenção em indivíduos imunocompetentes (MOSCICKI et al.,2004; BURDEN & DEAN, 2016; EGGERSMANN et al., 2019). No entanto, nos casos em que a infecção é persistente, através da superexpressão dos oncogenes E6/E7 por anos ou décadas, podem ocorrer modificações no epitélio cervical dando origem a neoplasias intraepiteliais cervicais ou lesões intraepiteliais escamosas, que na maioria dos casos, são assintomáticas e diagnosticadas pelo exame de Papanicolau. Se não diagnosticadas, as lesões precursoras podem evoluir para lesões de alto grau e carcinoma cervical in situ, ainda localizado (EGGERSMANN et al., 2019).

## 1.2 HPV E VACINAS

Na maioria dos países em desenvolvimento, o controle e programas de triagem não são suficientes para prevenir a evolução das lesões precursoras induzidas pela infecção pelo HPV. Dessa forma, o desenvolvimento de vacinas tem se tornado uma questão importante. A prevenção da infecção pelos HPVs de alto risco é uma intervenção atraente para reduzir a frequência de lesões precursoras e do câncer cervical a longo prazo. Atualmente existem 3 vacinas preventivas baseadas em *Virus like Particles* (VLPs) disponíveis no mercado, a bivalente Cervarix<sup>®</sup> (Glaxo Smith&Kline), a quadrivalente Gardasil<sup>®</sup> (Merck Sharp&Dohme) e nonavalente Gardasil 9<sup>®</sup> (Merck Sharp&Dohme) (ZENG et al., 2019). A Cervarix<sup>®</sup> é composta por VLPs dos genótipos 16 e 18 e é produzida em sistema de expressão de baculovírus em células de inseto (*Spodoptera frugiperda*) (HARPER & VIERTHALER, 2011). A quadrivalente Gardasil<sup>®</sup> é composta por VLPs dos 4 genótipos de HPVs, sendo 2 de alto risco (16 e 18) e 2 de baixo risco (6 e 11), produzidas em leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (VILLA et al., 2005). A nonavalente Gardasil 9<sup>®</sup> é composta por VLPs dos genótipos 16, 18, 6, 11, 31, 33, 45, 52, 58, produzida em leveduras *S. cerevisiae* (MOREIRA et al., 2018).

No Brasil, a Cervarix<sup>®</sup> e a quadrivalente Gardasil<sup>®</sup> foram registradas na ANVISA em 2006 e a nonavalente Gardasil 9<sup>®</sup> em 2017, sendo a quadrivalente Gardasil<sup>®</sup> distribuída pelo Sistema Único de Saúde (SUS) desde 2014. Essas vacinas conferem proteção contra os genótipos virais mais frequentemente associados ao câncer cervical e às verrugas genitais, estimulando a produção de anticorpos neutralizantes contra proteínas do capsídeo viral e prevenindo a entrada do vírus na célula (MAHDAVI & MONK,

2005). Espera-se então que os indivíduos imunizados com tais vacinas estejam protegidos contra a infecção viral. Apesar da alta eficiência, tais vacinas apresentam um custo elevado de produção e não são capazes de regredir lesões precursoras e tumores cervicais estabelecidos (PITISUTTITHUM et al., 2015). Os tratamentos convencionais para mulheres que apresentam tumores induzidos por HPV incluem quimioterapia, radioterapia ou cirurgia. Tais intervenções são consideradas agressivas e invasivas, além de apresentarem baixa eficácia em lesões avançadas (MAHDAVI & MONK, 2005).

Neste contexto, as vacinas terapêuticas (uma modalidade de imunoterapia ativa) podem contribuir para o controle de tumores induzidos pelo HPV por meio da ativação de uma resposta imunológica específica, principalmente de linfócitos T CD8<sup>+</sup> efetores. Estes linfócitos possuem a capacidade de controlar tumores induzidos pelo HPV e impedir o avanço tumoral no epitélio cervical (MAHDAVI & MONK, 2005). As oncoproteínas E6 e E7 do HPV-16 são consideradas antígenos ideais para vacinas terapêuticas contra tumores cervicais por serem expressas constitutivamente em células infectadas e tumorais. Algumas das estratégias terapêuticas em desenvolvimento são baseadas em: vetores virais vivos, proteínas recombinantes purificadas, DNA, peptídeos e células dendríticas. Ainda não existem vacinas terapêuticas para tumores induzidos pelo HPV no mercado, mas diversas estratégias estão sendo estudadas e algumas se encontram em fase clínica (BRINKMAN et al., 2007; BURDEN & DEAN, 2016). Diversos estudos já demonstraram a indução de respostas imunológicas específicas contra antígenos do HPV, como anticorpos, células T CD4<sup>+</sup> ou T CD8<sup>+</sup>, mas a regressão completa das lesões ainda precisa ser demonstrada (DE JONG et al., 2002; GOLDSTONE et al., 2002; SHEETS et al., 2003; WELTERS et al., 2005; KENTER et al., 2008; BAGARAZZI et al., 2012; KIM et al., 2014).

As oncoproteínas E6 e E7 estão associadas à inativação de proteínas reguladoras do ciclo celular. A E6 se liga à proteína p53 e E7 se liga à proteína do retinoblastoma (pRB) (MA et al., 2012). A função da proteína p53 está relacionada com ativação de genes envolvidos no mecanismo de reparo do DNA ou sinalização para apoptose após danos na molécula, causados por algum tipo de *stress* como luz ultravioleta. Quando a proteína E6 é expressa na célula, esta recruta a proteína E6AP (ubiquitina ligase) que é responsável pela degradação de p53. Sem a proteína p53 a célula não consegue realizar o mecanismo de reparo em seu material genético, aumentando os episódios de mutações e rearranjos que, em conjunto, propiciam um ambiente favorável para o desenvolvimento

de uma neoplasia ou câncer (FARIDI et al., 2011; CROSBIE et al., 2013). A proteína pRB inibe o progresso do ciclo celular ao atuar em conjunto com o fator de transcrição E2F, responsável por ativar genes necessários para replicação na fase S. A interação entre E7 e pRB permite que o fator de transcrição ative os genes de replicação sem regulação, levando ao desenvolvimento do ciclo celular e a um estímulo constante da proliferação das células infectadas (SANDAL, 2002; CROSBIE et al., 2013).

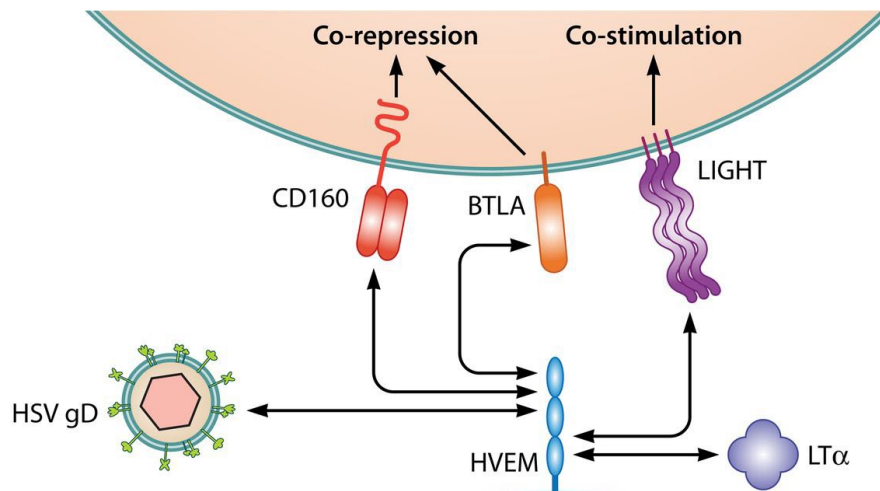
O Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas (LDV) do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da USP desenvolveu ao longo dos anos, duas estratégias vacinais terapêuticas contra tumores associados ao HPV-16. Uma delas é baseada em vacina de DNA que codifica as oncoproteínas E5, E6 e E7 do HPV-16 fusionadas geneticamente a glicoproteína D (gD) do vírus herpes simples 1 (HSV-1) (DINIZ et al., 2010) e a outra baseada na proteína de fusão gDE7 produzida e purificada a partir de sistema de expressão procarioto (PORCHIA et al., 2011). As duas estratégias foram capazes de ativar linfócitos T CD8<sup>+</sup> E7-específicos com capacidade citotóxica, conferindo proteção antitumoral terapêutica no modelo murino de tumores associados ao HPV-16, baseado no transplante de células TC-1. Quando associadas a adjuvantes, as vacinas foram capazes de controlar o crescimento de tumores em camundongos.

### **1.3 GLICOPROTEÍNA D (gD) DO VÍRUS HERPES SIMPLES 1 (HSV-1)**

As glicoproteínas do HSV fazem parte do envelope do vírus e são essenciais no processo de internalização em células permissivas. A fusão da membrana celular com o envelope do HSV ocorre pela interação com receptores celulares específicos. A proteína gD interage com 3 tipos de receptores: Nectin-1, heparan-sulfato e HVEM (Herpes Vírus Entry Mediator) (CHEUNG et al., 2009).

O receptor HVEM pertence à família dos receptores de fatores de necrose tumoral (TNFR), sendo expresso em linfócitos, monócitos e células dendríticas. Tal receptor desempenha importante papel na ativação ou inibição das respostas imunes adaptativas. A interação entre HVEM e o ligante LIGHT e LT- $\alpha$  geram sinais estimulatórios que levam a ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B modulando vias de sinalização que levam a ativação de linfócitos T. O HVEM também interage com o atenuador de linfócitos B e T (BTLA) e CD160, que levam a inibição da ativação de células T (SCIORTINO et al., 2008; CHEUNG et al., 2009; DIMENNA et al., 2010). Neste contexto, a região N-terminal da proteína gD possui a capacidade de competir com o BTLA e CD160 no mesmo sítio de ligação ao HVEM, reduzindo seus efeitos inibitórios e promovendo uma

ativação mais eficiente de linfócitos B e T, mas não interferindo com os sinais estimulatórios promovidos por HVEM/LIGHT/LT- $\alpha$  (DIMENNA et al., 2010; EDWARDS & LONGNECKER et al., 2017) (**Figura 1**).



**Figura 1. Sinais promovidos por HVEM são bidirecionais.** HVEM pode interagir com ligantes inibitórios (BTLA/CD160), ligantes estimulatórios (LIGHT/LT- $\alpha$ ) e a gD do HSV-1. HVEM é expresso em vários tipos celulares, como linfócitos, células dendríticas, células NK, macrófagos, neurônios e células epiteliais. BTLA e LIGHT são expressos na maioria dos leucócitos, incluindo linfócitos e granulócitos. CD160 é encontrado em linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, células NK e linfócitos intraepiteliais. A ligação da gD, BTLA e CD160 acontece via domínio 1 rico em cisteína (CDR1) do HVEM, enquanto que LIGHT e LT- $\alpha$  se ligam via CDR2 e CDR3 (Adaptado de EDWARDS & LONGNECKER et al., 2017).

Estudos mostraram que a fusão da gD a diferentes antígenos virais foi capaz de gerar uma resposta de células T CD8<sup>+</sup> antígeno específica (LASARO et al., 2005; LASARO et al., 2008; DIMENNA et al., 2010). Adicionalmente, estudos realizados no LDV sugerem que a proteína gD pode direcionar o antígeno a ela fusionado para uma subpopulação de células dendríticas especializadas em promover a apresentação cruzada de antígenos para linfócitos T CD8<sup>+</sup> (PORCHIA et al., 2017). Além disso, a inserção do antígeno E6 na proteína recombinante gDE7 se torna essencial, visto que alguns trabalhos já demonstraram que a resposta contra o antígeno E6 é mais robusta do que contra o antígeno E7 em pacientes com neoplasias de alto grau submetidos a imunoterapias (KIM et al., 2014). Em conjunto, estes dados mostram a relevância da proteína gD para a ativação e diferenciação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> efetores e sua função adjuvante em aumentar a imunogenicidade de antígenos a ela fusionados, melhorando a amplitude da resposta imune gerada.

#### 1.4 SISTEMA DE EXPRESSÃO BASEADO EM *P. PASTORIS*

Devido ao grande valor biológico e comercial de proteínas com fins vacinais, nos últimos anos o foco de muitos estudos tem sido encontrar meios para produzi-las de forma eficiente e funcional. As ferramentas necessárias para produção de proteínas heterólogas são: (i) gene ou DNA que codifica a proteína desejada, (ii) vetor adequado e (iii) sistema biológico que pode transcrever e traduzir o gene na proteína de interesse. Sendo assim um sistema de expressão eficiente deve: (i) produzir proteínas, (ii) ter bom rendimento, (iii) ser de fácil manipulação e manutenção, (iv) ser seguro e econômico e (v) facilitar a purificação (DEMAIN & VAISHNAV, 2009). Os sistemas de expressão mais utilizados para produção de proteínas recombinantes são fundamentados em culturas de bactérias, leveduras, células de mamíferos e células de inseto (baculovírus) (DEMAIN & VAISHNAV, 2009). A escolha do sistema de expressão mais apropriado depende da complexidade da proteína de interesse, necessidade de modificações pós-traducionais e rendimento desejado (MACCANI et al., 2014).

A utilização de células de leveduras como sistema de expressão de proteínas recombinantes tem sido amplamente difundida ao longo dos anos, principalmente por apresentar vantagens como rápido crescimento, fácil manipulação genética, processamento mais similar ao encontrado em células de animais como modificações pós-traducionais, rapidamente atinge alta densidade celular, alta produtividade, não contem compostos imunogênicos como pirogênicos, além de possuir melhor custo/benefício (DEMAIN & VAISHNAV, 2009; BAGHBAN et al., 2018). A levedura *S. cerevisiae* é a mais conhecida e utilizada, porém ela realiza hiperglicosilação das proteínas produzidas e não alcança altos níveis de expressão (SUDBERY, 1996). Nos últimos 15 anos, a utilização da levedura *P. pastoris* foi largamente aplicada para produção de proteínas recombinantes, sendo produzidas mais de 5.000 proteínas de diversas origens (SØRENSEN, 2010; SCHWARZHANS et al., 2017; BAGHBAN et al., 2018).

Em 1980, *P. pastoris* foi utilizada pela primeira vez como um sistema de expressão de proteínas heterólogas baseando-se na observação de que algumas enzimas necessárias para o metabolismo do metanol, somente são produzidas em altos níveis na presença deste composto (AHMAD et al., 2014). Desta forma, estudos bioquímicos demonstraram que a *P. pastoris* é uma levedura metilotrófica, sendo capaz de utilizar o metanol como única fonte de carbono, através de uma via metabólica envolvendo a enzima álcool oxidase (AOX) (CEREGHINO & CREGG, 2000). A AOX catalisa o

primeiro passo na via de metabolização do metanol, transformando metanol em formaldeído. Tal reação se dá nos peroxissomos e envolve a incorporação de oxigênio e liberação de peróxido de hidrogênio (VOGL & GLIEDER et al., 2013). Em seguida, o peróxido de hidrogênio é degradado em oxigênio e água, sendo uma porção do formaldeído oxidado para formar formato e dióxido de carbono. Toda esta cadeia de metabolização fornece energia para as células crescerem na presença do metanol. É importante destacar que a presença de fontes de carbono, como glicerol, glucose e etanol reprimem a atividade da AOX, em níveis transcricionais (CEREHINO & CREGG, 2000). Grandes quantidades de AOX são necessárias para sustentar o crescimento da levedura em metanol, esta enzima pode representar 5% do mRNA e 30% do total das proteínas solúveis em *P. pastoris* (VOGL & GLIEDER et al., 2013).

Em *P. pastoris* a AOX é codificada pelos genes AOX1 e AOX2, o primeiro é o mais transcrito e responsável pela grande quantidade da enzima na célula. O promotor de AOX1 é o mais utilizado para expressão de proteínas recombinantes em *P. pastoris*, é fortemente regulado pela fonte de carbono e atinge altos níveis de produção. Já foi descrito um rendimento de expressão de 22 gramas/litro (g/l) de proteína intracelular e 15 g/l de proteína secretada neste sistema (VOGL & GLIEDER et al., 2013). Com relação a habilidade de utilizar o metanol, podem existir 3 fenótipos de *P. pastoris*: Mut<sup>+</sup> (grande utilização de metanol); Mut<sup>S</sup> (pequena utilização de metanol) e Mut<sup>-</sup> (sem utilização de metanol). Fenótipos Mut<sup>+</sup> contém os dois genes de AOX, apresentando maior nível de crescimento quando comparado ao fenótipo Mut<sup>S</sup>. Fenótipos Mut<sup>-</sup> são incapazes de crescer na presença do metanol devido a deleção dos 2 genes de AOX. Apesar das vantagens atribuídas a utilização do metanol como fonte de energia para *P. pastoris*, ainda existem algumas restrições por se tratar de um composto altamente inflamável, não sendo desejável sua utilização para produções em larga escala (WANG et al., 2016).

Os vetores de expressão empregados para *P. pastoris* integram no genoma do hospedeiro gerando clones estáveis. Para obter altos níveis de produção, é necessário selecionar clones que apresentam múltiplas cópias do gene de interesse, e portanto, é necessário que os vetores de expressão comerciais apresentem os seguintes elementos: (i) cassete com a sequência promotora do gene AOX1; (ii) sítios de clonagem para inserção do gene; (iii) sequência de parada de transcrição do gene AOX1; (iv) marcas de seleção em bactéria e levedura e (v) sítios múltiplos de clonagem (DALY & HEARN, 2005). Os vetores comerciais pPIC e pPICZ são os mais utilizados para expressão em *P. pastoris*.



Alguns vetores ainda podem conter de forma opcional: sequências *tag* (histidina) com a função de facilitar a identificação da proteína e uma sequência que codifica um peptídeo sinal que direciona a proteína para o meio extracelular. O peptídeo sinal mais comumente utilizado é região “pré-pro” do fator  $\alpha$  de *S. cerevisiae*, que consiste em uma sequência curta composta por 13 a 36 resíduos de aminoácidos, localizado na região N-terminal das proteínas recombinantes. A região pré é responsável por direcionar a proteína para o retículo endoplasmático e a região pro é responsável por direcionar a proteína do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi (AHMAD et al., 2014).

A região “pré-pro” do fator  $\alpha$  de *S. cerevisiae* já foi descrita como capaz de elevar a produção de proteína secretada, quando comparada a utilização do peptídeo sinal nativo de *P. pastoris*. Visto que *P. pastoris* secreta baixos níveis de proteína endógena, o meio extracelular consiste em sua maioridade da proteína heteróloga, sendo uma vantagem por evitar toxicidade de compostos do meio intracelular e simplificar o processo de purificação (WANG et al., 2016). Além disso, a via secretória permite a realização de modificações pós-traducionais necessárias para muitas proteínas terapêuticas, como glicosilação, formação de ponte dissulfeto, dobramento e processamento proteolítico (WERTEN et al., 2019).

Com relação às marcas de seleção, os vetores de *P. pastoris* possuem a marca da enzima histidinol desidrogenase (HIS4) no vetor pPIC ou a marca *ble* no vetor pPICZ. Além destas, também existe o vetor pPIC9K com a marca de seleção *kan* que confere resistência ao antibiótico kanamicina. Os vetores da Invitrogen da série pPIC possuem uma sequência do gene HIS4, que possibilita o crescimento de clones em meios sem o aminoácido histidina. O HIS4 também pode ser utilizado para integração dos cassetes de expressão por recombinação homóloga. O direcionamento para recombinação acontece através da linearização dos vetores pPIC com as enzimas de restrição *SalI* ou *StuI* que possuem sítios no meio do gene HIS4 (CEREGHINO & CREGG, 2000).

Já foi descrito na literatura a utilização de *P. pastoris* como sistema de expressão de glicoproteínas do HSV-1 e HSV-2 humano, HSV-1 equino, HSV-5 bovino, Dengue, Raiva e Tuberculose (RUITENBERG et al., 2001; KOOIJ et al., 2002; MUNÉ et al., 2003; VALDÉS et al., 2007; DUMMER et al., 2009; AZOUN et al., 2016a; WANG et al., 2017; BANDO-CAMPOS et al., 2019). Além disso, outros trabalhos empregaram este sistema para expressão das proteínas L1 e L2 do HPV-16 e HPV-18 (BAZAN et al., 2009; COIMBRA et al., 2011; RAO et al., 2011; BOLHASSANI et al., 2014; MARIZ et al.,

2015; GUPTA et al., 2016; BREDELL et al., 2018). Ainda não foi descrito na literatura a utilização de *P. pastoris* para expressão das oncoproteínas E6 e E7 do HPV-16 e HPV-18, bem como da proteína fusionada gDE7E6.

## **1.5 SISTEMA DE EXPRESSÃO BASEADO EM CÉLULAS DE MAMÍFERO**

Mais de 50% das proteínas utilizadas com enfoque biotecnológico e/ou terapêutico são produzidas em células de mamíferos, principalmente pela habilidade de expressar proteínas semelhantes à sua forma nativa e com estrutura e atividade biológica preservada, visto que a falta de similaridade pode afetar a estabilidade da proteína e sua afinidade pelo ligante, e conseqüentemente a uma perda de imunogenicidade (BROWNE & AL-RUBEAI, 2007; ZHU, 2012). Além disso, esse sistema apresenta a capacidade de realizar o dobramento correto da proteína, é livre de endotoxinas e realiza modificações pós-traducionais nas cadeias polipeptídicas, frequentemente necessárias para a atividade biológica (LALONDE & DUROCHER, 2017).

Dentre as células de mamífero disponíveis, células de rim embrionário humano (HEK) foram geradas há 30 anos atrás, através de transfecção com DNA adenoviral. As células foram inicialmente criadas para propagação de mutantes de adenovírus, porém pela facilidade de cultivo e transfecção, foram empregadas como sistema de expressão de proteínas heterólogas (ARICESCU & OWENS, 2013). Três variantes de HEK293 são utilizadas para produção de proteínas em larga escala: 293T que expressa o antígeno T do vírus vacuolante símio 40 (SV40), 293E que expressa o antígeno nuclear do vírus Epstein-Bar e 293-GnTI- deficiente em N-acetil transferase I (PHAM et al., 2006; ARICESCU & OWENS, 2013). Dentre estas linhagens, HEK293T apresenta vantagens por ser altamente transfectável pela maioria de vetores comerciais, rápido crescimento em aderência ou suspensão e adaptável a meio livre de soro fetal bovino (SFB). Além disso, o crescimento em aderência facilita a visualização e seleção de clones produtores. A transfecção transiente em larga escala de células HEK293T se tornou economicamente viável após a descoberta de um polímero catiônico linear (PEI), um excelente agente condensador de DNA (PHAM et al., 2006; ARICESCU & OWENS, 2013; BANDARANAYAKE & ALMO, 2014).

Células de ovário de hamster chinês (CHO), isoladas em 1950, são amplamente empregadas como sistema de expressão, sendo em 1986, o ativador do plasminogênio tecidual o primeiro biofarmacêutico produzido neste sistema. Desde então, já foi empregada para produção de 70% dos biofármacos disponíveis no mercado (DUMONT et al., 2015; CHAUDHURI et al., 2015; LALONDE & DUROCHER, 2017). Tal preferência se deve por várias vantagens como: (i) capacidade de glicosilação; (ii) crescimento em suspensão e meio quimicamente definido, o que facilita o processo de

purificação por conter menor quantidade de proteína contaminante; (iii) crescimento em altas densidades em biorreatores; (iv) genoma instável que favorece a realização de amplificação genômica; (v) facilmente transfectável; (vi) técnicas que envolvem a produção industrial de proteínas recombinantes em CHO estão bem caracterizadas e (vii) baixo risco de transmissão de vírus humanos. Com relação ao último tópico, foram realizados testes com 44 patógenos virais humanos e nenhum deles apresentou replicação em células CHO, o que tornou este sistema ideal em termos regulatórios (BANDARANAYAKE & ALMO, 2014; CACCIATORE et al., 2010). No entanto, apesar das vantagens citadas, o desenvolvimento de uma célula produtora de altos níveis da proteína de interesse consiste em um processo intenso e trabalhoso, que pode levar de 6 a 9 meses (POULAIN et al., 2019).

A variabilidade genômica de células CHO permite o desenvolvimento de linhagens mutantes com deficiência em algumas enzimas metabólicas. Tais mutantes são dependentes de alguns nutrientes para sobrevivência, fazendo destas células ideais para geração de linhagens produtoras usando a deficiência como uma marca de seleção. Neste contexto, células CHO-DG44, deficientes para enzima dihidrofolato redutase (DHFR), foram geradas em 1980 por radiação ionizante (BANDARANAYAKE & ALMO, 2014). DHFR catalisa a redução de ácido dihidrofólico para ácido tetrahidrofólico, que é um precursor para a síntese *de novo* de purinas, pirimidinas e glicina. Sendo assim, células CHODG-44 requerem a suplementação no meio de cultivo com hipoxantina e timidina (precursores de purinas e pirimidinas). Em linhagens recombinantes, o DHFR é provido pelo vetor (próximo ao gene de interesse) no momento da transfecção, fazendo com que a suplementação com hipoxantina e timidina seja desnecessária (CHROMIKOVA et al., 2017; BANDARANAYAKE & ALMO, 2014).

O primeiro passo para geração de uma linhagem CHO recombinante é a entrega do DNA no núcleo por integração cromossômica, caracterizando uma transfecção estável. Após a entrada do DNA no núcleo, a integração do vetor acontece de forma randômica, ditado pela estrutura do cromossomo. Usualmente, processos de transfecção padrão empregam a utilização de dois cassetes de expressão, um para expressão da proteína de interesse e outro para o marcador de seleção (JAYAPAL et al., 2007). Após transfecção e seleção 5-30% das células expressam a proteína de forma funcional, sendo os níveis de expressão baixos, visto que a pressão seletiva pode agir somente no cassete contendo o marcador de seleção, diminuindo os níveis de expressão da proteína de interesse ao longo

do tempo de cultivo (GURTU et al., 1996). Tais problemas podem ser solucionados com a aplicação de vetores bicistrônicos contendo sítios internos de entrada no ribossomo (IRES) presentes no RNA que podem estimular o elemento translacional cap-independente no mRNA. A expressão de múltiplos genes como marcador de seleção e gene de interesse podem ser integrados através da inserção do elemento IRES entre os dois genes, permitindo que ambos genes sejam dependentes do mesmo promotor para transcrição em um único mRNA. O IRES no mRNA permite o início da tradução do gene *downstream* a partir do 5' cap-independente, enquanto que o início da transcrição do gene *upstream* ocorre a partir do 5' cap-dependente. Sendo assim, 2 proteínas diferentes são traduzidas a partir de um único mRNA (LAI et al., 2013).

Existem alguns benefícios na integração da expressão de múltiplos genes através de IRES como: um único promotor pode ser utilizado para direcionar a expressão dos genes (comumente utilizado o promotor de citomegalovírus), levando a níveis mais consistentes de expressão de ambos os genes. Além disso, a utilização de plasmídeos contendo o IRES permite posicionar o marcador de seleção como um gene *downstream*, fazendo com que a expressão do marcador de seleção seja dependente da expressão do gene de interesse *upstream*. Sendo assim, reduz a ocorrência de expressão do marcador de seleção e não expressão do gene de interesse (HO et al., 2012; LAI et al., 2013; RAHIMPOUR et al., 2016).

Em seguida ao processo de transfecção de células CHODG-44, é necessário isolar as células com altas cópias do gene integrado através de amplificação genômica. Uma metodologia bastante explorada é baseada no marcador de seleção DHFR, as células transfectadas com o gene DHFR e o gene de interesse são expostas a baixas concentrações de Metotrexato (MTX), o qual é utilizado na clínica para tratamento de câncer e doenças autoimunes. No contexto de amplificação genômica, o MTX é um inibidor do DHFR, sendo assim sua presença no meio faz com que as células aumentem o número de cópias do DHFR no genoma, para superar a inibição exercida pelo MTX. Como o gene de interesse está integrado ao DHFR, o resultado são células que apresentam aumento do número de cópias de DHFR e do gene de interesse, levando a maior produção da proteína de interesse. Tal técnica é repetida aumentando gradualmente a concentração de MTX, de forma a aumentar a pressão seletiva para que somente células que tenham alto número de cópias do DHFR e gene de interesse sobrevivam. O resultado do processo de amplificação com MTX é a geração de uma população mista com diferentes níveis de

integração genômica e aumento do número de cópias do gene de interesse (CACCIATORE et al.,2010; NG et al., 2012; LAI et al.,2013; PRIOLA et al., 2016; VORONINA et al., 2016).

No desenvolvimento de uma linhagem celular altamente produtora, é de grande importância isolar dentro da população mista amplificada, um clone estável e bom produtor da proteína de interesse. A escolha da técnica de clonagem é dependente da particularidade de cada linhagem celular. Para células em suspensão, normalmente é necessário imobilizar as células para formação de colônias, através de ágar/agarose ou metilcelulose. A metodologia mais utilizada para isolamento de clones, é a diluição limitante, por ser simples e de baixo custo. Nesta técnica, uma baixa densidade de células (1 célula/poço) são plaqueadas em microplacas (384 poços). As células são observadas microscopicamente e aquelas contendo uma célula são marcadas para análise. Após algum tempo em cultura é esperado que as células proliferem e se mantenham viáveis para estabelecimento de uma população clonal, sendo a produtividade determinada por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). Os clones com maior produtividade seguem para fase de escalonamento. Geralmente um segundo *round* de clonagem é recomendado para garantir a clonalidade da célula (BROWNE & AL-RUBEAI, 2007).

Atualmente existem técnicas de seleção de clones automatizadas disponíveis no mercado como o sistema ClonePix (Genetix®) e CellCelector (Aviso®). Inicialmente foram desenvolvidos para seleção de células de bactéria e fungos, porém foram em seguida aplicados para células de mamífero. Neste sistema, as células são imobilizadas em meio semisólido com os nutrientes necessários para o crescimento e incubadas para formação das colônias. A proteína de interesse secretada é retida pela viscosidade do meio, sendo detectada através de um anticorpo específico fluorescente também presente no meio. A fluorescência é vista como um “halo” em torno da colônia, com uma extensão de acordo ao tamanho do clone. Quando mensurada a secreção por fluorescência, os dados gerados pelo sistema da sobreposição da luz branca e fluorescente, possibilitam ao sistema excluir clones que apresentam fluorescência inespecífica ou clones não produtores. Os clones bons produtores são selecionados através de um *software* e passados para uma placa para escalonamento e avaliação da produtividade. Uma das maiores vantagens deste sistema é a capacidade de analisar milhares de clones em poucos segundos, reduzindo o tempo de seleção e possibilidade de contaminação. Além disso, o sistema tem a capacidade de realizar o *screening* de forma a encontrar a pequena

porcentagem (0.0003%) de células altamente produtoras (BROWNE & AL-RUBEAI, 2007; LAI et al., 2013; PRIOLA et al., 2016).

## 2. OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho de dissertação foi a expressão das proteínas de fusão gDE7E6 HPV-16 e HPV-18 e a oncoproteína E7 HPV-16 em células de levedura *P. pastoris* e expressão da gDE7E6 HPV-16 e HPV-18 em células de mamífero HEK293T e CHODG-44 para obtenção de antígenos purificados com futura aplicação em vacinas terapêuticas contra tumores associados ao HPV-16 e HPV-18.

Dentre as etapas experimentais específicas realizadas para conclusão deste trabalho estão:

- Testes de expressão das proteínas gDE7E6 HPV-16 e HPV-18 e E7 HPV-16 em *P. pastoris*;
- Testes de expressão das proteínas gDE7E6 HPV-16 e HPV-18 em células HEK293T e CHODG-44, seguida de purificação por cromatografia de afinidade;
- Testes de adaptação de células HEK293T a meio livre de soro;
- Geração de população mista de células CHODG-44 produtoras de gDE7E6 HPV-16 e HPV-18;
- Testes de seleção de clones produtores de CHODG-44 expressando gDE7E6 HPV-16 e HPV-18, por diluição limitante;
- Amplificação genômica com MTX;
- Testes de seleção de clones produtores de CHODG-44 expressando gDE7E6 HPV-16 e HPV-18, por sistema automatizado ClonePix (Genetix®);
- Avaliação da expressão dos clones produtores de CHODG-44 expressando gDE7E6 HPV-16 e HPV-18 por citometria de fluxo.



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ESTRATÉGIAS DE EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS gDE7E6 HPV-16, gDE7E6 HPV-18 E E7 HPV-16 EM *P. PASTORIS*

##### 3.1.1 Vetores de clonagem e transformação de *Escherichia coli* (*E. coli*)

As sequências genéticas da proteína gDE7E6 do HPV-16, gDE7E6 do HPV-18 e E7 do HPV-16 tiveram os códons adaptados para expressão em levedura *P. pastoris*. As sequências finais não têm o peptídeo sinal, a região transmembrana e os sítios de glicosilação na proteína gD. No gene da proteína E7 foram realizadas modificações nos aminoácidos Cys<sup>24</sup> e Glu<sup>26</sup> por Gly<sup>24</sup> e Gly<sup>26</sup>, respectivamente, para impedir a interação com pRB. No gene da proteína E6 foram realizadas mutações na região de interação com p53. Além disso, foram inseridos sítios para enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI* nas regiões que flanqueiam os genes de interesse para possibilitar a clonagem no vetor integrativo pPIC9K (Invitrogen<sup>®</sup>) e uma cauda de 6 aminoácidos histidina na região c-terminal das proteínas para facilitar a purificação por cromatografia de afinidade (resina de níquel). Os genes foram sintetizados pela empresa GenScript e clonados no plasmídeo pPIC9K, gerando os vetores pPIC9KgDE7E6 do HPV-16, pPIC9KgDE7E6 HPV-18 e pPIC9KE7 HPV-16 (Apêndice A, B e C). Tais vetores foram utilizados na transformação de bactérias *E. coli* DH5 $\alpha$  (Thermo Fisher<sup>®</sup>).

##### 3.1.2 Confirmação dos clones positivos

A extração foi realizada seguindo o protocolo adaptado de Sambrook e colaboradores (1989). Os plasmídeos pPIC9KgDE7E6 HPV-16, pPIC9KgDE7E6 HPV-18 e pPIC9KE7 HPV-16 foram digeridos com as seguintes enzimas: *SalI* (10U/ $\mu$ L), *BglII* (10U/ $\mu$ L), *NotI* (10U/ $\mu$ L) e *EcoRI* (10U/ $\mu$ L) (Fermentas<sup>®</sup>) em reação com volume final de 10  $\mu$ L, onde foram utilizados 1  $\mu$ L plasmídeo (pPIC9KgDE7E6 HPV-16: 806 ng/ $\mu$ L; pPIC9KgDE7E6 HPV-18: 958 ng/ $\mu$ L; pPIC9KE7 HPV-16: 1.200 ng/ $\mu$ L), 0,5  $\mu$ L enzima, 1  $\mu$ L tampão 10X e 7,5  $\mu$ L H<sub>2</sub>O. As reações permaneceram em banho-maria a 37°C, *overnight*. As bandas correspondentes ao vetor e ao inserto foram visualizadas por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

##### 3.1.3 Extração do DNA plasmidial, linearização e precipitação da construção

A extração do DNA plasmidial foi realizada utilizando protocolo MidiPrep (Qiagen<sup>®</sup>), conforme instruções do fabricante. Em seguida, o DNA plasmidial (40  $\mu$ g) foi

linearizado com as enzimas de restrição *Sa*II (2000U/ $\mu$ L) e *Bg*II (2000U/ $\mu$ L) (Fermentas<sup>®</sup>). As bandas correspondentes foram visualizadas por eletroforese em gel de agarose 0,5%. Após linearização, o DNA plasmidial foi precipitado com 1 volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), centrifugado a 13.000 rpm, 3 minutos (min) a temperatura ambiente. Em seguida, foi retirada a fase aquosa e adicionado 2,5 volumes de etanol absoluto gelado, armazenado a -20°C, *overnight*. As construções precipitadas foram centrifugadas a 14.000 rpm, 4°C por 15 min. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspensão em 10  $\mu$ L de água MiliQ estéril.

### 3.1.4 Eletroporação da levedura *P. pastoris* GS115

As leveduras competentes foram preparadas antes do processo de eletroporação. Foi feito um pré-inóculo com 1 colônia adicionada em 5 mL de meio YPD (1% (m/v) extrato de levedura, 2% (m/v) peptona e 2% (m/v) glicose). O inóculo foi feito com 300  $\mu$ L do pré-inóculo em 500 mL de meio YPD *overnight* até atingir uma  $DO_{600} = 1,3-1,5$ . Em seguida a cultura foi centrifugada a 3.000 rpm, 4°C por 15 min. O *pellet* foi lavado duas vezes com 250 mL de água MiliQ, uma vez com 20 mL de Sorbitol 1 M gelado. Foi realizada uma última centrifugação e o *pellet* ressuspensão em 500  $\mu$ L de Sorbitol 1M gelado. Para o processo de eletroporação foi utilizado 80  $\mu$ L da levedura, juntamente com 40  $\mu$ g da construção digerida e purificada por precipitação. As células foram transferidas para cubeta estéril e pulsadas a 270V por 11 milissegundos (ms) em eletroporador *Gene Pulser/Micro Pulser* (Bio-Rad *Micropulser*<sup>®</sup>). Após a eletroporação foi adicionado 1 mL de sorbitol 1M gelado e plaqueado em meio MD ágar (meio mínimo contendo glicose 2%, sem histidina), mantido a 30°C por 48 horas.

### 3.1.5 Seleção dos recombinantes positivos

Os clones provenientes da eletroporação foram selecionados por avaliação da resistência ao antibiótico geneticina (G418 Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) em diferentes concentrações em meio YPD ágar (0,5, 1,0, 2,0 e 4,0 mg/mL) visando identificar plasmídeos multicópias e armazenados a -80°C para posterior expressão das proteínas recombinantes.

### 3.1.6 Expressão das proteínas em *P. pastoris*

As condições ótimas de expressão foram estabelecidas em pequena escala (10 mL), sendo testado os tempos de 24, 48, 72 e 96 horas. Os clones transformantes foram cultivados em 10 mL de meio BMGY [1% (m/v) extrato de levedura, 2% (m/v) peptona,

100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.34% (m/v) base nitrogenada de levedura, 1% (m/v) sulfato de amônio, 4% (m/v) biotina e 3% (m/v) glicerol] a 200 rpm, 30°C. Após 24 horas, a cultura foi centrifugada a 3.000 rpm, 5 min, temperatura ambiente e ressuspensão em 10 mL de meio BMMY [1% (m/v) extrato de levedura, 2% (m/v) peptona, 100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.34% (m/v) base nitrogenada de levedura, 1% (m/v) sulfato de amônio, 4% (m/v) biotina e 0,5% (v/v) metanol] e cultivadas por mais 48 horas, sendo adicionada para manutenção da indução metanol na concentração final de 1% a cada 24 horas, totalizando 96 horas de indução. A expressão foi analisada por SDS-PAGE e *western blot* utilizando os anticorpos monoclonais anti-His 1:4.000 (Thermo Fisher<sup>®</sup>) e anti gD 1:10.000 (DL-6) (NICOLA et al., 1998).

### **3.1.7 Concentração das proteínas secretadas no sobrenadante**

Os sobrenadantes provenientes da cultura de clones transformantes para gDE7E6 HPV-16, gDE7E6 HPV-18 com tempo de expressão de 24 horas foram concentrados pelo método de precipitação com sulfato de amônio até uma saturação de 80%. Em um volume de 12,38 mL de sobrenadante foram adicionados 7,02 g de sulfato de amônio. As amostras permaneceram em agitação constante por 1 hora. Em seguida, foram centrifugadas a 10.000 G, 15 min, 4°C. As proteínas foram dialisadas contra tampão fosfato salino (PBS) *overnight*. A avaliação da expressão foi analisada por SDS-PAGE e *western blot* utilizando o anticorpo monoclonal anti gD 1:10.000 (DL-6) (NICOLA et al., 1998).

### **3.1.8 Lise celular do *pellet***

Os clones de cada construção (pPIC9KgDE7E6 HPV-16 e do HPV-18 e pPIC9KE7 HPV-16) submetidos à expressão por 24, 48, 72 e 96 horas foram lisados utilizando pérolas de vidro (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>). Para 1 mL de amostras, foram adicionados 100 µL de *Breaking Buffer* [50 mM fosfato de sódio, pH 7,4; 1 mM fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF); 1mM EDTA; 5% glicerol]. Em seguida, foi adicionado o mesmo volume de pérolas de vidro. As amostras foram agitadas em vórtex e incubadas em gelo por 30 segundos (seg) se repetindo por 8 ciclos. Após a lise, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm, 10 min, 4°C. O sobrenadante foi armazenado a -20°C. A avaliação da expressão foi analisada por SDS-PAGE e *western blot* utilizando o anticorpo monoclonal anti gD 1:10.000 (DL-6) (NICOLA et al., 1998).

## **3.2. ESTRATÉGIAS DE EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS gDE7E6 HPV-16 E gDE7E6 HPV-18 EM CÉLULAS HEK293-T**

### **3.2.1 Vetores de clonagem**

As sequências genéticas da proteína gDE7E6 HPV-16 e gDE7E6 HPV-18 tiveram os códons adaptados para expressão em células de mamíferos. Foram inseridos o peptídeo sinal do Fator VIII e a sequência Kozak (GCCACC) para facilitar o início da tradução. O vetor de expressão pNU1, gentilmente cedido pelo Núcleo de Terapia Celular e Molecular (Nucel), possui o elemento IRES, a fim de integrar a expressão do marcador de seleção ao gene de interesse. Foram adicionados sítios para enzimas de restrição *Bam*HI e *Nhe*I (gDE7E6 HPV 16) e *Eco*RI e *Nhe*I (gDE7E6 HPV 18) (Fermentas<sup>®</sup>) nas regiões que flanqueiam os genes de interesse para possibilitar a clonagem no vetor pUC57 (Invitrogen<sup>®</sup>) e uma cauda de seis aminoácidos histidina na região c-terminal das proteínas para facilitar a purificação por cromatografia de afinidade (resina de níquel). Os genes foram sintetizados pela empresa GenScript e clonados no plasmídeo pUC57 gerando os vetores pUC57gDE7E6 HPV-16 e pUC57gDE7E6 HPV-18.

### **3.2.2 Digestão das construções gDE7E6 HPV 16 e 18 e vetor pNU1**

A construção pUC57gDE7E6 HPV-16 foi digerida com as seguintes enzimas: *Bam*HI (10U/ $\mu$ L) e *Nhe*I (10U/ $\mu$ L) (Fermentas<sup>®</sup>) em reação com volume final de 20  $\mu$ L, onde foram utilizados 5  $\mu$ L plasmídeo (500 ng/ $\mu$ L), 0,5  $\mu$ L enzima, 2  $\mu$ L Tampão Tango 10x e 12,5  $\mu$ L H<sub>2</sub>O. As reações permaneceram em banho maria (Novainstruments<sup>®</sup>) por 1 hora, 37°C. A construção pUC57gDE7E6 HPV-18 foi digerida com as seguintes enzimas: *Nhe*I (10U/ $\mu$ L) e *Eco*RI (10U/ $\mu$ L) (Fermentas<sup>®</sup>). Foi realizada uma primeira digestão com *Nhe*I (10U/ $\mu$ L) (Fermentas<sup>®</sup>) com volume final de 10  $\mu$ L, onde foram utilizados 5  $\mu$ L plasmídeo (500 ng/ $\mu$ L), 0,5  $\mu$ L enzima, 1  $\mu$ L Tampão Tango 10x e 3,5  $\mu$ L H<sub>2</sub>O. A reação permaneceu em banho maria (Novainstruments<sup>®</sup>) por 1 hora, 37°C. Em seguida, foi realizada a segunda digestão com *Eco*RI (10U/ $\mu$ L) com volume final de 20  $\mu$ L, onde foram utilizados 0,5  $\mu$ L enzima, 2,5  $\mu$ L Tampão Tango 10x e 7  $\mu$ L H<sub>2</sub>O. A reação permaneceu em banho maria (Novainstruments<sup>®</sup>) por 1 hora, 37°C. O vetor pNU1 foi digerido com as mesmas enzimas nas condições citadas acima. As bandas correspondentes foram visualizadas por eletroforese em gel de agarose 1%.

### **3.2.3 Purificação do DNA a partir de gel de agarose e reação de ligação gDE7E6 dos HPVs 16 e 18 no vetor pNU1**

A extração do DNA plasmidial a partir de gel de agarose 1% foi realizada utilizando kit PureLink Quick Gel (ThermoFisher®), conforme instruções do fabricante. Após obtenção dos DNAs, estes foram submetidos a uma reação de ligação numa proporção de 10:1. Para gDE7E6 do HPV-16 foi realizada uma reação com volume final de 10  $\mu$ L, onde foram utilizados 1  $\mu$ L vetor, 4  $\mu$ L inserto, 0,5  $\mu$ L enzima (Fermentas®), 1  $\mu$ L tampão, 3,5  $\mu$ L H<sub>2</sub>O. Para gDE7E6 do HPV-18 foi realizada uma reação com volume final de 10  $\mu$ L, onde foram utilizados 1  $\mu$ L vetor, 7  $\mu$ L inserto, 0,5  $\mu$ L enzima, 1  $\mu$ L tampão, 0,5  $\mu$ L H<sub>2</sub>O. As reações permaneceram *overnight*, a 16°C gerando os vetores pNU1gDE7E6 HPV-16 e pNU1gDE7E6 HPV-18. Em seguida, foi realizada inativação da enzima por 10 min, a 65°C.

### **3.2.4 Eletroporação da bactéria *E. coli* XL10Gold**

Para o processo de eletroporação foram utilizados 50  $\mu$ L de *E. coli* XL10Gold (ThermoFisher®), juntamente com 5  $\mu$ L das construções digeridas e ligadas, sendo ressuspendido em 500  $\mu$ L de meio Luria-Bertani (LB) (1% triptona, 0.5% extrato de levedura, 171 mM NaCl, pH 7.0). As células foram transferidas para cubeta estéril e pulsadas a 2.500V por 10 ms em eletroporador *Gene Pulser/Micro Pulser* (Bio-Rad *Micropulser*®). As células permaneceram por 1 hora, a 37°C. Após, foram centrifugadas a 4.000 rpm, 15 min e plaqueadas em meio LB ágar com ampicilina (100 mg/mL) (Sigma-Aldrich®).

### **3.2.5 Seleção dos clones recombinantes e extração de DNA plasmidial**

Os clones provenientes da eletroporação foram repicados da placa e colocados para crescer em 5 mL de meio LB com ampicilina. Em seguida, foi realizada extração de DNA plasmidial utilizando protocolo MiniPrep (ThermoFisher®).

### **3.2.6 Confirmação dos clones positivos**

Os plasmídeos pNU1gDE7E6 do HPV-16 foram digeridos com as seguintes enzimas: *Bam*HI (10U/ $\mu$ L) e *Nhe*I (10U/ $\mu$ L) (Fermentas®) em reação com volume final de 10  $\mu$ L, onde foram utilizados 1  $\mu$ L plasmídeo (500 ng/ $\mu$ L), 0,5  $\mu$ L enzima, 1  $\mu$ L Tampão Tango 10x e 7  $\mu$ L H<sub>2</sub>O. As reações permaneceram em banho maria (Novainstruments®) por 1 hora, a 37°C. Os plasmídeos pNU1gDE7E6 do HPV-18 foram digeridos com as seguintes enzimas: *Nhe*I (10U/ $\mu$ L) e *Eco*RI (10U/ $\mu$ L) (Fermentas®). Foi

realizada uma primeira digestão com *NheI* (10U/ $\mu$ L) com volume final de 10  $\mu$ L, onde foram utilizados 2,5  $\mu$ L plasmídeo (500 ng/ $\mu$ L), 0,5  $\mu$ L enzima, 1  $\mu$ L Tampão Tango 10x e 6  $\mu$ L H<sub>2</sub>O. A reação permaneceu em banho-maria por 1 hora, a 37°C. Em seguida, foi realizada a segunda digestão com *EcoRI* (10U/ $\mu$ L) com volume final de 20  $\mu$ L, onde foram utilizados 0,5  $\mu$ L enzima, 2,5  $\mu$ L Tampão Tango 10x e 7  $\mu$ L H<sub>2</sub>O. A reação permaneceu em banho-maria (Novainstruments®) por 1 hora, a 37°C. As bandas correspondentes foram visualizadas por eletroforese em gel de agarose 1%.

### 3.2.7 Transfecção transitória de células HEK293T

Células HEK293T foram previamente plaqueadas (p150 - Sarstedt®) em meio Dulbecco MEM (DMEM - Gibco®) suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB) em uma densidade de 10 x 10<sup>6</sup> células/placa. Após 24 horas, foi realizada troca do meio e as células foram ressuspensas em 20 mL de meio DMEM 1% SFB, 1 mL NaCl, 100  $\mu$ L de agente lipofílico PEI (ThermoFisher®) e 20  $\mu$ g dos plasmídeos pNU1gDE7E6 HPV-16 e pNU1gDE7E6 HPV-18. As placas foram incubadas por 96 horas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

### 3.2.8 Purificação das proteínas gDE7E6 HPV-16 e HPV-18 por cromatografia de afinidade ao níquel

Para purificação das proteínas gDE7E6 HPV-16 e gDE7E6 HPV-18, os sobrenadantes (200 mL) provenientes das transfecções foram previamente centrifugados a 10.000 rpm por 10 min e filtrados em membrana de acetato 0,22  $\mu$ m (Biotech®). Os sobrenadantes filtrados contendo as proteínas recombinantes foram purificados por cromatografia de afinidade ao níquel, utilizando coluna His trap HP (1 mL) (GE Healthcare Life Sciences®), previamente equilibrada com Tampão A (0,1 M Tris, 0,25 M NaCl, pH 7,4) em sistema AktaFLPC (GE Healthcare Life Sciences®). As proteínas foram eluídas com gradiente linear do tampão A para tampão B (0,1 M Tris, 0,25 M NaCl, 1 M Imidazol, pH 7,4), sendo desligadas da coluna com concentração de 230 mM de imidazol. As frações eluídas foram coletadas e analisadas por SDS-PAGE e *western blot* utilizando anticorpo monoclonal anti-gD 1:10.000 (DL-6) (NICOLA et al., 1998).

### 3.2.9 Adaptação de células HEK293T a meio livre de SFB

O processo de adaptação das células foi feito de forma sequencial diminuindo gradativamente a quantidade de meio contendo SFB. As células foram cultivadas na mistura de *serum free medium* (SFM) (Meio OptiPRO SFM – ThermoFisher®) e DMEM 10% SFB, até que a condição livre de soro fosse alcançada. O esquema de adaptação está

especificado na **Tabela 1** (VAN DER VALK et al., 2010). A cada passagem, o número total de células e viabilidade foi avaliada utilizando câmara de Neubauer (Lo-Laboroptik<sup>®</sup>) e Azul de Tripán (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) em microscópio óptico invertido (Nikon<sup>®</sup>). Sendo devolvido para garrafa T75 cm<sup>2</sup> (Corning<sup>®</sup>)  $1 \times 10^6$  células/mL. As células permaneceram em cada condição por até 5 passagens.

**Tabela 1.** Adaptação sequencial em meio livre de SFB utilizado para linhagem celular HEK293T

<b>Condição 1</b>
DMEM 10% SFB
<b>Condição 2</b>
75% DMEM 10% SFB + 25% SFM
<b>Condição 3</b>
50% DMEM 10% SFB + 50% SFM
<b>Condição 4</b>
25% DMEM 10% SFB + 75% SFM
<b>Condição 5</b>
5% DMEM 10% SFB + 95% SFM
<b>Condição 6</b>
100% SFM

Após adaptação, as células foram centrifugadas a 1300 G, 5 min e ressuspensas em meio de congelamento - 90% meio SFM e 10% dimetilsulfóxido (DMSO) a uma densidade de  $2 \times 10^6$  células/mL. Os tubos foram armazenados a -80°C.

### **3.3 ESTRATÉGIAS DE EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS gDE7E6 HPV-16 E gDE7E6 HPV-18 EM CÉLULAS CHODG-44**

#### **3.3.1 Transfecção estável de células CHODG-44 em suspensão**

Células CHODG-44 em suspensão foram cultivadas a uma densidade de  $5 \times 10^5$  células/mL em meio CD DG44 (ThermoFisher<sup>®</sup>) em garrafa T25 cm<sup>2</sup> (ThermoFisher<sup>®</sup>). Foi preparado, uma mistura de 2,5 µL do agente lipofílico FreeStyle<sup>™</sup> MAX (ThermoFisher<sup>®</sup>) e 2,5 µg dos plasmídeos pNU1gDE7E6 HPV-16 e pNU1gDE7E6 HPV-18 em 100 µL de meio OptiPRO SFM (ThermoFisher<sup>®</sup>) e homogeneizados gentilmente. O mix foi incubado por 10 min, a temperatura ambiente e adicionado a cultura. As células foram incubadas por 48 horas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Após esse período, foram ressuspensas em meio OptiCHO SFM (ThermoFisher<sup>®</sup>).

#### **3.3.2 Avaliação das células CHODG-44 transfectadas**

O número total de células e a viabilidade foi avaliada utilizando câmara de Neubauer (Lo-Laboroptik<sup>®</sup>) e Azul de Tripán (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) em microscópio óptico invertido (Nikon<sup>®</sup>) a cada 4 dias. Após contagem, foi devolvido o número total de células para garrafa T25 cm<sup>2</sup> (ThermoFisher<sup>®</sup>), incubadas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. As células permaneceram em cultura por 30 dias, até atingirem viabilidade acima de 90%. Durante o período de incubação por 30 dias, realizou-se trocas do meio OptiCHO a cada 3 dias (ThermoFisher<sup>®</sup>).

#### **3.3.3 Clonagem das células CHODG-44 transfectadas por diluição limitante**

O número total de células e a viabilidade foi avaliada utilizando câmara de Neubauer (Lo-Laboroptik<sup>®</sup>) e Azul de Tripán (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) em microscópio óptico invertido (Nikon<sup>®</sup>). Após contagem, realizou-se diluição limitante em meio FortiCHO (ThermoFisher Scientific<sup>®</sup>), suplementado com 10% de meio condicionado, 8mM glutamina (ThermoFisher<sup>®</sup>) e 1x hipoxantina/timidina (ThermoFisher<sup>®</sup>), a fim de obter 1 célula/20 µL. As células foram plaqueadas em placa de 386 poços (Corning<sup>®</sup>), selecionando 169 poços e visualizadas em microscópio óptico invertido (Nikon<sup>®</sup>) a fim de identificar os poços com apenas 1 célula. Foi possível isolar 18 poços para gDE7E6 HPV-16 e 27 poços para gDE7E6 HPV-18, nestes poços, foi adicionado 20 células de CHODG-44 parental, com a finalidade de auxiliar no condicionamento do meio. As células foram incubadas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, durante 30 dias.



### 3.3.4 Amplificação genômica com MTX

Células CHODG-44 transfectadas com os plasmídeos pNU1gDE7E6 HPV-16 e pNU1gDE7E6 HPV-18 em suspensão foram cultivadas a uma densidade de  $10 \times 10^5$  células/mL em meio OptiCHO (ThermoFisher<sup>®</sup>) suplementado com L-glutamina 8 mM em garrafa T25 cm<sup>2</sup> (ThermoFisher<sup>®</sup>) com concentrações de 30 nM, 60 nM, 100 nM e 180 nM de MTX (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>). Após 30 dias, quando a viabilidade alcançava 90% e se mantinha após 3 passagens, as células eram transferidas para meio OptiCHO contendo uma maior concentração de MTX. As células foram incubadas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, durante 120 dias. O número total de células e a viabilidade foi avaliada utilizando câmara de Neubauer (Lo-Laboroptik<sup>®</sup>) e Azul de Tripán (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) em microscópio óptico invertido (Nikon<sup>®</sup>) a cada 4 dias.

### 3.3.5 Expansão das células CHODG-44 gDE7E6 HPV-16 em *spinner*

Células CHODG-44 transfectadas com o plasmídeo pNU1gDE7E6 HPV-16 em suspensão foram cultivadas a uma densidade de  $2 \times 10^5$  células em 50 mL em meio OptiCHO (ThermoFisher Scientific<sup>®</sup>) suplementado com L-glutamina 8 mM em 2 *spinners* separados. As células foram incubadas a 37°C, 8% CO<sub>2</sub> por 3 passagens para adaptação e após 96 horas foi coletado o sobrenadante.

### 3.3.6 Purificação da proteína gDE7E6 HPV-16 por cromatografia de afinidade ao níquel

Para purificação da proteína gDE7E6 HPV-16, o sobrenadante da população mista proveniente do *spinner* (100 mL) foi previamente centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos (min) e dialisados contra Tampão A (0,1 M Tris, 0,25 M NaCl, pH 7,4) *overnight*. O sobrenadante filtrado contendo a proteína recombinante foi purificado por cromatografia de afinidade ao níquel, utilizando coluna His trap HP (1 mL) (GE Healthcare Life Sciences<sup>®</sup>), previamente equilibrada com Tampão A (0,1 M Tris, 0,25 M NaCl, pH 7,4) em sistema AktaFLPC (GE Healthcare Life Sciences<sup>®</sup>). O processo de eluição foi realizado em etapas contendo 5%, 10% e 100% do tampão B (0,1 M Tris, 0,25 M NaCl, 1 M Imidazol, pH 7,4), sendo eluídas da coluna na etapa de 1 M de imidazol. As frações eluídas foram coletadas e analisadas por *western blot* utilizando anticorpo monoclonal anti-gD 1:10.000 (DL-6) (NICOLA et al., 1998).

### 3.3.7 Clonagem em sistema automatizado

O número total de células e a viabilidade foi avaliada utilizando câmara de Neubauer (Lo-Laboroptik®) e Azul de Tripán (Sigma-Aldrich®) em microscópio óptico invertido (Nikon®). Após contagem,  $1 \times 10^5$  células CHODG-44 gDE7E6 HPV-16 e HPV-18 foram adicionadas em 50 mL de meio semisólido CloneMedia-CHO (Molecular Devices®) suplementado com 8mM L-glutamina, 500  $\mu$ L hipoxantina/timidina e 50  $\mu$ L do anticorpo anti-gD conjugado ao FITC (1:1000). Foram plaqueados 2 mL/poço em placa de 6 poços (Greiner® - Cód. 657185) do mix de meio e células. As placas foram incubadas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, durante 14 dias. Após período de incubação, as placas foram scaneadas utilizando sistema automatizado ClonePix (Genetix®). As placas passaram por *screening* sobre luz branca e luz fluorescente (490/525 nm). Ambas imagens foram sobrepostas para revelação do “halo” em torno das colônias. Após scanner, não foram encontrados clones com “halo” fluorescente, segundo os parâmetros do equipamento. Sendo assim, os clones foram visualizados em microscópio óptico invertido (Nikon®). Aqueles com bordas arredondadas e uniformes foram picados com micropipeta de 200  $\mu$ L e transferidos para placa de 96 poços. O cultivo dos clones foi expandido em placa de 24 poços, 6 poços (Greiner® - Cód. 657185) e garrafa T25 cm<sup>2</sup> (ThermoFisher®).

### 3.3.8 Avaliação da expressão de gDE7E6 HPV-16 e gDE7E6 HPV-18 em células CHODG-44 por citometria de fluxo

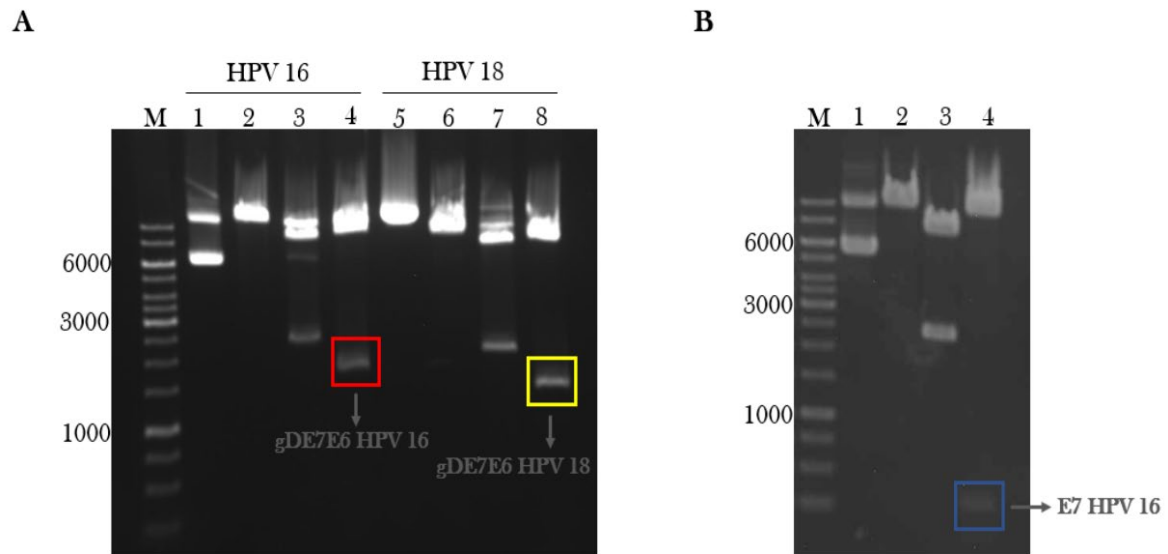
O número total de células e a viabilidade foi avaliada utilizando câmara de Neubauer (Lo-Laboroptik®) e Azul de Tripán (Sigma-Aldrich®) em microscópio óptico invertido (Nikon®). Utilizamos como controle negativo célula CHODG-44 parental não transfectada com os plasmídeos. Após contagem,  $5 \times 10^4$  células CHODG-44 provenientes da população mista, clone e parental foram adicionadas a 200  $\mu$ L de meio OptiCHO contendo Brefeldina A (5 $\mu$ g/mL; GolgiPlug; BD Biosciences®) e Monensina A (10  $\mu$ g/mL; GolgiStop BD Biosciences®) em placa de 96 poços de fundo U (Corning®). As células foram incubadas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> por 12 horas. Após o período de incubação, as células foram lavadas com PBS 2% SFB e fixadas e permeabilizadas utilizando kit Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences®) por 15 min a 4°C. Em seguida, as células foram incubadas com o anticorpo anti-gD FITC diluído 1:200 em tampão de permeabilização por 30 min a 4°C. Após lavagens, as células foram ressuspensas em PBS 2% SFB e adquiridas em citômetro de fluxo LSR Fortessa (BD Biosciences®). As células foram analisadas quanto aos parâmetros de tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC-A) e quanto

à fluorescência do anticorpo anti-gD FITC (10.000 eventos). A porcentagem de células FITC<sup>+</sup> dentre a população total de células foi determinada. Os dados foram analisados no software FlowJo (versão 10.0.7) e GraphPad Prism (versão 6.0).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 ESTRATÉGIAS DE EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS gDE7E6 DO HPV-16, gDE7E6 DO HPV-18 E E7 HPV-16 EM *P. PASTORIS*

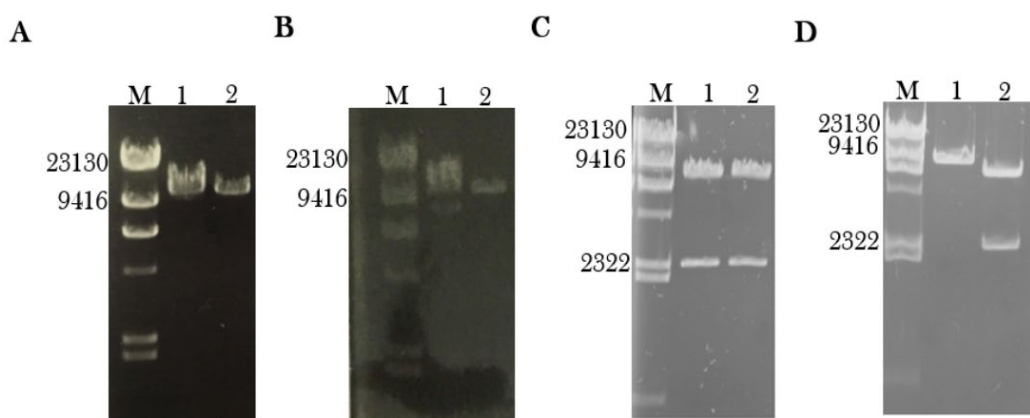
Células de *E. coli* transformadas com o vetor pPIC9KgDE7E6 HPV-16, pPIC9KgDE7E6 HPV-18 e pPIC9KE7 HPV-16 foram analisadas após extração de DNA plasmidial e digestão do mesmo com as enzimas de restrição *SalI*, *BglII*, *NotI* e *EcoRI*. O DNA plasmidial apresentou as seguintes concentrações finais: pPIC9KgDE7E6 HPV-16: 893 ng/ $\mu$ L, pPIC9KgDE7E6 HPV-18: 626 ng/ $\mu$ L, pPIC9KE7 HPV-16: 702,8 ng/ $\mu$ L. O plasmídeo pPIC9KgDE7E6 HPV-16 foi digerido com as enzimas de restrição (i) *SalI*, onde obtivemos 1 banda com um massa molecular de 11.013 pb, (ii) *BglII*, onde foram obtidas 2 bandas com massas moleculares de 8.610 e 2.403 pb, correspondente a digestão do vetor e (iii) *EcoRI* e *NotI* onde foram observadas 2 bandas com massas moleculares de 9.263 e 1.750 pb, correspondente ao vetor e ao inserto, respectivamente. O plasmídeo pPIC9KgDE7E6 HPV-18 foi digerido com as enzimas de restrição (i) *SalI*, onde obtivemos 1 banda com massa molecular de 11.004 pb, (ii) *BglII*, onde foram obtidas 2 bandas com massas moleculares de 8.601 e 2.403 pb, correspondente a digestão do vetor, respectivamente e (iii) *EcoRI* e *NotI*, onde foram observadas 2 bandas com massas moleculares de 9.263 e 1.741 pb, correspondente ao vetor e inserto, respectivamente. O plasmídeo pPIC9KE7 HPV-16 foi digerido com as enzimas de restrição (i) *SalI*, onde obtivemos 1 banda com uma massa molecular de 9.585 pb, (ii) *BglII*, onde foram obtidas 2 bandas com massas moleculares de 7.182 e 2.403 pb, correspondente à digestão do vetor e (iii) *EcoRI* e *NotI* onde foram observadas 2 bandas com massas moleculares de 9.263 e 322 pb, correspondente ao vetor e ao inserto, respectivamente. As massas moleculares das bandas obtidas após a digestão corresponderam ao predito *in silico* (**Figura 2**).



**Figura 2. Digestão dos plasmídeos pPIC9KgDE7E6 HPV-16, pPIC9KgDE7E6 HPV-18 e pPIC9KE7 HPV-16.** Gel de agarose 0,8%. (A) Amostras - M: Marcador de massa molecular; 1: pPIC9KgDE7E6 HPV-16 não digerido (11.013 pb); 2: pPIC9KgDE7E6 HPV-16 digerido com *SalI* (11.013 pb); 3: pPIC9KgDE7E6 HPV-16 digerido com *BglII* (Vetor: 8.610 pb/Insero: 2.403 pb); 4: pPIC9KgDE7E6 HPV-16 digerido com *NotI/EcoRI* (Vetor: 9.263 pb/Insero: 1.750 pb) Destaque vermelho: gDE7E6 HPV-16; 5: pPIC9KgDE7E6 HPV-18 não digerido (11.004 pb); 6: pPIC9KgDE7E6 HPV-18 digerido com *SalI* (11.004 pb); 7: pPIC9KgDE7E6 HPV-18 digerido com *BglII* (Vetor: 8.601 pb/Insero: 2.403 pb); 8: pPIC9KgDE7E6 HPV-18 digerido com *NotI/EcoRI* (Vetor: 9263 pb/Insero: 1741 pb) Destaque amarelo: gDE7E6 HPV-18 (B) Amostras - M: Marcador de massa molecular; 1: pPIC9KE7 HPV-16 não digerido (9.585 pb); 2: pPIC9KE7 HPV-16 digerido com *SalI* (9.585 pb); 3: pPIC9KE7 HPV-16 digerido com *BglII* (Vetor: 7.182 pb/Insero: 2.403 pb); 4: pPIC9KE7 HPV-16 digerido com *NotI/EcoRI* (Vetor: 9.263 pb/Insero: 322 pb) Destaque azul: E7 HPV-16.

Após a confirmação dos clones por sequenciamento, as construções pPIC9KgDE7E6 do HPV-16, pPIC9KgDE7E6 do HPV-18 e pPIC9KE7 HPV-16 (40  $\mu$ g) foram preparadas para eletroporação após a digestão com *SalI* e *BglII* e purificadas por precipitação com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico e etanol absoluto gelado. A digestão com *SalI* leva a inserção no locus *his4* e geração do fenótipo His<sup>+</sup>Mut<sup>+</sup> que leva ao crescimento normal da levedura na presença de metanol, enquanto que a digestão com *BglII* leva à substituição no locus AOX1 e geração do fenótipo His<sup>+</sup>Mut<sup>S</sup> que resulta em crescimento lento da levedura na presença de metanol. Os plasmídeos pPIC9KgDE7E6 HPV-16 e pPIC9KgDE7E6 HPV-18 foram digeridos com *SalI* onde foram obtidas bandas com massa molecular de 11.013 e 11.004 pb, respectivamente. Quando as construções (pPIC9KgDE7E6 HPV-16 e pPIC9KgDE7E6 HPV-18) foram digeridas com *BglII* foram obtidas bandas com massa molecular correspondente à digestão do vetor de 8.610 e 2.403 pb e 8.601 e 2.403 pb, respectivamente. O plasmídeo pPIC9KE7 HPV-16 foi digerido com *SalI*, onde foi obtida 1 banda com massa molecular de 9.585 pb, e *BglII*, onde foram

obtidas bandas com massas moleculares de 7.182 e 2.403 pb. Os tamanhos obtidos após a digestão corresponderam ao predito *in silico*. (**Figura 3**).

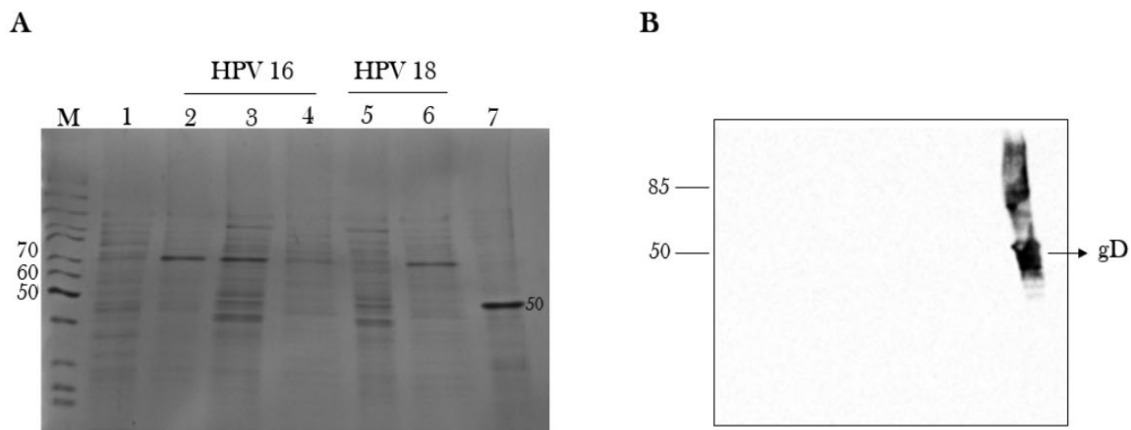


**Figura 3. Digestão dos plasmídeos pPIC9KgDE7E6 HPV-16 e 18 com *SalI* e *BglII*.** Gel de agarose 0,5%. **(A)** Amostras digeridas com *SalI* - M: Marcador de massa molecular; 1: Controle Positivo AMA-1 (11.353 pb); 2: pPIC9KgDE7E6 HPV-16 (11.013 pb); **(B)** Amostras digeridas com *SalI* - M: Marcador de massa molecular; 1: Controle Positivo AMA-1 (11.353 pb); 2: pPIC9KgDE7E6 HPV-18 (11.004 pb) **(C)** Amostras digeridas com *BglII* - M: Marcador de massa molecular; 1: pPIC9KgDE7E6 HPV-16 (8.610 e 2.403 pb); 2: pPIC9KgDE7E6 HPV-18 (8.601 e 2.403 pb) **(D)** Amostras digeridas com *SalI* e *BglII*, respectivamente - M: Marcador de massa molecular; 1: pPIC9KE7 HPV-16 (9.585 pb); 2: pPIC9KE7 HPV-16 (7.182 e 2.403 pb).

Após o processo de eletroporação das leveduras, realizamos a seleção dos clones pPIC9KgDE7E6 HPV-16, pPIC9KgDE7E6 HPV-18 e pPIC9KE7 HPV-16 resistentes ao antibiótico geneticina em diferentes concentrações (0,5, 1,0, 2,0 e 4,0 mg/ml). Clones que exibem maior resistência à geneticina apresentam maior número de cópias do gene de interesse inserido no genoma de *P. pastoris* e, conseqüentemente, maiores chances de obter maior rendimento da proteína de interesse. Para as construções digeridas com *SalI* foram selecionados os seguintes clones: pPIC9KgDE7E6 HPV-16 clones: 10, 48 e 38), pPIC9KgDE7E6 HPV-18 clones: 27 e 58, e pPIC9KE7 HPV-16 clones: 7, 49 e 50. Para as construções digeridas com *BglII* foram selecionados os seguintes clones: pPIC9KgDE7E6 HPV-16 clones: 15 e 34, pPIC9KgDE7E6 HPV-18 clones: 11 e 12, e pPIC9KE7 HPV-16 clone 27. Tais clones foram submetidos ao processo de expressão para definição da melhor condição de cultivo nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas.

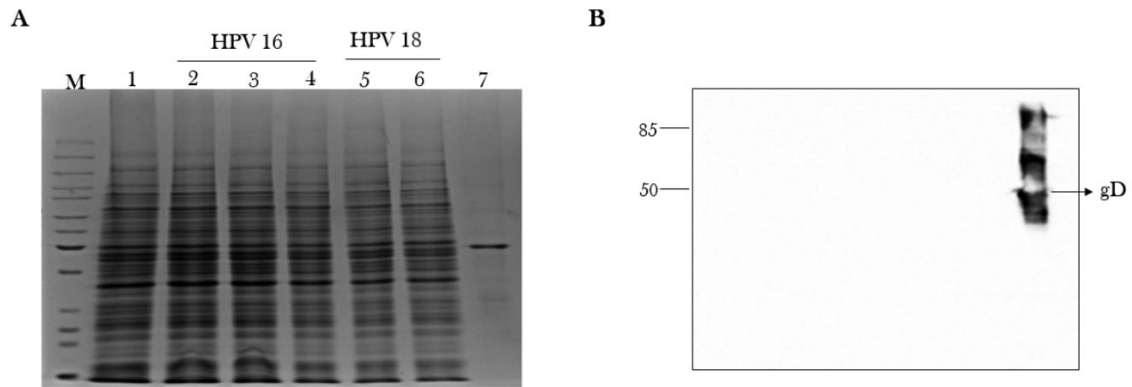
Primeiramente, os sobrenadantes das culturas provenientes das construções pPIC9KgDE7E6 HPV-16 e HPV-18 de todos os clones com tempo de expressão de 24 horas foram concentrados com sulfato de amônio, e avaliados por SDS-PAGE e *western blot* utilizando anticorpo monoclonal anti-gD (DL-6). Foram utilizados como controle negativo e positivo as proteínas AMA-1 (VICENTIN et al., 2014) e gD, respectivamente. As proteínas gDE7E6 do HPV-16 e do HPV-18 apresentam massa molecular predita *in*

*silico* de aproximadamente 70 kDa, no entanto, as bandas observadas no SDS-PAGE com tamanho de aproximadamente 70 kDa correspondem à proteína AOX1, utilizada pela *P. pastoris* para metabolizar o metanol (**Figura 4A**). Além disso, não foi verificada marcação específica das proteínas com o anticorpo anti-gD (NICOLA et al., 1998) no *western blot*. A marcação específica foi observada somente na canaleta contendo o controle positivo, a proteína gD. (**Figura 4B**).



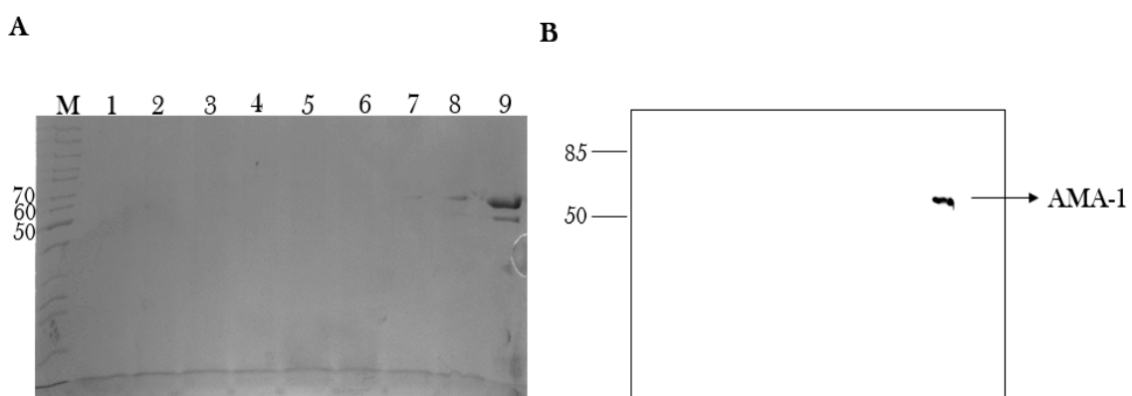
**Figura 4. Avaliação da expressão de gDE7E6 HPV-16 e 18 (24 horas) em sobrenadante concentrado de culturas de *P. pastoris*.** (A) Gel SDS-PAGE 15%; Amostras - M: Marcador de massa molecular; 1: AMA-1 (57 kDa); 2: gDE6E7 HPV-16 – Clone 10; 3: gDE6E7 HPV-16 – Clone 48; 4: gDE6E7 HPV-16 – Clone 38; 5: gDE6E7 HPV-18 – Clone 27; 6: gDE6E7 HPV-18 – Clone 58; 7: gD (~50 kDa). (B) *western blot* revelado por quimiluminescência utilizando o anticorpo anti-gD (diluição de 1:10.000 - DL-6).

Para avaliar com mais exatidão a presença das proteínas no compartimento intracelular, realizamos novo ensaio de indução de expressão com tempo de 24 horas e os extratos de todos os clones foram analisados por SDS-PAGE. Além disso, realizamos o *western blot* utilizando o anticorpo monoclonal anti-gD (DL-6) (NICOLA et al., 1998; revelado pela técnica de quimiluminescência). Não foram observadas bandas com massas moleculares compatíveis às das proteínas gDE7E6 do HPV-16 e do HPV-18 em SDS-PAGE (**Figura 5A**) nem a marcação específica das proteínas por *western blot*, sendo detectado apenas o controle positivo (gD) (**Figura 5B**).



**Figura 5.** Avaliação da expressão de gDE7E6 HPV 16 e 18 a partir do extrato de *P. pastoris* com tempo de expressão de 24 horas por SDS-PAGE e *western blot*. (A) Gel SDS-PAGE 15%; Amostras - M: Marcador de massa molecular; 1: AMA-1 (57 kDa); 2: gDE6E7 HPV-16 – Clone 10; 3: gDE6E7 HPV-16 – Clone 48; 4: gDE6E7 HPV-16 – Clone 38; 5: gDE6E7 HPV-18 – Clone 27; 6: gDE6E7 HPV-18 – Clone 58; 7: gD (43 kDa). (B) *western blot* revelado por quimiluminescência utilizando anticorpo primário anti-gD (1:10.000; DL-6).

Os sobrenadantes das culturas provenientes da construção pPIC9KE7 HPV-16 do clone 50 em todos os tempos de expressão foram avaliados por SDS-PAGE e *western blot* utilizando um anticorpo monoclonal que reconhece a cauda de histidina na proteína recombinante, anti-His. Foram utilizados como controle positivo e negativo as proteínas AMA-1 e sobrenadante de *P. pastoris* sem plasmídeo, respectivamente. A proteína E7 do HPV-16 apresentam massa molecular predita *in silico* de aproximadamente 20 kDa, no entanto, não observamos bandas com massas moleculares compatíveis no gel (**Figura 6A**). Além disso, não foi verificada marcação específica das proteínas com o anticorpo anti-His no *western blot* (**Figura 6B**).



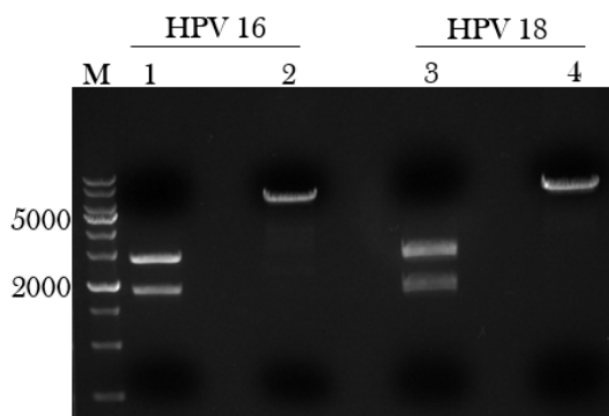
**Figura 6.** Avaliação da expressão da E7 HPV 16 no sobrenadante de cultura de *P. pastoris* com tempos de expressão de 24, 48, 72, 96 horas. Gel SDS-PAGE 15% (A) Amostras - M: Marcador de massa molecular; 1: E7 Clone 50 – 24 horas; 2: E7 Clone 50 – 48 horas; 3: E7 Clone 50 – 72 horas; 4: E7 Clone 50 – 96 horas; 5: *P. pastoris* não transformada 24 horas; 6: *P. pastoris* não transformada 48 horas; 7: *P. pastoris* não transformada 72 horas; 8: *P. pastoris* não transformada 96 horas; 9: AMA (57 kDa). (B) *western blot* revelado por quimiluminescência utilizando anticorpo primário anti-His.



Diante dos resultados descritos, após diversas tentativas não foi possível observar expressão das proteínas gDE7E6 HPV-16, gDE7E6 HPV-18 e E7-HPV-16 no sobrenadante e extrato celular de *P. pastoris*. Por este motivo, decidimos trocar o sistema de expressão para a produção das proteínas.

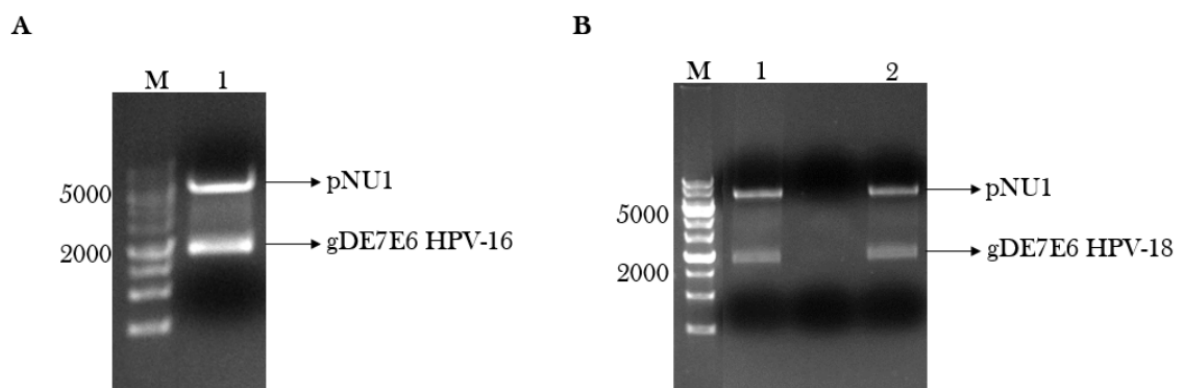
#### **4.2 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS gDE7E6 HPV-16 E gDE7E6 HPV-18 EM CÉLULAS HEK293T**

Diante da ausência de expressão das proteínas propostas no trabalho em *P. pastoris*, como alternativa, passamos a trabalhar com células de mamíferos. A expressão das proteínas gDE7E6 HPV-16 e HPV-18 foi inicialmente testada em células HEK293T para avaliação da viabilidade dos plasmídeos. As construções pUC57gDE7E6 HPV-16 e HPV-18 juntamente com o vetor pNU1 foram analisadas por eletroforese em agarose. O plasmídeo pUC57gDE7E6 HPV-16 foi digerido com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Nhe*I, onde foram obtidas 2 bandas com massas moleculares de 2.710 e 1.794 pb, corresponde ao vetor e inserto, respectivamente. O plasmídeo pUC57gDE7E6 HPV-18 foi digerido com as enzimas de restrição *Eco*RI e *Nhe*I, onde foram obtidas 2 bandas com massas moleculares de 2.710 e 1.791 pb, correspondente ao vetor e ao inserto, respectivamente. O vetor pNU1 foi digerido com as mesmas enzimas utilizadas nas construções dos genes que codificam as proteínas do HPV-16 e HPV-18 com a finalidade de realizar a posterior ligação das sequências no vetor. As massas moleculares das bandas obtidas após a digestão corresponderam ao predito *in silico* (**Figura 7**).



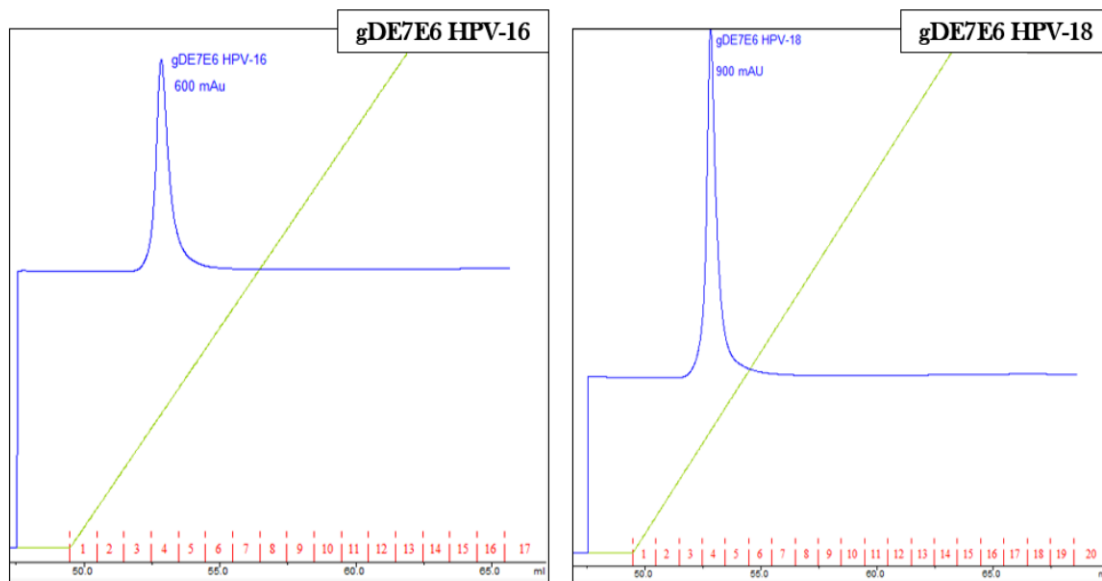
**Figura 7. Digestão dos plasmídeos pUC57gDE7E6 HPV-16 e pUC57gDE7E6 HPV-18.** Gel de agarose 1 %. Amostras - M: Marcador de massa molecular; 1: pUC57gDE7E6 HPV-16 digerido com *Bam*HI e *Nhe*I (Vetor: 2.710 pb/Inserto: 1.794 pb); 2: Vetor pNU1 digerido com *Bam*HI e *Nhe*I (6.500pb); 3: pUC57gDE7E6 HPV-18 digerido com *Eco*RI e *Nhe*I (Vetor: 2.710 pb/Inserto: 1.791 pb); 4: Vetor pNU1 digerido com *Eco*RI e *Nhe*I (6.500pb).

Em seguida, foi realizada a purificação dos insertos gDE7E6 HPV-16 e HPV-18 e do vetor pNU1 a partir do gel de agarose. O DNA plasmidial do vetor e inserto após a purificação apresentou as seguintes concentrações finais: gDE7E6 HPV 16: 40 ng/μL; gDE7E6 HPV 18: 25 ng/μL; pNU1 HPV-16: 14 ng/μL; pNU1 HPV-18: 20 ng/μL. Em seguida, foi realizada a reação de ligação do vetor e inserto, sendo utilizada na transformação de bactérias *E. coli* XL10Gold. O DNA plasmidial extraído foi submetido a uma digestão com enzimas de restrição. O plasmídeo pNU1gDE7E6 HPV-16 foi digerido com as enzimas *Bam*HI e *Nhe*I onde foram obtidas 2 bandas com pesos moleculares de 6.000 e 1.809 pb. O plasmídeo pNU1gDE7E6 HPV-18 foi digerido com as enzimas *Eco*RI e *Nhe*I onde foram obtidas 2 bandas com pesos moleculares de 6.000 e 1.806 pb. Portanto, as clonagens das sequências de interesse gDE7E6 HPV-16 e gDE7E6 HPV-18 no vetor pNU1 foram realizadas com sucesso. (**Figura 8**).



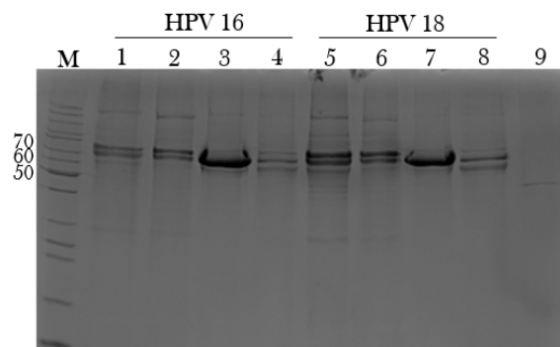
**Figura 8. Digestão dos plasmídeos pNU1gDE7E6 HPV-16 e pNU1gDE7E6 HPV-18.** Gel de agarose 1%. (**A**) Amostras - M: Marcador de massa molecular; 1: pNU1gDE7E6 HPV-16 clone 1 (**B**): M: Marcador de massa molecular; 1: pNU1gDE7E6 HPV-18 clone 1; 2: pNU1gDE7E6 HPV-18 clone 2.

Os plasmídeos pNU1gDE7E6 HPV-16 e pNU1gDE7E6 HPV-18 foram utilizados para transfecção transitória de células HEK293T, com tempo de expressão de 96 horas. Em seguida, o sobrenadante (60 mL) foi submetido a cromatografia de afinidade ao níquel, sendo possível observar um único pico para ambas as proteínas (gDE7E6 HPV-16 – 600 mAU e gDE7E6 HPV-18 – 900 mAU), a eluição foi realizada com 230 mM de imidazol 1M (**Figura 9**).



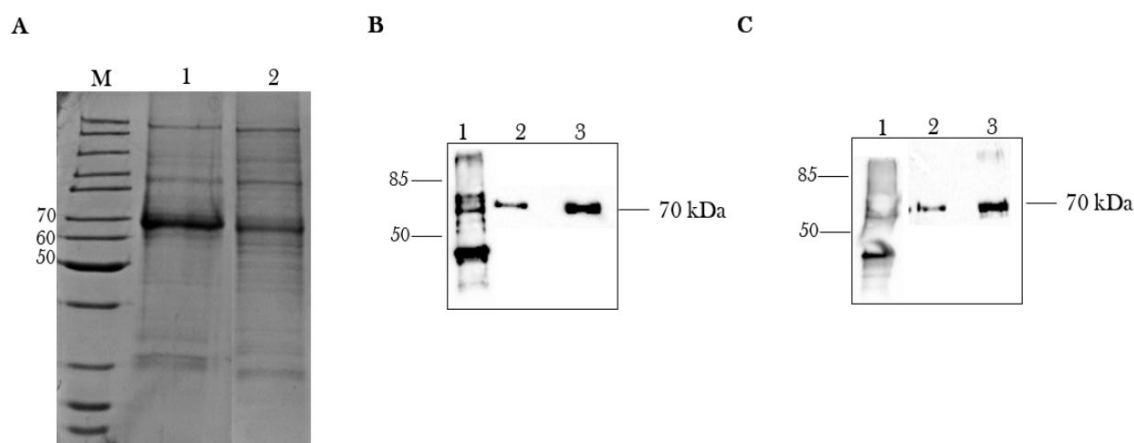
**Figura 9. Cromatograma da purificação por afinidade ao níquel das proteínas recombinantes gDE7E6 HPV-16 e gDE7E6 HPV-18.**

As proteínas gDE7E6 HPV-16 e gDE7E6 HPV-18 apresentam massa molecular predita *in silico* de aproximadamente 70 kDa, sendo possível observar banda com massa molecular compatível em SDS-PAGE. No entanto, foi possível observar uma banda adicional com mesma massa molecular, proveniente da presença de albumina do SFB utilizado na cultura das células HEK293T. Além disso, observamos que grande parte do SFB foi eliminado no *Flow-through* e que possivelmente uma pequena quantidade das proteínas recombinantes interagiram menos com a coluna HisTrap HP pela interferência da presença das proteínas do SFB (**Figura 10**).



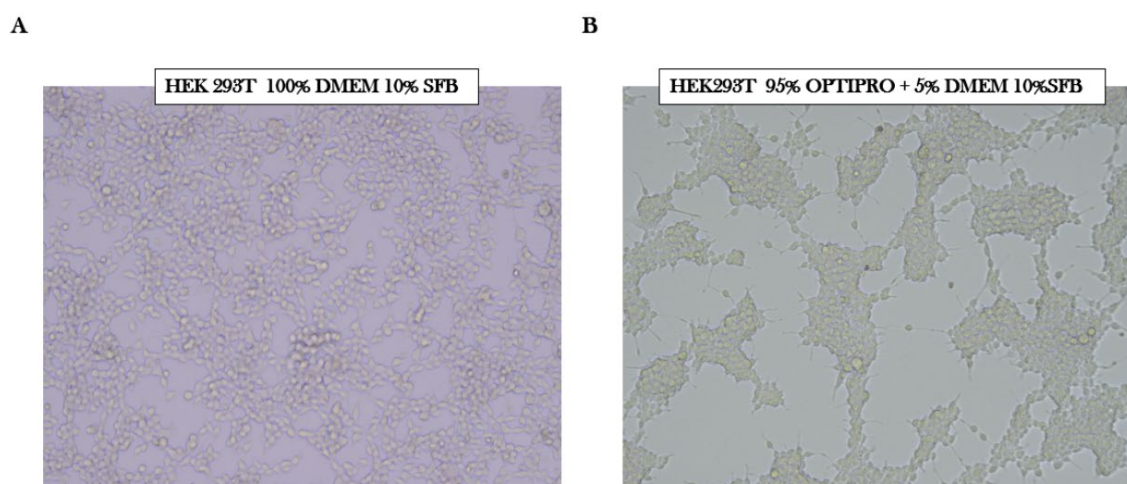
**Figura 10. Avaliação da purificação das proteínas recombinantes gDE7E6 HPV-16 e gDE7E6 HPV-18 por SDS-PAGE.** SDS-PAGE 15%; Amostras - M: Marcador Molecular; 1: gDE7E6 HPV-16 Fração 4 (70 kDa); 2: gDE7E6 HPV-16 Fração 5 (70 kDa); 3: *Flow-through* do gDE6E7 HPV-16; 4: *Wash* do gDE6E7 HPV-16; 5: gDE6E7 HPV-18 Fração 4 (70 kDa); 6: gDE6E7 HPV-18 Fração 5 (70 kDa); 7: *Flow-through* do gDE6E7 HPV-18; 8: *Wash* do gDE6E7 HPV-18; 9: Controle positivo gD (43 kDa).

Como forma de escalonar o processo de produção das proteínas recombinantes, aumentamos o volume total da cultura para 200 mL. No entanto, na primeira tentativa de purificação, observamos que o níquel se soltou da coluna, provavelmente pelo acúmulo de aminoácidos presentes no meio, como arginina e cisteína, que quelam o níquel. Diante disso, realizamos 2 diálises contra Tampão A para remoção dos aminoácidos e realizamos novamente a purificação por cromatografia de afinidade. Foi observado que mesmo após as diálises o SFB ainda estava presente na amostra, porém foi verificada marcação específica das proteínas com o anticorpo anti-His e anti-gD (DL-6) (NICOLA et al., 1998) no *western blot* (**Figura 11**).



**Figura 11. Avaliação da purificação das proteínas recombinantes gDE7E6 HPV-16 e gDE7E6 HPV-18 por SDS-PAGE e *western blot*.** SDS-PAGE 15% (A) Amostras - M: Marcador Molecular; 1: gDE7E6 HPV-16 purificada (70 kDa); 2: gDE7E6 HPV-18 purificada (70 kDa) (B) *western blot* revelado por quimiluminescência utilizando anticorpo primário anti-His (1:4000) Amostras: 1: Controle positivo gD; 2: gDE7E6 HPV-16 purificada (70 kDa); 3: gDE7E6 HPV-18 purificada (70 kDa) (C) *western blot* revelado por quimiluminescência utilizando anticorpo primário anti-gD (DL-6) (1:10000) Amostras: 1: Controle positivo gD; 2: gDE7E6 HPV-16 purificada (70 kDa); 3: gDE7E6 HPV-18 purificada (70 kDa).

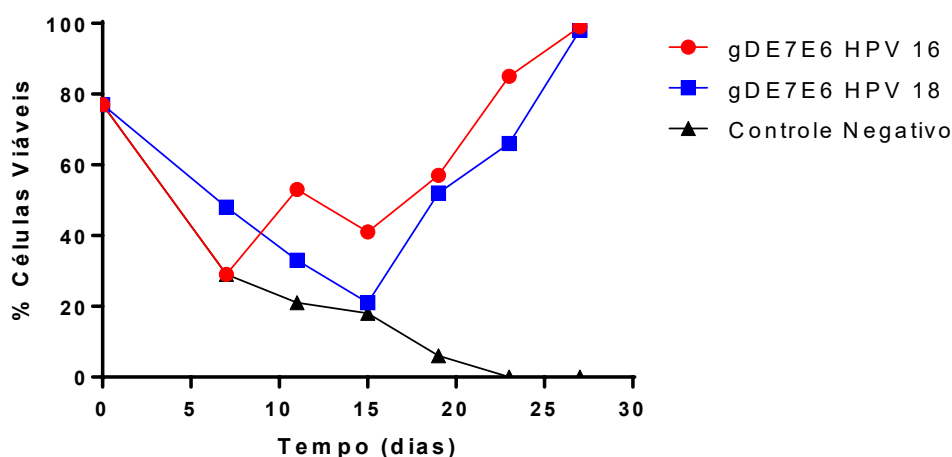
Diante disso dos problemas encontrados, para otimizar o processo de purificação, iniciamos a adaptação de células HEK293T a meio livre de SFB. Para adaptação, nós utilizamos o meio OptiPRO SFM, livre de compostos de origem animal e com baixo teor de proteínas. A linhagem HEK 293T cresceu inicialmente em meio DMEM 10% SFB, sendo diminuído gradativamente a porcentagem de DMEM 10% SFB, como citado na **tabela 1**. Nas primeiras passagens de 25% (25:75 SFM: DMEM 10%SFB), 50% (50:50 SFM: DMEM 10%SFB) e 75% (75:25 SFM: DMEM 10% SFB) foi possível obter células adaptadas com confluência e viabilidade superior a 90%. Após 5 passagens em 100% SFM, as células formavam grandes aglomerados (ilhas), que retardavam o crescimento. Sendo assim, decidimos fazer uma passagem intermediária de 95% (95:5 SFM: DMEM 10% SFB), porém as células continuaram a crescer aglomeradas, sem atingir confluência desejável (**Figura 12**). Sendo assim, decidimos não continuar com os testes de expressão em células HEK, visto que a morfologia alterada influenciaria na eficiência da transfecção.



**Figura 12. Adaptação da linhagem celular HEK293T ao meio livre de soro.** (A) Células HEK293T cultivadas em garrafas T75 cm<sup>2</sup> em meio DMEM 10%SFB. (B) Células HEK293T cultivadas em garrafas T75 cm<sup>2</sup> em meio 95% OptiPRO SFM

### 4.3 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS gDE7E6 HPV-16 E gDE7E6 HPV-18 EM CÉLULAS CHODG-44

Com o objetivo de gerar clones estáveis produtores das proteínas recombinantes e de utilizar células já adaptadas ao meio livre de SFB, os plasmídeos pNU1gDE7E6 HPV-16 e pNU1gDE7E6 HPV-18 foram utilizados para transfecção estável de células CHODG-44 em suspensão. Células CHODG-44 são deficientes na expressão da enzima DHFR que catalisa a síntese de purinas/pirimidinas necessárias para replicação da célula. As células foram transfectadas com os plasmídeos pNU1gDE7E6 HPV-16 e pNU1gDE7E6 HPV-18, que contêm o gene da DHFR, e desta forma, adquirem a capacidade de replicar em um meio deficiente para tal enzima (meio OptiCHO SFM). As células foram cultivadas por 30 dias e, durante a seleção, foi possível observar que a porcentagem de células viáveis caiu para 30% para gDE7E6 HPV-16 e 20% para gDE7E6 HPV-18, devido a morte de células não transfectadas ou transfectadas de forma transiente. A partir do dia 20 da cultura, a viabilidade das células retornou aos níveis normais, gerando uma população de células transfectadas de forma estável (**Figura 13**).



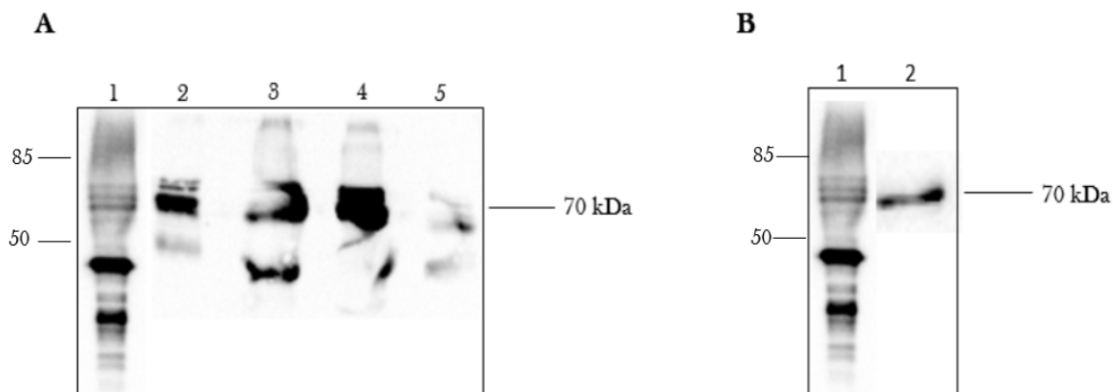
**Figura 13.** Seleção das células CHODG-44 transfectadas através da avaliação da porcentagem de células viáveis, no período de 30 dias. Controle negativo: células não transfectadas.

A população estável gerada é composta por células que expressam as proteínas de interesse em diferentes níveis. Com o intuito de obter clones que expressam as proteínas em níveis desejáveis, duas estratégias podem ser aplicadas: (i) clonagem por diluição limitante e (ii) amplificação genômica com MTX. Para selecionar os clones individuais, nós escolhemos a primeira opção, diluição limitante. As células foram diluídas para obter uma média de 0,75 células/poço e subcultivadas com CHODG-44 parental em meio

quimicamente definido FortiCHO, que aumenta em até 120% o crescimento e sobrevivência das células. Além disso, o meio foi suplementado com Hipoxantina/timidina, precursores para síntese de nucleotídeos, necessários para replicação. As células permaneceram em cultura por 30 dias e, após esse período, não foi possível observar crescimento e sobrevivência dos clones.

Por se tratar de uma técnica trabalhosa e complexa, decidimos realizar um passo anterior, a amplificação genômica com MTX, a fim de selecionar os clones com maiores níveis de expressão das proteínas recombinantes. O MTX é um inibidor da DHFR e, para superar esta inibição, as células aumentam o número de cópias da DHFR no genoma. Os genes da gDE7E6 HPV-16 ou gDE7E6 HPV-18 estão integrados no mesmo locus genético da DHFR, sendo assim, o gene de interesse é possivelmente coamplificado, levando ao aumento da produção das proteínas. O processo de amplificação foi realizado aumentando de forma gradativa a concentração de MTX (30 nM, 60 nM, 100 nM e 180 nM). A passagem para a concentração seguinte foi realizada somente após a recuperação do número total e viabilidade das células em 90%, mantidos por 3 passagens.

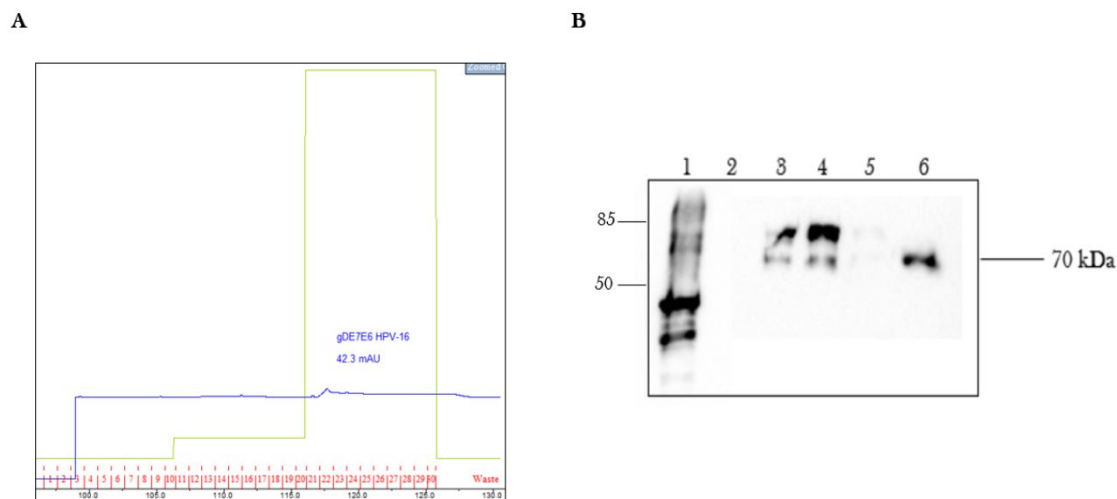
Após concentração do sobrenadante, foi realizado um *western blot* utilizando o anticorpo monoclonal anti-gD (ID-3) revelado pela técnica de quimiluminescência. Para a proteína gDE7E6 HPV-16 foi possível detectar enriquecimento da expressão após o aumento da concentração de MTX até 100 nM, porém na concentração de 180 nM foi observado diminuição da expressão (**Figura 14A**). Para a proteína gDE7E6 HPV-18, foi possível observar expressão até a concentração de 60 nM de MTX, não sendo possível realizar a amplificação em concentrações maiores (**Figura 14B**).



**Figura 14.** Avaliação da amplificação genômica com MTX por *western blot* revelado por quimiluminescência utilizando anticorpo primário anti-gD (ID-3). **(A)** Amostras: 1: Controle positivo gD (43 kDa); 2: gDE7E6 HPV-16 30 nM MTX (70 kDa); 3: gDE7E6 HPV-16 60 nM MTX (70 kDa); 4: gDE7E6 HPV-16 100 nM MTX; 5: gDE7E6 HPV-16 180 nM MTX (70 kDa). **(B)** Amostras: Controle positivo gD (43 kDa); 2: gDE7E6 HPV-18 60 nM MTX (70 kDa).

Após a geração de população mista amplificada com MTX, realizamos tentativa de purificação da proteína gDE7E6 HPV-16 por cromatografia de afinidade ao níquel. O sobrenadante de cultura (100 mL) provindo de culturas em suspensão em *spinner*, foi submetido a cromatografia de afinidade, após dialise em tampão A (0,1 M Tris, 0,25 M NaCl, pH 7,4). Foi possível observar um único pico de 42.3 mAU, a eluição foi realizada com 1 M de imidazol (**Figura 15A**). A proteína gDE7E6 HPV-16 apresenta massa molecular de 70 kDa e foi possível observar banda com massa molecular compatível no *western blot*. No entanto, foi observado marcação específica na amostra coletada durante a lavagem da coluna, sendo assim, uma pequena quantidade de proteína pode não ter interagido de forma adequada com a coluna HisTrap HP (**Figura 15B**). Diante desses resultados, mostramos que as células CHODG-44 produziram e secretaram a proteína gDE7E6 HPV-16 no meio de cultura. No entanto, a presença da proteína na amostra coletada durante a lavagem pode caracterizar uma baixa afinidade com a histidina imobilizada na coluna visto que a lavagem foi realizada com 5 mM de imidazol. Além disso, por se tratar de uma proteína solúvel, sua conformação estrutural pode esconder uma parte da cauda de histidina, dificultando sua interação com a coluna. Após a purificação, realizamos diversas tentativas de quantificação da concentração da gDE7E6 HPV-16 eluída, por diferentes técnicas como Bradford, BSA e ELISA, porém pelo baixo rendimento, não foi possível mensurar de forma confiável a concentração da proteína. Não foi possível realizar a purificação da proteína gDE7E6 HPV-18, pelo baixo rendimento de produção, quando comparado a proteína gDE7E6 HPV-16.



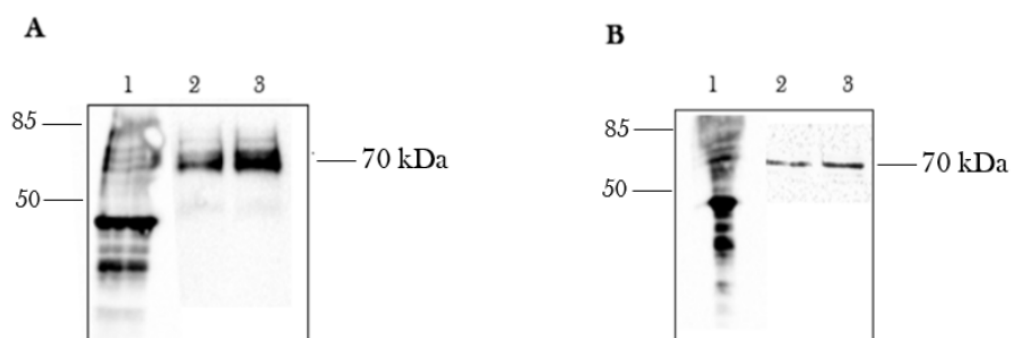


**Figura 15. (A) Cromatograma da purificação por afinidade ao níquel da proteína recombinante gDE7E6 HPV-16 (B) western blot revelado por quimiluminescência utilizando anticorpo primário anti-gD (ID-3).** Amostras: 1: Controle positivo gD (43 kDa); 2: gDE7E6 HPV-16 Fração 21 (70 kDa); 3: gDE7E6 HPV-16 Fração 22 (70 kDa); 4: gDE7E6 HPV-16 Fração 23 (70 kDa); 5: gDE7E6 HPV-16 Fração 24 (70 kDa); 6: gDE7E6 HPV-16 Lavagem (70 kDa).

Com o intuito de aumentar os níveis de expressão da gDE7E6 HPV-16 e da gDE7E6 HPV-18 buscamos isolar um clone estável produtor de cada uma das proteínas através de um *screening* da população mista de CHODG-44 em sistema automatizado ClonePix (Genetix®). Neste sistema, as células são providas com os nutrientes necessários para crescer immobilizadas em um meio semisólido, facilitando a avaliação individual da expressão. Após o crescimento, os clones produtores são identificados pela formação de um “halo” resultante da ligação do anticorpo fluorescente na proteína de interesse dispersa no meio semisólido. As células CHODG-44 gDE7E6 HPV-16 e gDE7E6 HPV-18 foram adicionadas em um mix de meio semisólido, anticorpo anti-gD FITC, L-glutamina e hipoxantina/timidina (HT) e mantidas em estufa a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> durante 14 dias. Após este período foi possível visualizar a formação das colônias. Os clones foram primeiramente visualizados no ClonePix (Genetix®) sob luz branca (490 nm), aqueles com morfologia aceitos pelo equipamento como tamanho, bordas regulares, formato arredondado e células únicas foram imageados sob luz fluorescente (525 nm). Após exposição, alguns clones não exibiram a formação do halo e outros exibiram fluorescência inespecífica, não sendo aceitos pelos critérios do equipamento. Acreditamos que a utilização de um anticorpo anti-gD FITC conjugado *in house*, pode ter influenciado na

formação do halo, visto que não se sabe a concentração exata de FITC conjugada ao anticorpo e sua estabilidade por longos períodos a 37°C.

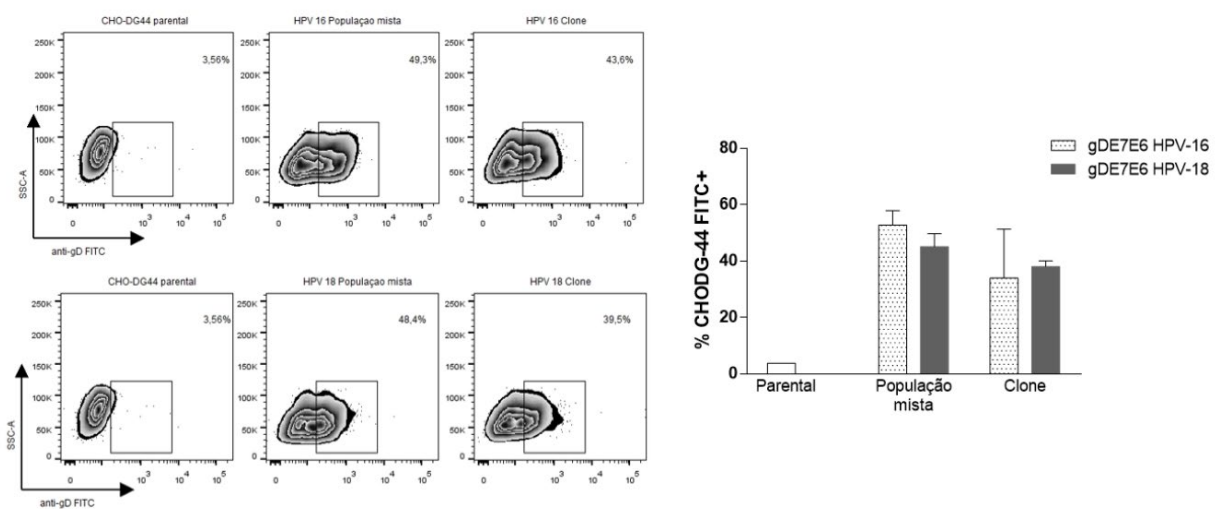
Sendo assim, realizamos uma seleção manual dos clones através de visualização em microscópio invertido, mantendo alguns dos parâmetros do ClonePix (Genetix®). Foram selecionados 5 clones para gDE7E6 HPV-16 e 7 clones para gDE7E6 HPV-18 em placa de 96 poços. Em seguida os clones foram expandidos para placa de 24 poços, 6 poços e garrafa T25 cm<sup>2</sup>. Durante a expansão, alguns não sobreviveram e outros não expressavam as proteínas de interesse. Ao final do processo, foram selecionados o clone gDE7E6 HPV-16 (4) e gDE7E6 HPV-18 (4). Após concentração do sobrenadante, foi realizado um *western blot* utilizando o anticorpo monoclonal anti-gD (ID-3) revelado pela técnica de quimiluminescência. Foi possível, observar banda com massa molecular compatível de 70 kDa referente às proteínas gDE7E6 HPV-16 (**Figura 16A**) e gDE7E6 HPV-18 (**Figura 16B**).



**Figura 16. *western blot* revelado por quimiluminescência utilizando anticorpo primário anti-gD (ID-3) (A) Amostras: 1: Controle positivo gD (43 kDa); 2: gDE7E6 HPV-16 5X (70 kDa); 3: gDE7E6 HPV-16 15X (70 kDa) (B) 1: Controle positivo gD (43 kDa); 2: gDE7E6 HPV-18 5X (70 kDa); 3: gDE7E6 HPV-18 15X (70 kDa).**

Com os clones selecionados, realizamos citometria de fluxo para avaliar a porcentagem de células CHODG-44 que expressavam as proteínas gDE7E6 HPV-16 e HPV-18 dentro da população mista e o clone propriamente dito. As células foram submetidas à marcação com anti-gD FITC, adquiridas em citômetro de fluxo LSR Fortessa (BD Biosciences®) e os dados analisados no software FlowJo (versão 10.0.7). Utilizamos como controle negativo células CHODG-44 não transfectadas com os plasmídeos (CHODG-44 parental). Para a proteína gDE7E6 HPV-16, foi possível observar 49,3% de células produtoras marcadas com anti-gD FITC dentro da população mista e 43,6% de células produtoras marcadas com anti-gD FITC dentro da população do clone isolado. Para a proteína gDE7E6 HPV-18, foi possível observar 48,4% de células

produtoras marcadas com anti-gD FITC dentro da população mista e 39,5% células produtoras marcadas com anti-gD FITC dentro da população do clone isolado (**Figura 17**). Tais dados demonstram que ambas populações mistas e clones produzem as proteínas de interesse, porém as frequências de células produtoras dos clones não são superiores às frequências das populações mistas. É importante destacar que o processo de geração de um clone estável é laborioso, dispendioso e necessita de vários *rounds* de subclonagem para garantir a clonalidade da célula. Além disso, a presença de um clone altamente produtor é considerado um evento raro.



**Figura 17.** Avaliação de células CHODG-44 produtoras de gDE7E6 HPV-16 e HPV-18 marcadas com anti-gD FITC dentro da população mista e clone.

## 5. DISCUSSÃO

No presente estudo, buscamos expressar as proteínas de fusão gDE7E6 HPV-16 e HPV-18 e a oncoproteína E7, como controle positivo em experimentos, na levedura *P. pastoris* e as proteínas de fusão gDE7E6 HPV-16 e HPV-18 em células de mamífero da linhagem HEK293T e CHODG-44 para aplicação no desenvolvimento de vacinas terapêuticas. Com relação a expressão das proteínas gDE7E6 HPV-16 e HPV-18 e E7 HPV-16 em *P. pastoris*, nos diferentes tempos testados, não foi possível observar a expressão das proteínas no sobrenadante nem no extrato celular, independentemente do tipo de linearização com diferentes enzimas de restrição. Com relação à expressão das proteínas gDE7E6 HPV-16 e HPV-18 em células HEK293T, realizamos a transfecção transitória, e foi possível expressar ambas proteínas no sobrenadante das culturas. A purificação das proteínas foi realizada através de cromatografia de afinidade ao níquel e as bandas com massas moleculares no tamanho esperado para ambas proteínas, foram detectadas através de *western blot*. Porém, a presença do SFB dificultou a realização da purificação de forma adequada. Para tentar contornar o problema, testamos a adaptação de células HEK293T em meio livre de SFB. Infelizmente, o cultivo das células em 95% e 100% SFM levou a formação de aglomerados celulares que retardavam o crescimento e dificultavam a transfecção celular. Sendo assim, buscamos expressar as proteínas gDE7E6 HPV-16 e HPV-18 em células CHODG-44, adaptadas para cultivo em suspensão e meio quimicamente definido livre de SFB. Realizamos amplificação genômica com MTX das células CHODG-44 gDE7E6 HPV-16 e HPV-18 com o intuito de aumentar a expressão da proteína de interesse. A purificação da proteína gDE7E6 HPV-16 foi realizada, sendo possível detectar banda com massa molecular no tamanho esperado através de *western blot*, porém, pelo baixo rendimento, não foi possível mensurar a concentração da proteína. Além disso, realizamos a tentativa de clonagem das células CHODG-44 gDE7E6 HPV-16 e CHODG-44 gDE7E6 HPV-18 através de diluição limitante e clonagem em sistema automatizado.

Acreditamos que pelo fato da gD ser uma proteína associada à membrana, haja dificuldade na expressão desta proteína em *P. pastoris*. Já foi descrito na literatura o emprego deste sistema para expressão da gD do HSV-1 e HSV-2 (KOOIJI et al., 2002; WANG et al., 2017). Em ambos trabalhos, a sequência de aminoácidos e a conformação da proteína são diferentes da utilizada no presente estudo. Além disso, foram encontradas dificuldades na produção da gD do HSV-1 e do HSV-2, como baixo rendimento,

necessidade de concentração do sobrenadante e falta de clareza na visualização das bandas em SDS-PAGE. Em outros trabalhos que expressaram a proteína do Envelope de Dengue 2, a proteína do Envelope de Dengue 4 e glicoproteína gp350, além das dificuldades acima citadas, foi necessário obter as proteínas do extrato celular (MUNÉ et al., 2003; VALDÉS et al., 2007; MANI et al., 2013; WANG et al., 2016). Em paralelo, tentamos expressar a E7 sem estar fusionada geneticamente à gD em *P. pastoris*, no entanto, também não foi possível observar a expressão desta proteína no sobrenadante. Não foi encontrado na literatura estudos que relatam a expressão desta proteína neste sistema.

Diversos trabalhos têm descrito altos níveis de produção de proteínas em *P. pastoris*, porém, existem importantes dificuldades que limitam a expressão e secreção de proteínas neste sistema. Podemos citar (i) a necessidade de adaptação de códons da sequência (ii) número de cópias do gene de interesse (iii) transcrição do mRNA (iv) degradação do metanol que leva ao stress celular (v) processamento, dobramento e acúmulo da proteína no retículo endoplasmático (RE) (vi) degradação associada no RE (vii) translocação da proteína para o meio extracelular dependente do peptídeo sinal e (viii) proteólise (INAN et al., 2005; AZOUN et al., 2016b). A indução da expressão de proteínas recombinantes em *P. pastoris* pode desencadear dois tipos de *stress* celular. O primeiro é causado pela degradação do metanol necessário para ativação do promotor AOX1. A metabolização do metanol gera formaldeído e peróxido de hidrogênio, compostos tóxicos que podem levar a danos celulares (VANZ et al., 2012; HESKETH et al., 2013). A segunda causa de *stress* está relacionada com a produção da proteína recombinante. A sobrecarga da maquinaria celular para produção da proteína recombinante pode levar ao acúmulo de proteínas agregadas ou mal enoveladas no RE. Para reduzir o nível de stress, a célula pode iniciar uma resposta contra proteínas mal enoveladas, através da diminuição do nível da tradução e levando ao aumento da degradação associada ao RE (DAMASCENO et al., 2012; AZOUN et al., 2016b).

Neste contexto, o enovelamento de proteínas no RE é um passo crucial em células eucarióticas, sendo considerada um sistema de controle de qualidade que garante que a proteína secretada será corretamente dobrada, incluindo a formação de pontes dissulfeto (HELENIUS et al., 1992; INAN et al., 2005). A proteína recombinante recém-sintetizada entra no lúmen do RE e encontra uma mudança no estado redox que promove a formação de pontes dissulfeto, realizada pela chaperona dissulfeto isomerase (PDI). Tal chaperona

---

auxilia no dobramento da proteína, prevenindo agregação e assegurando que as pontes dissulfeto sejam formadas corretamente. Problemas nessa etapa do processamento podem levar à degradação da proteína por proteossomos citoplasmáticos (INAN et al., 2005). Em células normais a concentração dessas chaperonas é suficiente para garantir o correto dobramento das proteínas na via secretória. Porém em sistemas de expressão, o fluxo de proteínas sendo translocada para o RE é bastante elevado, levando à saturação da maquinaria de dobramento e a consequente não secreção das proteínas (NGIAM et al., 2000).

Já foi descrito na literatura que a coexpressão de PDI é associada ao aumento nos níveis de expressão de proteínas heterólogas em *P. pastoris*. Azoun et al. (2016b) demonstrou que a coexpressão de PDI elevou os níveis de expressão da glicoproteína RABV-G em 9,5 vezes. Além disso, o estado redox do RE e os níveis de enzimas oxidativas como glutathiona peroxidase, também influenciam no dobramento de proteínas, podendo aumentar em 3,3 vezes o nível da expressão (AZOUN et al., 2016b). Medidas adicionais como estas não foram tomadas para facilitar a expressão das proteínas em nossas condições experimentais, o que podem explicar a dificuldade de obtenção dos antígenos neste sistema.

Um fator importante no processo de expressão de proteínas recombinantes é o direcionamento da proteína para o meio extracelular através do peptídeo sinal. Neste trabalho utilizamos como peptídeo sinal a região “pré-pro” do fator  $\alpha$  de *S. cerevisiae*, que é classificado como um sinal pós-tradução, onde a pré-proteína é totalmente sintetizada antes de ser transportada para o RE. Tal fato pode se tornar um problema para algumas proteínas, visto que os polipeptídeos recém-sintetizados precisam permanecer não-dobrados ou dobrados parcialmente antes do transporte através do RE, porém é possível que alguns polipeptídeos se agreguem ou se dobrem em seu estado nativo, o que impede o reconhecimento pelo peptídeo sinal e transporte da proteína (DAMASCENO et al., 2012). Sendo assim, acreditamos que diversos eventos como estes podem ter influenciado a não expressão das proteínas propostas em *P. pastoris*.

Diante disso, transferimos a expressão das proteínas gDE7E6 HPV-16 e gDE7E6 HPV-18 para células de mamífero. As células de mamífero já foram utilizadas para expressão da gD-HSV-2 (COHEN et al., 1988; STRAUS et al., 1993; DEL CAMPO et al., 2010; QI et al., 2015;) e gD-HSV-1 (COHEN et al., 1988; ARII et al., 2016). Além disso, este sistema já foi utilizado para expressão de glicoproteínas dos vírus HTLV1,

---

HIV-1 e Hepatite C (PENTEADO et al., 2006; BOTTI et al., 2011; CHUNG et al., 2014). Particularmente, as células HEK293T são o sistema de escolha para produção de proteínas recombinantes em quantidades significativas, por apresentar alta eficiência de transfecção, podendo obter proteína recombinante de forma rápida através de transfecção transitória. Além disso, se tornou economicamente viável através da descoberta do PEI, utilizado para transfecção (ARICESCU & OWENS, 2013). Porém por se tratar de transfecção transitória, os níveis de produção podem variar de cultivo para cultivo.

As células HEK293T são cultivadas na presença de SFB, que contém uma grande variedade de nutrientes, hormônios, fatores de crescimento, proteínas carreadoras e metabolitos que suprem o crescimento celular (RITACCO et al., 2018). No entanto, existem algumas desvantagens na suplementação da cultura celular com soro, que incluem composição variada, risco de contaminação por vírus e bactéria, aspectos regulatórios relacionados ao uso de compostos de origem animal, e principalmente a dificuldade na purificação da proteína recombinante, visto que a grande concentração de proteínas no SFB pode atrapalhar a interação e afinidade da proteína de interesse pela coluna (CONTE et al., 2017).

Neste contexto, uma alternativa que adotamos neste trabalho, foi a adaptação da célula HEK293T a meio livre de soro, simplificando os processos *downstream*. Existem diversos protocolos para adaptação das células, todos empregam um processo gradual de diminuição da concentração de soro, até total retirada. As células em adaptação precisam apresentar crescimento logarítmico e viabilidade acima de 90% até que a condição 100% livre de soro seja atingida (VAN DER VALK et al., 2010). A transição para meio livre de soro pode levar a mudanças no crescimento celular. Neste trabalho, as células HEK293T cultivadas a 95% SFM: 5% SFB e 100% SFM demonstraram presença de aglomerados celulares, esta alteração morfológica já foi descrita anteriormente, quando células HEK293 foram cultivadas a 90% SFM (JALURIA et al., 2008). A presença de aglomerados celulares é considerada um evento comum no processo de adaptação, visto que a formação de grumos é um mecanismo de proteção celular (HALDANKAR et al., 1999). Sendo assim, decidimos não utilizar células HEK nestas condições, visto que tais alterações morfológicas afetam a eficiência da transfecção e conseqüentemente na produção das proteínas recombinantes.

Neste trabalho, células CHODG-44 em suspensão foram utilizadas para transfecção estável de um vetor bicistrônico, gerando uma população mista de células quanto a expressão das proteínas de interesse. A utilização de vetores bicistrônicos garante um controle preciso da expressão da proteína de interesse, além de assegurar a expressão associada ao marcador de seleção (GURTU et al., 1996; KOH et al., 2013; RAHIMPOUR et al., 2016). Após a geração das populações mistas, as células foram submetidas à amplificação genômica com MTX na tentativa de aumentar os níveis de expressão das proteínas de interesse. O MTX é um inibidor da DHFR, e para superar esta inibição, as células aumentam o número de cópias da DHFR no genoma (VORONINA et al., 2016). Os genes da gDE7E6 HPV-16 ou gDE7E6 HPV-18 estão integrados no mesmo locus genético da DHFR através do elemento IRES, e como resultado as células aumentam o número de cópias do marcador e consequentemente do gene de interesse, levando ao aumento da expressão. A amplificação é realizada através do aumento gradual das concentrações de MTX para aumentar a pressão seletiva até que apenas células com altas cópias do gene de interesse sobrevivam (PRIOLA et al., 2016). Neste trabalho utilizamos o MTX nas concentrações de 30 nM, 60 nM, 100 nM e 180 nM.

Já foi descrito na literatura ampliações com concentrações de MTX variando de 5 nM até 5  $\mu$ M (JUN et al., 2005; SHARBAF et al., 2013; METTA et al., 2016; VORONINA et al., 2016; CHROMIKOVA et al., 2017), no entanto para atingir altas concentrações e garantir alta expressão são necessários vários *rounds* de amplificação, processo que pode durar vários meses. Neste trabalho, notamos que a amplificação genômica só ocorreu até a concentração de 100 nM de MTX, visto que em concentrações mais elevadas foi observada uma diminuição considerável da expressão da proteína de interesse. Fenômeno semelhante também foi observado por outros estudos empregando concentrações maiores de MTX, onde foi demonstrado que o aumento da pressão seletiva exercida pelo MTX não está associado com aumento da expressão da proteína de interesse (KAUFMAN et al., 1985; PENDSE et al., 1992; FANN et al., 2000; KIM et al., 2001; JUN et al., 2005; CHUSAINOW et al., 2009; JAZAYERI et al., 2017). Neste contexto, em concentrações elevadas de MTX as células podem sofrer mutações perdendo o gene de interesse ou adquirirem resistência ao MTX por mecanismos não relacionados ao DHFR (CACCIATORE et al., 2010). Desde o estabelecimento das células de mamífero como um sistema de expressão, inúmeras melhorias foram feitas para otimizar as condições de cultivo e aumentar a densidade celular por longos períodos, porém ainda



---

permanece como desafio aumentar os níveis de expressão e produtividade (15-60 picogramas/célula/dia) para atender a demanda industrial (BROWNE & AL-RUBEAI, 2007).

Após a geração da população mista, é necessário selecionar um clone que produza a proteína de interesse em níveis adequados. Na teoria, todas as células dentro desta população são geneticamente e fenotipicamente similares, porém existe ainda grande variabilidade nos níveis de crescimento e expressão, visto que não é possível garantir que todas as células integraram no seu genoma a mesma proporção do gene de interesse (BROWNE & AL-RUBEAI, 2007). Diferentes técnicas podem ser utilizadas com a finalidade de isolar um clone, dependendo do tipo de célula. Como primeira tentativa, utilizamos o método tradicional de diluição limitante, no entanto, com esta técnica não foi possível isolar um clone. O processo de seleção através de diluição limitante é dispendioso e pode levar até 8 meses de seleção, para garantir a clonalidade da célula. Além disso, por se tratar de um método manual, existe a limitação de clones a serem caracterizados a nível de produção da proteína, aumentando as chances de não encontrar células altamente produtoras, devido ao baixo número de clones avaliados (BROWNE & AL-RUBEAI, 2007; PRIOLA et al., 2016).

A célula utilizada neste trabalho, CHODG-44 em suspensão, secreta a proteína de interesse para o sobrenadante de cultura, sendo necessário uma forma de imobilizar as células para formação do clone. No ClonePix, um sistema automatizado, as células são imobilizadas em um meio semisólido e incubadas para formação das colônias, a proteína secretada pela célula é retida pela viscosidade do meio e através de um anticorpo específico à proteína de interesse, é possível detectar a formação de um halo fluorescente resultado da ligação anticorpo/proteína. As colônias que atendem aos parâmetros estabelecidos pelo equipamento, são então escolhidas por um sistema de *picking* robotizado e iniciado a expansão (BROWNE & AL-RUBEAI, 2007; PRIOLA et al., 2016). Visto que alguns clones formados não atendiam aos parâmetros do equipamento quanto a fluorescência, selecionamos os clones formados no meio semisólido de forma manual e fizemos o *screening* por *western blot*, sendo possível isolar um clone, reduzindo o tempo gasto. Após ensaio de citometria de fluxo, observamos que os níveis de produção do clone eram inferiores a população mista, possivelmente por não ter sido isolado um clone altamente produtor.

É importante destacar que mesmo após repetidos *rounds* de amplificação genômica e emprego de técnicas para seleção de clones, a população final selecionada não é inteiramente homogênea quanto a níveis de crescimento, produção da proteína de interesse e máxima densidade celular. A porcentagem de células que expressa a proteína de interesse em níveis acima da média é considerada rara (0.0003%), possivelmente pela associação de alguns fatores como nível de integração no genoma do hospedeiro, número de cópias do gene de interesse e stress associado ao processo de transfecção. Além disso, para isolar tal população seria necessário avaliar dezenas de milhares de clones, processo que implica em enorme gasto de tempo e recursos (BROWNE & AL-RUBEAI, 2007; CACCIATORE et al., 2010; POULAIN et al., 2019).

## 6. CONCLUSÕES

- Demonstramos o emprego de 3 diferentes sistemas eucarióticos de expressão para as proteínas gDE7E6 HPV-16, gDE7E6 HPV-18 e E7 HPV-16, empregando inúmeras metodologias a fim de atingir o objetivo principal, gerar um antígeno de melhor qualidade;
- O sistema de *P. pastoris* não foi adequado para expressão das proteínas de interesse;
- Nossos resultados indicam que os sistemas de expressão baseados em células de mamífero são adequados para expressão de proteínas virais e podem ser manipulados para aumento da expressão;
- Não foi possível realizar a adaptação de células HEK293T a meio livre de soro;
- Foi possível realizar a geração de populações mistas e clones produtores das proteínas de interesse em células CHODG-44. Porém ainda se faz necessário melhorias a fim de aumentar os níveis de produção e seleção de clones altamente produtores;
- Apesar disso, o objetivo principal do trabalho foi alcançado, expressar os antígenos em sistema eucarioto.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. NOUR, M. N. Women's Health in the developing World. Cervical Cancer : A Preventable Death. **Reviews in Obstetrics & Gynecology**, v. 2, n. 4, p. 240–244, 2009.
2. BURD, M. E.; DEAN, L. C. Human Papillomavirus. **Microbiology Spectrum**, p. 1–17, 2016.
3. World Health Organization. Cancer cervical. WHO; 2019 [acesso em 16 abr 2019]. Disponível em: <https://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/cervical-cancer/en/>
4. MA, B.; MARAJ, B.; TRAN, N. P.; KNOFF, J.; CHEN, A.; ALVAREZ, R. D.; HUNG, C.-F.; WU, T.C. Emerging human papillomavirus vaccines. **Expert opinion on emerging drugs**, v.17, n.4, p.469–492, 2012.
5. PITISUTTITHUM, P.; VELICER, C.; LUXEMBOURG, A. 9-Valent HPV vaccine for cancers, pre-cancers and genital warts related to HPV. **Expert Review of Vaccines**, v. 14, n. 11, p. 1405–1419, 2015.
6. CROSBIE, J. E.; EINSTEIN, H. M.; FRANCESCHI, S.; KITCHENER, C. H. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. **Cancer and Inflammation Mechanisms: Chemical, Biological, and Clinical Aspects**, v. 382, n. 9895, p. 165–180, 2013.
7. EGGERSMANN, T.; SHARAF, K.; BAUMEISTER, P.; THALER, C.; DANNECKER, C.; JESCHKE, U.; MAHNER, S.; WEYERSTAHL, K.; WEYERSTAHL, T.; BERGAUER, F.; GALLWAS, J. Prevalence of oral HPV infection in cervical HPV positive women and their sexual partners. **Gynecologic Oncology**, v. 78, p. 1–7, 2019.
8. ZENG, Y.; MOSCICKI, A.-B.; SAHASRABUDDHE, V. V.; GARCIA, F.; WOO, H.; HSU, C.-H.; SZABO, E.; DIMOND, E.; VANZZINI, S.; MONDRAGON, A.; BUTLER, V.; DEROSE, H.; CHOW, H.-H. S. A prospective, single-arm, open-label, non-randomized, phase IIa trial of a nonavalent prophylactic HPV vaccine to assess immunogenicity of a prime and deferred-booster dosing schedule among 9–11 year-old girls and boys – clinical protocol. **BMC Cancer**, v. 19, n. 1, p. 290, 2019.

9. BURD, E. Human papillomavirus and cervical cancer. **Clin Microbiol Rev**, v. 16, n. 1, p. 1–17, 2003.
10. YUGAWA, T.; KIYONO, T. Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins Takashi. **Reviews in medical virology**, v. 19, n. 1, p. 97–113, 2009.
11. FANG, J.; ZHANG, H.; JIN, S. Epigenetics and cervical cancer: From pathogenesis to therapy. **Tumor Biology**, v. 35, n. 6, p. 5083–5093, 2014.
12. MOSCICKI, A.; ELLENBERG, J. H.; FARHAT, S.; XU, J. Persistence of Human Papillomavirus Infection in HIV-Infected and -Uninfected Adolescent Girls: Risk Factors and Differences, by Phylogenetic Type. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 190, n. 1, p. 37–45, 2004.
13. HARPER, D. M.; VIERTHALER, S. L. Next Generation Cancer Protection: The Bivalent HPV Vaccine for Females. **ISRN Obstetrics and Gynecology**, p. 1–20, 2011.
14. VILLA, L. L.; COSTA R.L.; PETTA, C.A.; ANDRADE, R.P.; AULT, K.A.; GIULIANO, A.R.; WHEELER, C.M.; KOUTSY L.A.; MALM, C.; LEHTINEN, M.; SKJELDESTAD, F.E.; OLSSON, S.E.; STEINWALL, M.; BROWN, D.R.; KURMAN, R.J.; RONNETT, B.M.; STOLER, M.H.; FERENCY, A.; HARPER D.M.; TAMMS, G.M.; YU, J.; LUPINACCI, L.; RAILKAR R.; TADDEO, F.J.; JANSEN, K.U.; ESSER, M.T.; SINGS, H.L.; SAAH A.J.; BARR, E. Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. **The Lancet Oncology**, v. 6, n. 5, p.271-278, 2005.
15. MOREIRA, E. D.; GIULIANO, A. R.; DE HOON, J.; IVERSEN, O. E.; JOURA, E. A.; RESTREPO, J.; VAN DAMME, P.; VANDERMEULEN, C.; ELLISON, M. C.; KRICK, A.; SHIELDS, C.; HEILES, B.; LUXEMBOURG, A. Safety profile of the 9-valent human papillomavirus vaccine: assessment in prior quadrivalent HPV vaccine recipients and in men 16 to 26 years of age. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 14, n. 2, p. 396–403, 2018.
16. MAHDAVI, A.; MONK, J. B. Vaccines Against Human Papillomavirus and Cervical Cancer: Promises and Challenges. **The Oncologist**, v. 10, n. 7, p. 528–538, 2005.

17. BRINKMAN, A. J.; HUGHES, H. S.; STONE, P.; CAFFREY, S. A.; MUDERSPACH, I. L.; ROMAN, D. L.; WEBER, S. J.; KAST, W. M. Therapeutic vaccination for HPV induced cervical cancers. **Disease Markers**, v. 23, n. 4, p. 337–352, 2007.
18. DE JONG, A.; O'NEIL, T.; KHAN, A.Y.; KWAPPENBERG, K.M.; CHISHOLM, S.E.; WHITTLE, N.R.; DOBSON, J.A.; JACK, L.C.; ROBERTS, J.A.; OFFRINGA R.; VAN DER BURG, S.H.; HICKLING J.K. Enhancement of human papillomavirus (HPV) type 16 E6 and E7-specific T-cell immunity in healthy volunteers through vaccination with TA-CIN, an HPV16 L2E7E6 fusion protein vaccine. **Vaccine**, v. 20, n. 29, p. 3456-3464, 2002.
19. GOLDSTONE, S. E.; PALEFSKY, J.M.M.D.; WINNETT, M. T.B.S.; NEEFE, J.R.M.D. Activity of HspE7, a novel immunotherapy, in patients with anogenital warts. **Diseases of the Colon & Rectum**, v. 45, n. 4, p. 502-507, 2002.
20. SHEETS, E. E.; URBAN, R.G.; CRUM, C.P.; HEDLEY, M.L.; POLITCH, J.A.; GOLD, M.A.; MUDERSPACH, L.I.; COLE, G.A.; CROWLEY-NOWICK, P.A. Immunotherapy of human cervical high-grade cervical intraepithelial neoplasia with microparticle-delivered human papillomavirus 16 E7 plasmid DNA. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 188, n. 4, p. 916-926, 2003.
21. WELTERS, M. J. P.; VAN DER LOGT, P.; VAN DEN EEDEN, S. J. F.; KWAPPENBERG, K. M. C.; DRIJFHOUT, J. W.; FLEUREN, G. J.; KENTER, G. G.; MELIEF, C. J. M.; VAN DER BURG, S. H.; OFFRINGA, R. Detection of human papillomavirus type 18 E6 and E7-specific CD4+ T-helper 1 immunity in relation to health versus disease. **International Journal of Cancer**, v. 118, n. 4, p. 950–956, 2005.
22. KENTER, G. G.; WAFELMAN, A. R.; FLEUREN, G. J.; BERENDS-VAN DER MEER, D. M. A.; LOWIK, M. J. G.; MELIEF, C. J. M.; OOSTENDORP, J.; VALENTIJN, A. R. P. M.; DRIJFHOUT, J. W.; OFFRINGA, R.; VAN DER BURG, S. H.; VLOON, A. P. G.; WELTERS, M. J. P. Phase I Immunotherapeutic Trial with Long Peptides Spanning the E6 and E7 Sequences of High-Risk Human Papillomavirus 16 in End-Stage Cervical Cancer Patients Shows Low Toxicity and Robust Immunogenicity. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 1, p. 169–177, 2008.

23. BAGARAZZI, L. M.; YAN, J.; MORROW, P. M.; SHEN, X.; PARKER, R. L.; LEE, C. J.; GIFFEAR, M.; PANKHONG, P.; KHAN, S. A.; BRODERICK, E. K.; KNOTT, C.; LIN, F.; BOYER, D. J.; AKLI-DRAGHIA, R.; WHITE, C. J.; KIM, J. J.; WEINER, B. D.; SARDESAI, N. Immunotherapy Against HPV16/18 Generates Potent TH 1 and Cytotoxic Cellular Immune Responses. **Sci Transl Med**, v. 17, n. 12, p. 1720–1727, 2012.
24. KIM, T. J.; JIN, H. T.; HUR, S. Y.; YANG, H. G.; SEO, Y. B.; HONG, S. R.; LEE, C. W.; KIM, S.; WOO, J. W.; PARK, K. S.; HWANG, Y. Y.; PARK, J.; LEE, I. H.; LIM, K. T.; LEE, K. H.; JEONG, M. S.; SURH, C. D.; SUH, Y. S.; PARK, J. S.; SUNG, Y. C. Clearance of persistent HPV infection and cervical lesion by therapeutic DNA vaccine in CIN3 patients. **Nature Communications**, v. 5, n. May, p. 1–14, 2014.
25. FARIDI, R.; ZAHRA, A.; KHAN, K.; IDREES, M. Oncogenic potential of human papillomavirus (HPV) and its relation with cervical cancer. **Virology Journal**, v. 8, n. 1, p. 269, 2011.
26. SANDAL, T. Molecular Aspects of the Mammalian Cell Cycle and Cancer. **The Oncologist**, v. 7, n. 1, p. 73–81, 2002.
27. DINIZ, M. O.; LASARO, M. O.; ERTL, H. C.; FERREIRA, L. C. S. Immune responses and therapeutic antitumor effects of an experimental DNA vaccine encoding human papillomavirus type 16 oncoproteins genetically fused to herpesvirus glycoprotein D. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 17, n. 10, p. 1576–1583, 2010.
28. PORCHIA, B.; DINIZ, M.; CARIRI, F. A. M. O.; SANTANA, V. C.; AMORIM, J. H.; BALAN, A.; BRAGA, C. J. M.; FERREIRA, L. C. S. Simplex Type 1 Glycoprotein D (gD) Genetically Fused with the Type 16 Human Papillomavirus E7 Oncoprotein Enhances Antigen-Specific CD8<sup>+</sup> T Cell Responses. **Molecular Pharmaceutics**, p. 2320–2330, 2011.
29. CHEUNG, T. C.; STEINBERG, M. W.; OBORNE, L. M.; MACAULEY, M. G.; FUKUYAMA, S.; SANJO, H.; D'SOUZA, C.; NORRIS, P. S.; PFEFFER, K.; MURPHY, K. M.; KRONENBERG, M.; SPEAR, P. G.; WARE, C. F. Unconventional ligand activation of herpesvirus entry mediator signals cell survival. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 15, p. 6244–6249, 2009.

30. SCIORTINO, M. T.; MEDICI, M. A.; MARINO-MERLO, F.; ZACCARIA, D.; GIUFFRÈ-CUCULLETTA, M.; VENUTI, A.; GRELLI, S.; BRAMANTI, P.; MASTINO, A. Involvement of gD/HVEM interaction in NF- $\kappa$ B-dependent inhibition of apoptosis by HSV-1 gD. **Biochemical Pharmacology**, v. 76, n. 11, p. 1522–1532, 2008.
31. DIMENNA, L.; LATIMER, B.; PARZYCH, E.; HAUT, L. H.; TOPFER, K.; ABDULLA, S.; YU, H.; MANSON, B.; GILES-DAVIS, W.; ZHOU, D.; LASARO, M. O.; ERTL, H. C. J. Augmentation of Primary Influenza A Virus-Specific CD8<sup>+</sup> T Cell Responses in Aged Mice through Blockade of an Immunoinhibitory Pathway. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 10, p. 5475–5484, 2010.
32. EDWARDS, R. G.; LONGNECKER, R. Herpesvirus Entry Mediator and Ocular Herpesvirus Infection: More than Meets the Eye. **Journal of Virology**, v. 91, n. 13, p. 18–20, 2017.
33. LASARO, M. O.; DINIZ, M. O.; REYES-SANDOVAL, A.; ERTL, H. C.; FERREIRA, L. C. S. Anti-tumor DNA vaccines based on the expression of human papillomavirus-16 E6/E7 oncoproteins genetically fused with the glycoprotein D from herpes simplex virus-1. **Microbes and Infection**, v. 7, n. 15, p. 1541–1550, 2005.
34. LASARO, M. O.; TATSIS, N.; HENSLEY, E. S.; WHITBECK, C. J.; LIN, S. W.; RUX, J. J.; WHERRY, E. J.; COHEN, H. G.; EISENBERG, R. J.; ERTL, H. C. Targeting of antigen to the herpesvirus entry mediator augments primary adaptive immune responses. **Nat Med**, v. 14, n. 2, p. 205–212, 2008.
35. PORCHIA, B. F. M. M.; MORENO, A. C. R.; RAMOS, R. N.; DINIZ, M. O.; DE ANDRADE, L. H. T. M.; ROSA, D. S.; BARBUTO, J. A. M.; BOSCARDIN, S. B.; FERREIRA, L. C. S. Herpes Simplex Virus Glycoprotein D Targets a Specific Dendritic Cell Subset and Improves the Performance of Vaccines to Human Papillomavirus-Associated Tumors. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 16, n. 9, p. 1922–1933, 2017.
36. DEMAÏN, A. L.; VAISHNAV, P. Production of Recombinant Proteins by Microbes and Higher Organisms. **Biotechnology Advances** j, p. 297–306, 2009.
37. MACCANI, A.; LANDES, N.; STADLMAYR, G.; MARESCH, D.; LEITNER, C.; MAURER, M.; GASSER, B.; ERNST, W.; KUNERT, R.; MATTANOVICH,



- D. *Pichia pastoris* secretes recombinant proteins less efficiently than Chinese hamster ovary cells but allows higher space-time yields for less complex proteins. **Biotechnology Journal**, v. 9, n. 4, p. 526–537, 2014.
38. BAGHBAN, R.; FARAJNIA, S.; GHASEMI, Y.; MORTAZAVI, M.; ZARGHAMI, N.; SAMADI, N. New Developments in *Pichia pastoris* Expression System, Review and Update. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 19, n. 6, p. 451–467, 2018.
39. SUDBERY, P.E. The expression of recombinant proteins in yeasts. **Current Opinion In Biotechnology**, v. 7, n. 5, p.517-524, 1996.
40. SØRENSEN, H. P. Commentary Towards universal systems for recombinant gene expression. **Microbial Cell Factories**, v. 27, n. 9, p.1-4, 2010.
41. SCHWARZHANS, J. P.; LUTTERMANN, T.; GEIER, M.; KALINOWSKI, J.; FRIEHS, K. Towards systems metabolic engineering in *Pichia pastoris*. **Biotechnology Advances**, v. 35, n. 6, p. 681–710, 2017.
42. AHMAD, M.; HIRZ, M.; PICHLER, H.; SCHWAB, H. Protein expression in *Pichia pastoris*: Recent achievements and perspectives for heterologous protein production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 12, p. 5301–5317, 2014.
43. CEREGHINO, J.; CREGG, M. J. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 45–66, 2000.
44. VOGL, T.; GLIEDER, A. Regulation of *Pichia pastoris* promoters and its consequences for protein production. **New Biotechnology**, v. 30, n. 4, p. 385–404, 2013.
45. WANG, M.; JIANG, S.; WANG, Y. Recent advances in the production of recombinant subunit vaccines in *Pichia pastoris*. **Bioengineered**, v. 7, n. 3, p. 155–165, 2016.
46. DALY, R.; HEARN, M. T. W. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. **JOURNAL OF MOLECULAR RECOGNITION**, v. 18, p. 119–138, 2005.
47. RUITENBERG, K. M.; GILKERSON, J. R.; WELLINGTON, J. E.; LOVE, D. N.; WHALLEY, J. M. Equine herpesvirus 1 glycoprotein D expressed in *Pichia*

- pastoris is hyperglycosylated and elicits a protective immune response in the mouse model of EHV-1 disease. **Virus Research**, v. 79, n. 1–2, p. 125–135, 2001.
48. KOOIJ, A. Van; MIDDEL, J.; JAKAB, F.; ELFFERICH, P.; KOEDIJK, D. G. A. M.; FEIJLBRIEF, M.; SCHEFFER, J.; DEGENER, J. E.; THE, T. H.; SCHEEK, R. M.; WELLING, G. W.; WELLING-WESTER, S. High level expression and secretion of truncated forms of herpes simplex virus type 1 and type 2 glycoprotein D by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 25, p. 400–408, 2002.
49. MUNÉ, M.; RODRÍGUEZ, R.; RAMÍREZ, R.; SOTO, Y.; SIERRA, B.; RODRÍGUEZ ROCHE, R.; MARQUEZ, G.; GARCIA, J.; GUILLÉN, G.; GUZMÁN, M. G. Carboxy-terminally truncated Dengue 4 virus envelope glycoprotein expressed in *Pichia pastoris* induced neutralizing antibodies and resistance to Dengue 4 virus challenge in mice. **Archives of Virology**, v. 148, n. 11, p. 2267–2273, 2003.
50. VALDÉS, I.; HERMIDA, L.; ZULUETA, A.; MARTÍN, J.; SILVA, R.; ÁLVAREZ, M.; GUZMÁN, M. G.; GUILLÉN, G. Expression in *Pichia pastoris* and immunological evaluation of a truncated Dengue envelope protein. **Molecular Biotechnology**, v. 35, n. 1, p. 23–30, 2007.
51. DUMMER, L. A.; CONCEIÇÃO, F. R.; NIZOLI, L. Q.; DE MORAES, C. M.; ROCHA, A. R.; DE SOUZA, L. L.; ROOS, T.; VIDOR, T.; LEITE, F. P. L. Cloning and expression of a truncated form of envelope glycoprotein D of Bovine herpesvirus type 5 in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Journal of Virological Methods**, v. 161, n. 1, p. 84–90, 2009.
52. AZOUN, B. S.; BELHAJ, A. E.; GASSER, B. Molecular optimization of rabies virus glycoprotein expression in *Pichia pastoris*. **Microbial Biotechnology**, v. 9, p. 355–368, 2016a.
53. WANG, M.; JIANG, S.; ZHOU, L.; WANG, C.; MAO, R.; WANG, M. Efficient production of recombinant glycoprotein D of herpes simplex virus type 2 in *Pichia pastoris* and its protective efficacy against viral challenge in mice. **Archives of Virology**, v. 162, p. 701–711, 2017.
54. BANDO-CAMPOS, G.; JUÁREZ-LÓPEZ, D.; ROMÁN-GONZÁLEZ, S. A.; CASTILLO-RODAL, A. I.; OLVERA, C.; LÓPEZ-VIDAL, Y.; ARREGUÍN-ESPINOSA, R.; ESPITIA, C.; TRUJILLO-ROLDÁN, M. A.; VALDEZ-CRUZ,

- N. A. Recombinant O-mannosylated protein production (PstS-1) from *Mycobacterium tuberculosis* in *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) as a tool to study tuberculosis infection. **Microbial Cell Factories**, v. 18, n. 1, p. 1–19, 2019.
55. BAZAN, B. S.; CHAVES, M. A. A.; AIRES, A. K.; CIANCIARULLO, M. A.; GARCEA, L. R.; HO, L. P. Expression and characterization of HPV-16 L1 capsid protein in *Pichia pastoris*. **Arch Virol**, v. 154, n. 10, p. 1–16, 2009.
56. COIMBRA, E. C.; GOMES, F. B.; CAMPOS, J. F.; D'ARC, M.; CARVALHO, J. C.; MARIZ, F. C.; JESUS, A. L. S.; STOCCO, R. C.; BEÇAK, W.; FREITAS, A. C. Production of L1 protein from different types of HPV in *Pichia pastoris* using an integrative vector. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 12, p. 1209–1214, 2011.
57. RAO, H. N.; BABU, B. P.; RAJENDA, L.; SRIRAMAN, R.; PANG, S. Y.; SCHILLER, T. J.; SRINIVASAN, V. A. Expression of codon optimized major capsid protein (L1) of human papillomavirus type 16 and 18 in *Pichia pastoris*; purification and characterization of the virus-like particles. **Vaccine**, v. 29, n. 43, p. 7326–7334, 2011.
58. BOLHASSANI, A.; MULLER, M.; ROOHVAND, F.; MOTEVALLI, F.; AGI, E.; SHOKRI, M.; RAD, M. ; HOSSEINZADEH, S. Whole recombinant *Pichia pastoris* expressing HPV16 L1 antigen is superior in inducing protection against tumor growth as compared to killed transgenic *Leishmania*. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 10, n. 12, p. 3499–3508, 2014.
59. MARIZ, F. C.; COIMBRA, E. C.; JESUS, A. L. S.; NASCIMENTO, L. M.; TORRES, F. A. G.; FREITAS, A. C. Development of an IP-Free Biotechnology Platform for Constitutive Production of HPV16 L1 Capsid Protein Using the *Pichia pastoris* PGK1 Promoter. **BioMed Research International**, p. 1–11, 2015.
60. GUPTA, G.; GLUECK, R.; RISHI, N. Physicochemical characterization and immunological properties of *Pichia pastoris* based HPV16L1 and 18L1 virus like particles. **Biologicals**, v. 46, p. 11–22, 2016.
61. BREDELL, H.; SMITH, J. J.; GÖRGENS, J. F.; VAN ZYL, W. H. Expression of unique chimeric human papilloma virus type 16 (HPV-16) L1-L2 proteins in *Pichia pastoris* and *Hansenula polymorpha*. **Yeast**, v. 35, n. 9, p. 519–529, 2018.
62. BROWNE, S. M.; AL-RUBEAI, M. Selection methods for high-producing mammalian cell lines. **Trends in Biotechnology**, v. 25, n. 9, p. 425–432, 2007.

- 
63. ZHU, J. Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 5, p. 1158–1170, 2012.
  64. LALONDE, M. E.; DUROCHER, Y. Therapeutic glycoprotein production in mammalian cells. **Journal of Biotechnology**, v. 251, n. December 2016, p. 128–140, 2017.
  65. ARICESCU, A. R.; OWENS, R. J. Expression of recombinant glycoproteins in mammalian cells: Towards an integrative approach to structural biology. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 23, n. 3, p. 345–356, 2013.
  66. PHAM, P. L.; KAMEN, A.; DUROCHER, Y. Large-scale transfection of mammalian cells for the fast production of recombinant protein. **Molecular Biotechnology**, v. 34, n. 2, p. 225–237, 2006.
  67. BANDARANAYAKE, A.; ALMO, S. Recent advances in mammalian protein production. **Febs Lett.**, v. 588, n. 2, p. 253–260, 2014.
  68. DUMONT, J.; EUWART, D.; MEI, B.; ESTES, S.; KSHIRSAGAR, R. Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, n. 6, p. 1110–1122, 2015.
  69. CHAUDHURI, S.; MAURYA, P.; KAUR, M.; TIWARI, A.; BORTH, N.; BHATNAGAR, S.; KUMAR, N. Investigation of CHO Secretome: Potential Way to Improve Recombinant Protein Production from Bioprocess. **Journal of Bioprocessing & Biotechniques**, v. 05, n. 07, 2015.
  70. CACCIATORE, J. J.; CHASIN, L. A.; LEONARD, E. F. Gene amplification and vector engineering to achieve rapid and high-level therapeutic protein production using the Dhfr-based CHO cell selection system. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 6, p. 673–681, 2010.
  71. POULAIN, A.; MULLICK, A.; MASSIE, B.; DUROCHER, Y. Reducing recombinant protein expression during CHO pool selection enhances frequency of high-producing cells. **Journal of Biotechnology**, v. 296, n. March, p. 32–41, 2019.
  72. CHROMIKOVA, V.; ZARAGOZA, M. A.; KRAMMER, F. Generation of a serum free CHO DG44 cell line stably producing a broadly protective anti-influenza virus monoclonal antibody. **PLoS ONE**, v. 12, n. 9, p. 1–11, 2017.

- 
73. JAYAPAL, K. P.; WLASCHIN, K. F.; HU, W.-S.; YAP, M. G. S. Recombinant Protein Therapeutics from CHO cells – 20 years and Counting. **CHO Consortium Society for Biological Engineering Special Section**, p. 40–47, 2007.
74. GURTU, V.; YAN, G.; ZHANG, G. IRES Bicistronic Expression Vectors for Efficient Creation of Stable Mammalian Cell Lines. **Biochemical and biophysical research communicationso**, v. 298, p. 295–298, 1996.
75. LAI, T.; YANG, Y.; NG, S. K. Advances in mammalian cell line development technologies for recombinant protein production. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 5, p. 579–603, 2013.
76. HO, S. C. L.; BARDOR, M.; FENG, H.; MARIATI; TONG, Y. W.; SONG, Z.; YAP, M. G. S.; YANG, Y. IRES-mediated Tricistronic vectors for enhancing generation of high monoclonal antibody expressing CHO cell lines. **Journal of Biotechnology**, v. 157, n. 1, p. 130–139, 2012.
77. RAHIMPOUR, A.; BAYAT, H.; OMIDI, M.; PEYROVAN, M.; MOHAMMADIAN, O.; NADERI, F. Stable expression of anti-CD52 monoclonal antibody using a bicistronic vector system. **Biology and Medicine**, v. 8, n. 7, p. 8–11, 2016.
78. NG, S. K.; TAN, T. R. M.; WANG, Y.; NG, D.; GOH, L. T.; BARDOR, M.; WONG, V. V. T.; LAM, K. P. Production of Functional Soluble Dectin-1 Glycoprotein Using an IRES-Linked Destabilized-Dihydrofolate Reductase Expression Vector. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, 2012.
79. PRIOLA, J. J.; CALZADILLA, N.; BAUMANN, M.; BORTH, N.; TATE, C. G.; BETENBAUGH, M. J. High-throughput screening and selection of mammalian cells for enhanced protein production. **Biotechnology Journal**, v. 11, n. 7, p. 853–865, 2016.
80. VORONINA, E. V.; SEREGIN, Y. A.; LITVINOVA, N. A.; SHVETS, V. I.; SHUKUROV, R. R. Design of a stable cell line producing a recombinant monoclonal anti-TNF $\alpha$  antibody based on a CHO cell line. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1, p. 1–11, 2016.
81. NICOLA, A. V.; PONCE DE LEON, M.; XU, R.; HOU, W.; WHITBECK, J. C.; KRUMMENACHER, C.; MONTGOMERY, R. I.; SPEAR, P. G.; EISENBERG, R. J.; COHEN, G. H. Monoclonal antibodies to distinct sites on herpes simplex

- virus (HSV) glycoprotein D block HSV binding to HVEM. **Journal of Virology**, v. 72, n. 5, p. 3595–3601, 1998.
82. VICENTIN, E. C.; FRANÇOSO, K. S.; ROCHA, M. V.; IOURTOV, D.; SANTOS, L.; KUBRUSLY, F. S.; SAKAUCHI, A. M.; RAW, I.; NOSTEN, F.; RÉNIA, L.; RODRIGUES, M. M.; RUSSEL, B.; SOARES, S. I. Invasion-Inhibitory Antibodies Elicited by Immunization with Plasmodium vivax Apical Membrane Antigen-1 Expressed in Pichia pastoris Yeast. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 3, p. 1296–1307, 2014.
83. MANI, S.; TRIPATHI, L.; RAUT, R.; TYAGI, P.; ARORA, U.; BARMAN, T.; SOOD, R.; GALAV, A.; WAHALA, W.; DE SILVA, A.; SWAMINATHAN, S.; KHANNA, N. Pichia pastoris-Expressed Dengue 2 Envelope Forms Virus-Like Particles without Pre-Membrane Protein and Induces High Titer Neutralizing Antibodies. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. 1–9, 2013.
84. INAN, M.; ARYASOMAYAJULA, D.; SINHA, J.; MEAGHER, M. M. Enhancement of Protein Secretion in Pichia pastoris by Overexpression of Protein Disulfide Isomerase. **Wiley**, p. 1–8, 2005.
85. AZOUN, B.S.; BEN ZAKOUR, M.; SGHAIER, S.; KALLEL, H. Expression of rabies virus glycoprotein in the methylotrophic yeast Pichia pastoris. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 64, n. 1, p. 50–61, 2016b.
86. VANZ, L. A.; LUNSDORF, H.; ADNAN, A.; NIMTZ, M.; GURRAMKONDA, C.; KHANNA, N.; RINAS, U. Physiological response of Pichia pastoris GS115 to methanol-induced high level production of the Hepatitis B surface antigen: catabolic adaptation, stress responses, and autophagic processes. **Microbial Cell Factories**, v. 11, n. 103, p. 1–11, 2012.
87. HESKETH, A. R.; CASTRILLO, J. I.; SAWYER, T.; ARCHER, D. B.; OLIVER, S. G. Investigating the physiological response of Pichia (Komagataella) pastoris GS115 to the heterologous expression of misfolded proteins using chemostat cultures. **Applied Genetics and Molecular Biotechnonology**, v. 97, n. 22, p. 9747–9762, 2013.
88. DAMASCENO, L. M.; HUANG, C. J.; BATT, C. A. Protein secretion in Pichia pastoris and advances in protein production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 1, p. 31–39, 2012.

- 
89. HELENIUS, A.; MARQUARDT, T.; BRAAKMAN, I. The endoplasmic reticulum as a protein-folding compartment. **Trends in Cell Biology**, v. 2, n. 8, p. 227–231, 1992.
90. NGIAM, C.; JEENES, D. J.; PUNT, P. J.; VAN DEN HONDEL, C. A. M. J. J.; ARCHER, D. B. Characterization of a foldase, protein disulfide isomerase a, in the protein secretory pathway of *Aspergillus niger*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 775–782, 2000.
91. COHEN, G. H.; WILCOX, W. C.; SODORA, D. L.; LONG, D.; LEVIN, J. Z.; EISENBERG, R. J. Expression of Herpes Simplex Virus Type 1 Glycoprotein D Deletion Mutants in Mammalian Cells. **Journal of Virology**, v. 62, n. 8, p. 1932–1940, 1988.
92. STRAUS, S. E.; SAVARESE, B.; TIGGES, M.; FREIFELD, A. G.; PHILIP, R.; MARGOLIS, D. M.; MEIER, J. L.; PAAR, D. P.; ADAIR, S. F.; DINA, D.; THE, S.; DISEASES, I.; MAY, N.; STRAUS, S. E.; SAVARESE, B.; TIGGES, M.; FREIFELD, A. G.; KRAUSE, P. R.; MARGOLIS, D. M.; MEIER, J. L.; PAAR, D. P.; ADAIR, S. F.; DINA, D.; DEKKER, C.; BURKE, I. R. L. Induction and Enhancement of Immune Responses to Herpes Simplex Virus Type 2 in Humans by Use of a Recombinant Glycoprotein D Vaccine. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 167, n. 5, p. 1045–1052, 1993.
93. DEL CAMPO, J.; LINDQVIST, M.; CUELLO, M.; BÄCKSTRÖM, M.; CABRERRA, O.; PERSSON, J.; PEREZ, O.; HARANDI, A. M. Intranasal immunization with a proteoliposome-derived cochleate containing recombinant gD protein confers protective immunity against genital herpes in mice. **Vaccine**, v. 28, n. 5, p. 1193–1200, 2010.
94. QI, Y.; XU, Y.; PAN, Y.; LI, S.; LI, B.; PAN, M.; ZHANG, S.; LI, Y. Overexpression and purification of HSV-2 glycoprotein D in suspension CHO cells with serum-free medium and immunogenicity analysis. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 63, n. 3, p. 312–319, 2015.
95. ARII, J.; SHINDO, K.; KOYANAGI, N.; KATO, A. Multiple Roles of the Cytoplasmic Domain of Herpes Simplex Virus 1 Envelope Glycoprotein D in Infected Cells. **Journal of Virology**, v. 90, n. 22, p. 10170–10181, 2016.
96. PENTEADO, L.; MEDEIROS, L.; ORELLANA, M. D.; PALMA, P.; FONTES, A. M.; TAKAYANAGUI, O. M.; COVAS, T. Clonagem e expressão da

- glicoproteína transmembrana do retrovírus HTLV-1 em células de mamíferos  
Cloning and transmembrane glycoprotein expression of the retrovirus HTLV-1 in mammals' cells. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 2, p. 169–173, 2006.
97. BOTTI, V.; BIANCHI, A.; FOUNG, S. K. H.; MEROLA, M. The Hepatitis C Virus E1 Glycoprotein Undergoes Productive Folding but Accelerated Degradation When Expressed as an Individual Subunit in CHO Cells. **Plos One**, v. 6, n. 8, 2011.
98. CHUNG, N. P. Y.; MATTHEWS, K.; KIM, H. J.; KETAS, T. J.; GOLABEK, M.; DE LOS REYES, K.; KORZUN, J.; YASMEEN, A.; SANDERS, R. W.; KLASSE, P. J.; WILSON, I. A.; WARD, A. B.; MAROZSAN, A. J.; MOORE, J. P.; CUPO, A. Stable 293 T and CHO cell lines expressing cleaved, stable HIV-1 envelope glycoprotein trimers for structural and vaccine studies. **Retrovirology**, v. 11, n. 1, p. 1–14, 2014.
99. CONTE, F. de P.; MARTINS, R. de S.; DE LIMA, S. M. B.; CAJARAVILLE, A. C. dos R. A.; NASCIMENTO, H. J.; MISSAILIDIS, S.; ARISSAWA, M.; JURGILAS, P. B. Production of Monoclonal Antibody That Recognizes Zika Virus and Other Flaviviruses in Serum-Free Conditions. **Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy**, v. 36, n. 6, p. 264–271, 2017.
100. RITACCO, F. V.; WU, Y.; KHETAN, A. Cell culture media for recombinant protein expression in Chinese hamster ovary (CHO) cells: History, key components, and optimization strategies. **Biotechnology Progress**, v. 34, n. 6, p. 1407–1426, 2018
101. VAN DER VALK, J.; BRUNNER, D.; DE SMET, K.; FEX SVENNINGSEN, Å.; HONEGGER, P.; KNUDSEN, L. E.; LINDL, T.; NORABERG, J.; PRICE, A.; SCARINO, M. L.; GSTRAUNTHALER, G. Optimization of chemically defined cell culture media - Replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. **Toxicology in Vitro**, v. 24, n. 4, p. 1053–1063, 2010.
102. JALURIA, P.; KONSTANTOPOULOS, K.; BETENBAUGH, M.; SHILOACH, J. Egr1 and Gas6 facilitate the adaptation of HEK-293 cells to serum-free media by conferring enhanced viability and higher growth rates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 99, n. 6, p. 1443–1452, 2008.

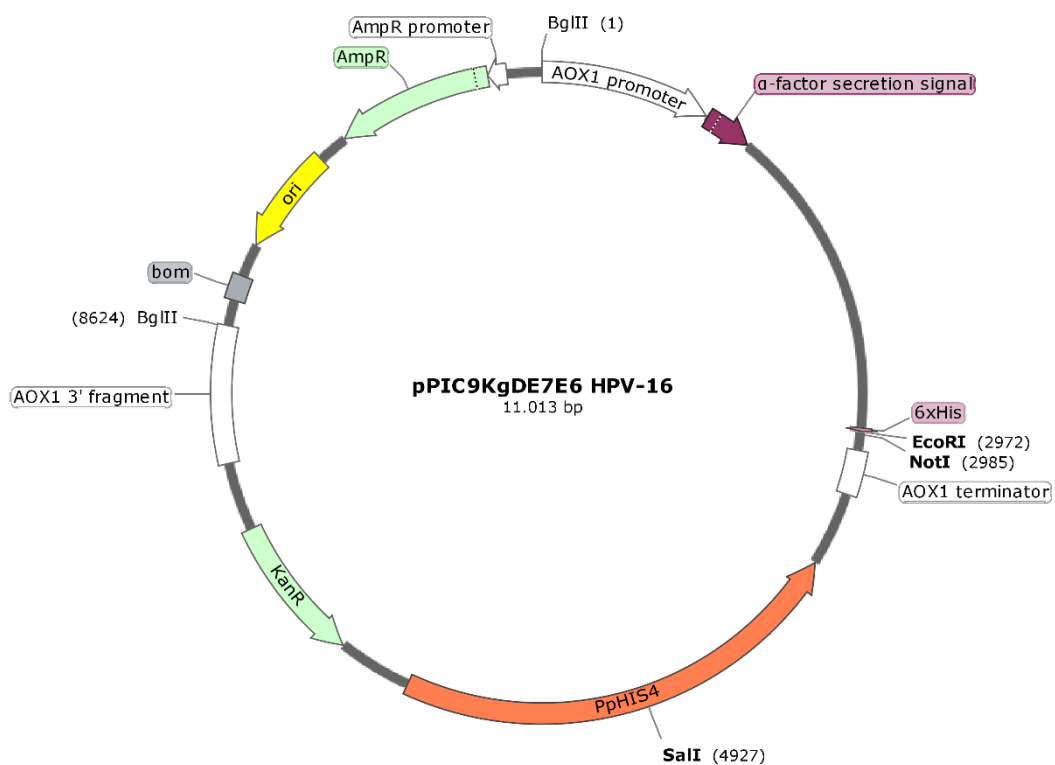


- 
103. HALDANKAR, R.; KOPCHICK, J. J.; RIDGWAY, D. Stable production of a human growth hormone antagonist from CHO cells adapted to serum-free suspension culture. **Biotechnology progress**, v. 15, n. 3, p. 336–346, 1999.
  104. KOH, E. Y. C.; HO, S. C. L.; MARIATI; SONG, Z.; BI, X.; BARDOR, M.; YANG, Y. An internal ribosome entry site (IRES) mutant library for tuning expression level of multiple genes in mammalian cells. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, 2013.
  105. JUN, S. C.; KIM, M. S.; BAIK, J. Y.; HWANG, S. O.; LEE, G. M. Selection strategies for the establishment of recombinant Chinese hamster ovary cell line with dihydrofolate reductase-mediated gene amplification. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 69, n. 2, p. 162–169, 2005.
  106. SHARBAF, A. S.; YAKHCHALI, B.; MINUCHERS, Z.; SHOKRGOZAR, A. M.; ZEINALI, S. Expression Enhancement in T-mAb Production using Genomic Amplification with Methotrexate. **Avicenna Journal of Medical biotechnology**, v. 5, n. 2, p. 87–95, 2013.
  107. METTA, M. K.; KUNAPARAJU, R. K.; TANTRAVAHU, S. Cellular and Molecular Biology Rapid amplification system for recombinant protein production in Chinese Hamster Ovary (CHO) Cells. **Cellular and Molecular Biology**, v. 62, n. 2, p. 101–106, 2016.
  108. KAUFMAN, R. J.; WASLEY, L. C.; SPILIOOTES, A. J.; GOSSELS, S. D.; LATT, S. A.; LARSEN, G. R.; KAY, R. M. Coamplification and coexpression of human tissue-type plasminogen activator and murine dihydrofolate reductase sequences in Chinese hamster ovary cells. **Molecular and Cellular Biology**, v. 5, n. 7, p. 1750–1759, 1985.
  109. PENDSE, G. J.; KARKARE, S.; BAILEY, J. E. Effect of cloned gene dosage on cell growth and hepatitis B surface antigen synthesis and secretion in recombinant CHO cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 40, n. 1, p. 119–129, 1992.
  110. FANN, C. H.; GUIRGIS, F.; CHEN, G.; LAO, M. S.; PIRET, J. M. Limitations to the amplification and stability of human tissue-type plasminogen activator expression by Chinese hamster ovary cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 69, n. 2, p. 204–212, 2000.
  111. KIM, N. S.; BYUN, T. H.; LEE, G. M. Key Determinants in the Occurrence of Clonal Variation in Humanized Antibody Expression of CHO Cells during

- Dihydrofolate Reductase Mediated Gene Amplification. **Biotechnology Progress**, v. 17, n. 1, p. 69–75, 2001.
112. CHUSAINOW, J.; YANG, Y. S.; YEO, J. H. M.; TON, P. C.; ASVADI, P.; WONG, N. S. C.; YAP, M. G. S. A study of monoclonal antibody-producing CHO cell lines: What makes a stable high producer? **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 4, p. 1182–1196, 2009.
113. JAZAYERI, S. H.; ABOLGHASEMI, S.; AMIRI-YEKTA, A.; GHAREMANI, M. H.; DANESHIPOUR, A.; FATEMI, N.; GOURABI, H.; SANATI, M. H.; KHORRAMIZADEH, M. R.; HALFINEZHAD, Z.; ABD EMAMI, B. Comparative Assessment on the Expression Level of Recombinant Human Follicle-Stimulating Hormone (FSH) in Serum-Containing Versus Protein-Free Culture Media. **Molecular Biotechnology**, v. 59, n. 11–12, p. 490–498, 2017.

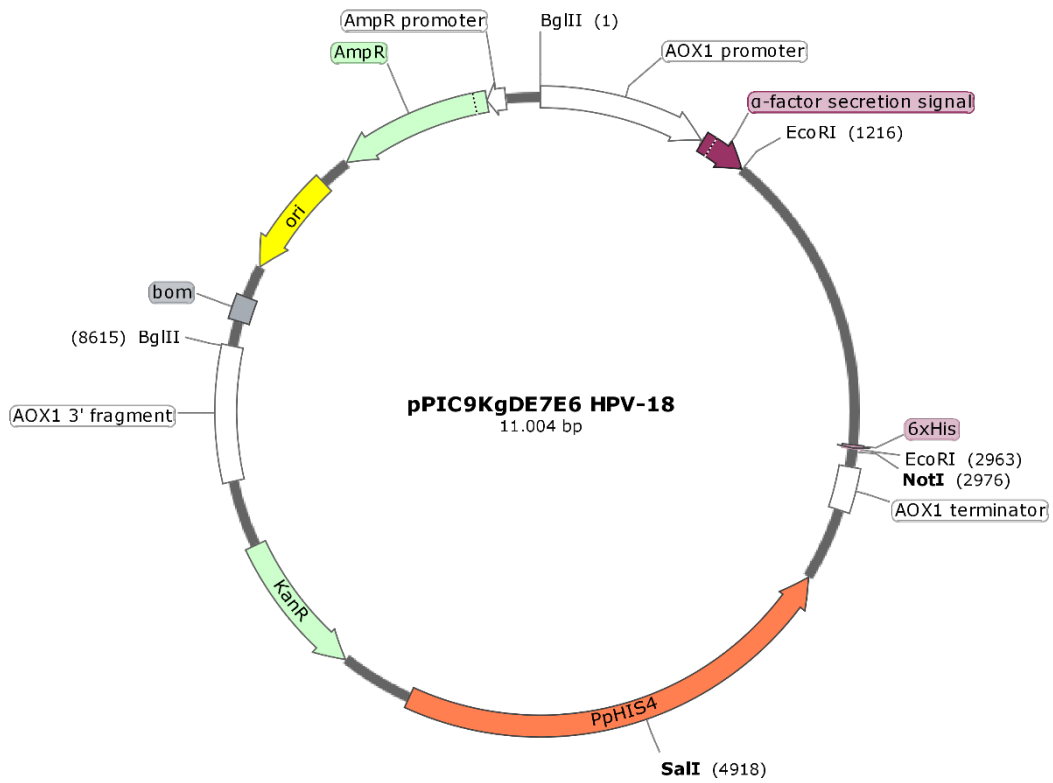
## APÊNDICE – A

Created with SnapGene®



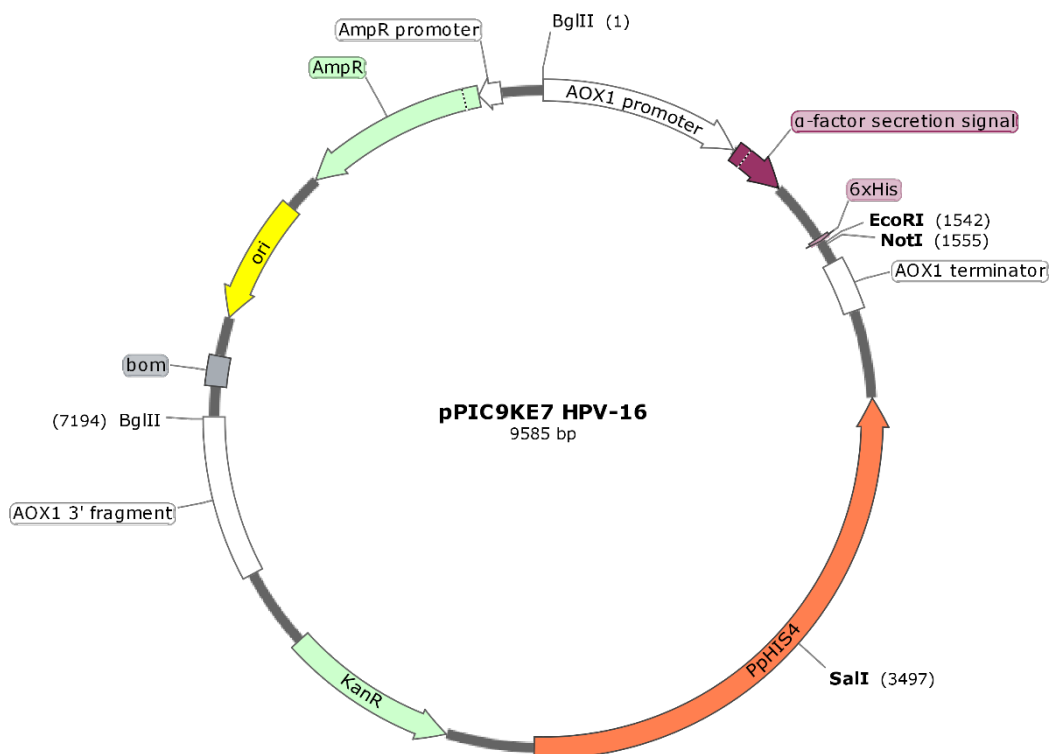
## APÊNDICE – B

Created with SnapGene®



## APÊNDICE – C

Created with SnapGene®





## TÁCITA BORGES BARROS

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/4299630226031658>

ID Lattes: **4299630226031658**

Última atualização do currículo em 25/07/2019


Mestre em Ciências Farmacêuticas, na área de Fisiopatologia pela Universidade de São Paulo. Bacharel em Biotecnologia pela Universidade Federal da Bahia. Possui experiência na área de biologia molecular, microbiologia e imunologia. Realizou projetos de pesquisas para Associação do polimorfismo no gene Paraoxonase 1 e espasmo da artéria coronária, bem como Sexagem molecular de Aves. Atuou como estagiária no Serviço de Hemoterapia do Sudoeste, desenvolvendo atividades em imunohematologia laboratorial. **(Texto informado pelo autor)**

## Identificação

<b>Nome</b>	Tácita Borges Barros
<b>Nome em citações bibliográficas</b>	BARROS, T. B.;BARROS, TÁCITA B.
<b>Lattes iD</b>	 <a href="http://lattes.cnpq.br/4299630226031658">http://lattes.cnpq.br/4299630226031658</a>

## Endereço

## Formação acadêmica/titulação

<b>2017</b>	Mestrado em andamento em Farmácia. Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Expressão e caracterização da glicoproteína D do HSV-1 geneticamente fusionada às oncoproteínas E6 e E7 do HPV-16 e HPV-18 (gDE7E6) em células de mamífero, Orientador:  Profa. Dr. Irene da Silva Soares. Coorientador: Bruna Felício Milazzoto Maldonado Porchia Ribeiro. Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil. Palavras-chave: Câncer de colo de útero, vacina recombinante.
<b>2011 - 2016</b>	Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal da Bahia, UFBA, Brasil. Título: Sexagem molecular de papagaios apreendidos do tráfico de animais silvestres no estado da Bahia. Orientador: Laize Tomazi.

## Formação Complementar

<b>2011 - 2013</b>	Inglês. Wizard Brasil, WIZARD, Brasil.
--------------------	---

## Atuação Profissional

**Universidade Federal da Bahia, UFBA, Brasil.**

### Vínculo institucional

**2013 - 2014** Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Estudante de Iniciação Científica, Carga horária: 20

### Outras informações

Laboratório de Biologia Molecular. Linha de Pesquisa: Levantamento de polimorfismos genéticos associados a patologias com significatcva prevalência em populações de etnia negra

**Vínculo institucional**

**2016 - 2016**

Vínculo: Monitoria, Enquadramento Funcional: Monitoria de Técnicas em Biologia Molecular, Carga horária: 12

**Vínculo institucional**

**2014 - 2015**

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Estudante de Iniciação Científica, Carga horária: 20

**Outras informações**

Laboratório de Biologia Celular e Molecular. Linha de Pesquisa: Associação do polimorfismo Q192R do gene Paraoxonase 1 com espasmo da artéria coronária em Vitória da Conquista - Ba

**UFBA- IMS-CAT, UFBA-IMS/CAT, Brasil.**

**Vínculo institucional**

**2015 - 2016**

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Estudante de Iniciação Científica, Carga horária: 20

**Outras informações**

Laboratório de Biologia Molecular e Celular. Linha de Pesquisa: LEVANTAMENTO DA FREQUENCIA DOS SEXOS NO TRÁFEGO DE PAPAGAIOS APREENDIDOS EM VITÓRIA DA CONQUISTA - BA

**Serviço de Hemoterapia do Sudoeste, SHS, Brasil.**

**Vínculo institucional**

**2015 - 2016**

Vínculo: Estagiário Remunerado, Enquadramento Funcional: Estagiário Remunerado, Carga horária: 36

**Universidade de São Paulo, USP, Brasil.**

**Vínculo institucional**

**2017 - Atual**

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Aluno, Carga horária: 20

**Vínculo institucional**

**2016 - Atual**

Vínculo: Estagiário, Enquadramento Funcional: Estagiário

**Outras informações**

Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas

**Atividades**

**03/2017 - Atual**

Pesquisa e desenvolvimento , Faculdade de Ciências Farmacêuticas, .  
Linhas de pesquisa  
Expressão e caracterização da glicoproteína D do HSV-1 geneticamente fusionada às oncoproteínas E6 e E7 do HPV-16 e HPV-18 (gDE7E6) em células de mamífero

## Linhas de pesquisa

1. Expressão e caracterização da glicoproteína D do HSV-1 geneticamente fusionada às oncoproteínas E6 e E7 do HPV-16 e HPV-18 (gDE7E6) em células de mamífero  
Objetivo: Expressão das proteínas de fusão gDE7E6 HPV-16 e HPV-18 e a oncoproteína E7 HPV-16 em células de levedura *P. pastoris* e expressão da gDE7E6 HPV-16 e HPV-18 em células de mamífero HEK293T e CHODG-44 para obtenção de antígenos purificados com futura aplicação em vacinas terapêuticas contra tumores associados ao HPV-16 e HPV-18..

## Idiomas

**Inglês**

Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Bem.

**Espanhol**

Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Bem.

## Produções

### Produção bibliográfica

## Artigos completos publicados em periódicos

Ordenar por

Ordem Cronológica ▼

1.

MORENO, ANA C. R. ; PORCHIA, BRUNA F. M. M. ; PAGNI, ROBERTA L. ; SOUZA, PATRÍCIA DA CRUZ ; PEGORARO, RAFAEL ; RODRIGUES, KARINE B. ; **BARROS, TÁCITA B.** ; APS, LUANA R. DE MELO MORAES ; DE ARAÚJO, ELISEU F. ; CALICH, VERA L. G. ; FERREIRA, LUÍS C. DE SOUZA . The Combined Use of Melatonin and an Indoleamine 2,3-Dioxygenase-1 Inhibitor Enhances Vaccine-Induced Protective Cellular Immunity to HPV16-Associated Tumors. *Frontiers in Immunology JCR*, v. 9, p. 1914, 2018.

2. **BARROS, T. B.**; FRAGA, R. ; NOVATO, C. R. ; TOMAZI, L. . Improvement of the Molecular Sexing of Parrots in the State of Bahia. *ACTA BIOLÓGICA PARANAENSE*, v. 46, p. 89-107, 2017.

## Apresentações de Trabalho

1. APS, L. R. M. M. ; DINIZ, M. O. ; SILVA, J. R. ; SALES, N. S. ; PORCHIA, B. F. M. M. ; SILVA, M. O. ; MORENO, A. C. R. ; **BARROS, T. B.** ; FERREIRA, L. C. S. . Synergism between cisplatin and a therapeutic DNA vaccine against subcutaneous and intravaginal HPV-associated tumors.. 2017. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
2. PORCHIA, B. F. M. M. ; SOUZA, P. C. ; PAGNI, R. L. ; PEGORARO, R. ; RODRIGUES, K. B. ; **BARROS, T. B.** ; FERREIRA, L. C. S. ; MORENO, A. C. R. . Melatonin enhanced the immune response conferred by the combination of a therapeutic vaccine with indoleamine 2,3 dioxygenase inhibitors targeting human papillomaviruses-associated tumors. 2017. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
3. **BARROS, T. B.**; NOVATO, C. R. ; TOMAZI, L. . Padronização da técnica de sexagem molecular usando sangue como fonte de DNA e determinação do sexo dos papagaios apreendidos do tráfico silvestre e mantidos no CETAS ? Vitória da Conquista.. 2016. (Apresentação de Trabalho/Seminário).
4. ★ **BARROS, T. B.**; TOMAZI, L. ; CUNHA, L. ; FRAGA, R. . Use of molecular method for sexing of parrots seized from wildlife trafficking in Vitória da Conquista - Bahia.. 2015. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
5. **BARROS, T. B.**; TOMAZI, L. . Associação do polimorfismo Q192R do gene Paraoxonase 1 com espasmo da artéria coronária em Vitória da Conquista - Ba. 2015. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

## Eventos

---

### Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. Treinamento em Biossegurança.Treinamento em Biossegurança. 2016. (Outra).
2. 61º Congresso Brasileiro de Genética. Use of molecular method for sexing of parrots seized from wildlife trafficking in Vitória da Conquista - Bahia.. 2015. (Congresso).
3. Semana Nacional de Ciência e Tecnologia.Associação do polimorfismo Q192R do gene Paraoxonase 1 com espasmo da artéria coronária em Vitória da Conquista - Ba. 2015. (Simpósio).
4. Vivenciando a Universidade- Apresentação do IMS/UFBA. Apresentação do laboratório de Biologia Celular e Molecular do Instituto Multidisciplinar em Saúde. Vivenciando a Universidade- Apresentação do IMS/UFBA. Apresentação do laboratório de Biologia Celular e Molecular do Instituto Multidisciplinar em Saúde. 2014. (Exposição).
5. III Seminário de Pesquisa e Pós-graduação do IMS/CAT/UFBA.Levantamento bibliográfico de polimorfismos genéticos associados a patologias com significativa prevalência em populações de etnia negra.. 2013. (Seminário).
6. I Seminário de Pesquisa em Biotecnologia.Levantamento bibliográfico de polimorfismos genéticos associados a patologias com significativa prevalência em populações de etnia negra.. 2013. (Seminário).
7. I Seminário de Pesquisa em Biotecnologia. 2013. (Seminário).
8. Simposio latino-americano de Biotecnologia do Nordeste. 2013. (Simpósio).
9. 2º Semana de Biotecnologia do IMS/CAT-UFBA. 2012. (Simpósio).
10. 4º Congresso Brasileiro de Biotecnologia e Rodada de Negócios. 2012. (Congresso).
11. II Workshop de Melhoramento Genético de Plantas. 2012. (Encontro).
12. Melhoramento, genética e genômica de citros: desafios da integração. 2012. (Encontro).
13. III Seminário de Segurança em laboratórios do IMS. 2011. (Seminário).
14. I Seminário de Pesquisa e Pós-Graduação. 2011. (Seminário).

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 01/08/2019 às 17:00:50

Imprimir currículo



**Universidade de São Paulo**  
**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**  
**Documento sem validade oficial**  
**FICHA DO ALUNO**

**9142 - 10190093/1 - Tácita Borges Barros**

**Email:** tacitaborges@usp.br  
**Data de Nascimento:** 06/02/1994  
**Cédula de Identidade:** RG - 13.557.643-19 - BA  
**Local de Nascimento:** Estado da Bahia  
**Nacionalidade:** Brasileira  
**Graduação:** Bacharela em Biotecnologia - Universidade Federal da Bahia - Bahia - Brasil - 2016

**Curso:** Mestrado  
**Programa:** Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)  
**Área:** Fisiopatologia  
**Data de Matrícula:** 15/03/2017  
**Início da Contagem de Prazo:** 15/03/2017  
**Data Limite para o Depósito:** 16/09/2019  
**Orientador:** Prof(a). Dr(a). Irene da Silva Soares - 15/03/2017 até 11/07/2019. Email: isoares@usp.br  
**Co-orientador:** Prof(a). Dr(a). Bruna Felicio Milazzotto Maldonado Porchia Ribeiro - 06/06/2018 até 11/07/2019. Email: brumaldonado@gmail.com  
**Proficiência em Línguas:** Inglês, Aprovado em 15/03/2017  
**Data de Aprovação no Exame de Qualificação:** Aprovado em 04/04/2018  
**Data do Depósito do Trabalho:** 27/05/2019  
**Título do Trabalho:** "Expressão e caracterização da glicoproteína D do HSV-1 geneticamente fusionada às oncoproteínas E6 e E7 do HPV-16 e HPV-18 (gDE7E6) em células de mamífero"  
**Data Máxima para Aprovação da Banca:** 11/07/2019  
**Data de Aprovação da Banca:** 05/06/2019  
**Data Máxima para Defesa:** 18/09/2019  
**Data da Defesa:** 11/07/2019  
**Resultado da Defesa:** Aprovado

**Acesso à dissertação/tese:** **'Banco de Teses da USP'**

**A titulação é:** Somente USP

**Histórico de Ocorrências:** Primeira Matrícula em 15/03/2017  
 Titulado em 11/07/2019

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor de 20/04/2013 até 28/03/2018).

**Última ocorrência:** Titulado em 11/07/2019

**Impresso em:** 25/07/2019 13:25:29





**Universidade de São Paulo**  
**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**

**Documento sem validade oficial**

**FICHA DO ALUNO**

**9142 - 10190093/1 - Tácita Borges Barros**

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
TNA5801-1/7	Purificação de Proteínas e Peptídeos (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - Universidade de São Paulo)	29/05/2017	09/07/2017	120	8	100	A	N	Concluída
BTC5751-4/6	Seminários em Biotecnologia II (Curso Interunidades: Biotecnologia - Universidade de São Paulo)	09/08/2017	21/11/2017	30	2	100	A	N	Concluída
FBC5757-8/1	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia II	15/08/2017	27/11/2017	15	1	90	A	N	Concluída
BMI5863-9/1	Seminário Didático-Científico em Imunologia II (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	17/08/2017	29/11/2017	60	4	100	A	N	Concluída
MCM5923-1/2	Mecanismos de Carcinogênese (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	17/10/2017	30/10/2017	60	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida
FBC5710-7/1	Vacinas e Adjuvantes	13/11/2017	17/12/2017	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5793-14/1	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia I	05/03/2018	19/06/2018	15	1	75	A	N	Concluída
BTC5752-3/7	Seminários em Biotecnologia III (Curso Interunidades: Biotecnologia - Universidade de São Paulo)	07/03/2018	19/06/2018	30	2	100	A	N	Concluída
BMM5801-6/1	Vacinas e a Microbiologia (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	02/04/2018	15/04/2018	60	4	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
<b>Disciplinas:</b>	0	25	26
<b>Estágios:</b>			
<b>Total:</b>	0	25	26

**Créditos Atribuídos à Dissertação: 71**

**Conceito a partir de 02/01/1997:**

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

**Última ocorrência:** Titulado em 11/07/2019

**Impresso em:** 25/07/2019 13:25:29



**Universidade de São Paulo**  
**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**  
**Documento sem validade oficial**  
**FICHA DO ALUNO**

**9142 - 10190093/1 - Tácita Borges Barros**

Comissão julgadora da dissertação de mestrado:			
NUSP	Nome	Vínculo	Função
3442541	Irene da Silva Soares	FCF - USP	Presidente
1382771	Patrick Jack Spencer	IPEN(IPEN)	
1942820	Viviane Fongaro Botosso	BUTANTA - Externo	
3518865	Ana Priscila Perini de Araujo	I.Butantan - Externo	

**Última ocorrência:** Titulado em 11/07/2019

**Impresso em:** 25/07/2019 13:25:29