

**Otto Luiz Dutra Cerqueira**

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES SISTEMAS DE IMUNIZAÇÃO QUE  
EMPREGAM A ONCOPROTEINA E7 DO VÍRUS PAPILOMA HUMANO  
TIPO 16 (HPV 16) GENETICAMENTE FUSIONADA À FLAGELINA  
FliCd DE *Salmonella enterica* sv. Muenchen.**

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Ciências Biomédicas da Universidade de São  
Paulo para obtenção do Título de Mestre em  
Ciências (Microbiologia).

**SÃO PAULO  
2009**

**Otto Luiz Dutra Cerqueira**

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES SISTEMAS DE IMUNIZAÇÃO QUE  
EMPREGAM A ONCOPROTEINA E7 DO VÍRUS PAPILOMA HUMANO  
TIPO 16 (HPV 16) GENETICAMENTE FUSIONADA À FLAGELINA  
FliCd DE *Salmonella enterica* sv. Muenchen.**

**Dissertação apresentada ao Instituto de  
Ciências Biomédicas da Universidade de São  
Paulo para obtenção do Título de Mestre em  
Microbiologia.**

Área de concentração: Microbiologia

**Orientador: Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira**

**SÃO PAULO  
2009**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do  
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Cerqueira, Otto Luiz Dutra.

Avaliação de diferentes sistemas de imunização que empregam a oncoproteína E7 do vírus do Papiloma humano tipo 16 (HPV 16) geneticamente fusionada à flagelina fliCd de *Salmonella entérica* sv. muenchen / Otto Luiz Dutra Cerqueira. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Luís Carlos de Souza Ferreira.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Vacinas terapêuticas contra tumores induzidos pelo HPV.

Versão do título para o inglês: Evaluation of different immunization systems that use the oncoprotein E7 of the human Papiloma virus type 16 (HPV 16) genetically fused to the flagellin of the *Salmonella enterica* sv. muenchen.

Descritores: 1. Células T CD8<sup>+</sup> 2. Flagelina 3. Vacinas terapêuticas I. Ferreira, Luís Carlos de Souza II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

ICB/SBIB3/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Otto Luiz Dutra Cerqueira.

Título da Dissertação: Avaliação de diferentes sistemas de imunização que empregam a oncoproteína E7 do vírus do Papiloma humano tipo 16 (HPV 16) geneticamente fusionada à flagelina fliCd de *Salmonella entérica* sv. muenchen.

Orientador(a): Luís Carlos de Souza Ferreira.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,  
em sessão pública realizada a ...../...../.....,

**Aprovado(a)**

**Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

## **DEDICATÓRIA**

**“Aos meus pais pela dedicação e por me ensinar a ter gosto pelos estudos”.**

Este trabalho foi realizado sob orientação do Prof. Luís Carlos de Souza Ferreira, no Centro de Vacinas e Terapias Gênicas III (CEVAT-GENE III) do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com auxílio financeiro da CAPES, CNPq e Ministério da Saúde.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho, seja uma idéia ou auxílio técnico; ou mesmo apoio amigo.

À Bruna Maldonado pela boa amizade, incentivo sempre nas horas mais difíceis do percurso e pela confluência de idéias. Pelos ensaios em conjunto, principalmente aqueles que envolveram a proteína E7Δ.

À Mariana Diniz pela minha recepção no laboratório, que gerou uma crescente amizade repleta de eventos. Pelo apoio em técnicas de biologia molecular e ensaios imunológicos.

Às amigas Juliana Falcão e Catarina Braga, pela boa e divertida amizade.

À amiga Priscila Dal Pozo por compartilhar horários noturnos, pelo coleguismo e pelo apelido.

Aos amigos Hugo Izabel, Rafael Ciro, Robert Leonard e Domingos Botte, pela parceria e as boas gargalhadas compartilhadas.

À Beth Sbrogio pela sua disposição em ensinar e ajudar o manuseio de animais de laboratório. Agradeço também a convivência alegre no laboratório, com direito a ramos de Arruda.

Aos colegas de laboratório Jaime, Renata, Vinicius, Cariri, Elisa, Sabrina, “Juliano dentista”, Milene, Roberto, Cristiane, Eduardo, Fabiano, Liliane, Luana, Bruno Timtim, , Wilson, Juliano, Natalia, Natalie, Marcelo, Camila pela convivência.

Aos amigos Roger Chaca, Cleverson Bigode, Alexandre Lobete, Marlio Urteg, Thiago Nietzsche e Saulo Docyn por ajudarem a tornar a moradia estudantil no CRUSP uma coisa agradável.

Aos Maracangalhanos e amigos da Bahia por tão bem me receberem nos merecidos momentos de descontração.

Aos colegas do laboratório do Menck, Luís, Queromim, Carol Berra, Carol Q., Melissa, Dani, Esthefano, Ricardo, Tomaz, André, Lu, Tati por terem me ajudado no aprendizado e manuseio de culturas celulares, transfecções e microscopia de fluorescência.

Aos amigos do ICB, Cassiano Carromeu, Joselma, Frank, Camila Romano, Carol Lego pelas boas conversas e discussões.

À Professora Dra Rita Café Ferreira pela amizade e as conversas iniciais, que me encorajaram a procurar os prof. Luís.

À Dra. Nathalie Cella por me oferecer boas perspectivas de continuar fazendo pesquisa científica.

Ao professor Dr. Carlos Menck pela disposição em ajudar neste trabalho cedendo o espaço físico do laboratório. Por me dedicar tempo e oferecer a ajuda de seus alunos. Pela confiança a mim conferida.

Ao professor Dr. Luís Carlos Ferreira pela enérgica orientação. Por acolher na academia após longo período de tempo no mercado. Por me proporcionar inúmeras oportunidades de amadurecimento científico.

À minha namorada Elaine Cardoso por seu companheirismo e incentivo. Por trazer amor, paz e alegria em meu viver.

À César Cerqueira, meu pai, pelo exemplo de força, persistência, honestidade e longevidade.

À Rosa Maria Cerqueira, minha mãe, pelo amor materno incondicional que sempre me impulsiona a evoluir.

Às Universidades públicas e de qualidade em nosso país.



**“Não existe causa alguma, extrínseca ou intrínseca a Deus, que o incite a agir, além da perfeição de sua própria natureza”.**

**Baruch de Espinosa  
Ética**

## RESUMO

Cerqueira, OLD. Avaliação de diferentes sistemas de imunização que empregam a oncoproteína E7 do vírus papiloma humano tipo 16 (HPV 16) geneticamente fusionada à flagelina flicd de *Salmonella enterica* sv. Muenchen. [Dissertação (Mestrado em Microbiologia)] São Paulo; Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2009.

O câncer cervical é o segundo maior responsável por mortes atribuídas a câncer em mulheres e dados epidemiológicos tem demonstrado a associação entre a infecção do HPV e o desenvolvimento da neoplasia. Sabe-se que num dado momento da infecção pelo HPV, ocorre integração do genoma viral ao genoma da célula hospedeira e consequente hiperexpressão de dois oncogenes virais, E6 e E7, o que contribui fortemente para a transformação celular. O presente trabalho propõe o uso de vacinas terapêuticas expressando a oncoproteína E7 do HPV-16 geneticamente fusionada à porção amino terminal da flagelina FliCd de *Salmonella enterica* sv müenchen; e verificação de seu possível papel adjuvante. Vacinas de DNA foram construídas de modo a direcionar as proteínas híbridas ao espaço intracitoplasmático. A verificação da expressão *in vitro* foi feita utilizando transfecções de culturas celulares, seguida de imunofluorescência e imunodeteção. Em seguida, essas construções vacinais foram administradas em camundongos C57BL6. Ensaios de ELISPOT foram feitos para mensuração o nível de linfócitos T secretores de IFN-g. Os dados de imunofluorescência e imunodeteção demonstraram a correta expressão da proteína. Ensaios de proteção realizados com  $5 \times 10^6$  células TC-1 administrada por via subcutânea mostraram 80% de proteção em camundongos que haviam recebido previamente 4 doses das vacinas de DNA por biobalística. Ensaios de ELISPOT mostraram em média 9 células do baço secretoras de IFN- $\gamma$  por  $10^6$  células do baço (INF- $\gamma^+$ / $10^6$ ) responsivas ao peptídeo CD8 / E7 de forma específica. Nossos dados sugerem que a formulação vacinal possui um efeito terapêutico significativo frente ao desafio com as células tumorais TC-1. Em paralelo, foi construída a cepa de salmonela vacinal SL FlaE7 que não mostrou efeito protetor frente ao desafio com células TC-1.

**Palavras chave:** Papillomavírus. Vacinas terapêuticas. Imunização. Oncoproteínas, Células T CD8<sup>+</sup>. Flagelina.

## Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

