



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Genética

Alanne Rayssa da Silva Melo

**Desenvolvimento de vacina de DNA multiepítipo como
imunoterapia contra o câncer cervical**

Recife

2021

Alanne Rayssa da Silva Melo

**Desenvolvimento de vacina de DNA multiepítipo como
imunoterapia contra o câncer cervical**

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

Área de concentração: Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas

Coorientadores: Dr. Marcelo Nazário Cordeiro

Dr. André Luiz Santos de Jesus

Recife

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Melo, Alanne Rayssa da Silva

Desenvolvimento de vacina de DNA multiepítopo como imunoterapia contra o câncer cervical. / Alanne Rayssa da Silva Melo. – 2021.

94 f.: il. col.

Orientador: Antonio Carlos de Freitas

Coorientador: Marcelo Nazário Cordeiro

Coorientador: André Luiz Santos de Jesus

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências.

Programa de Pós-Graduação em Genética, Recife, 2021.

Inclui referências.

1. Colo uterino - Câncer 2. Papilomavírus humano 16 3. Vacinas de DNA 4. Proteínas oncogênicas 5. Imunomoduladores I. Freitas, Antonio Carlos de (orient.) II. Cordeiro, Marcelo Nazário (coorient.) III. Jesus, André Luiz Santos de (coorient.) IV. Título.

616.99466

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2021 - 381

ALANNE RAYSSA DA SILVA MELO

DESENVOLVIMENTO DE VACINA DE DNA MULTIEPÍTOPO COMO IMUNOTERAPIA CONTRA O CÂNCER CERVICAL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Doutor em Genética. Área de concentração: Biologia Molecular.

Aprovado em: 03/11/2021

BANCA EXAMINADORA

Dr. Antonio Carlos de Freitas
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Mathias Weller
Universidade Estadual da Paraíba

Dr. Jacinto da Costa Silva Neto
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Tercilio Calsa Junior
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Marcos Antonio de Moraes Junior
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico esse trabalho a Deus, causa primordial de todas as coisas e aos meus pais, pilares da minha formação como ser humano.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me ensinado resiliência e me apontar o caminho em momentos difíceis. Aos meus pais, Arnaud Melo e Crisonete Melo, que sempre estiveram ao meu lado e compreenderam a minha ausência. Suas palavras de ânimo foram fundamentais para a conclusão desta desafiadora jornada. Aos meus irmãos, Lila, Neto e Raquel, e ao meu cunhado, Patrick, pela amizade e cumplicidade em todos os momentos. Ao meu gatinho, Darwin, por ser um companheiro fiel – debruçado sobre a mesa de estudo – durante as infinitas horas de leitura e escrita. Aos meus queridos avós (in memoriam), Josefa e Arnaud, vocês partiram, mas sempre terei lembranças das pessoas fantásticas que foram. Vocês me ensinaram que ser grato e cultivar a criança interior é o único remédio capaz de atenuar os males do corpo. A minha avó Celestina, por ser exemplo de perseverança.

Ao meu namorado, Davide De Luca, pelo imenso cuidado, companheirismo e apoio emocional, especialmente durante o excepcional lockdown no início da pandemia na Itália. Sua companhia trouxe leveza, amenizando tempos difíceis. Obrigada por respeitar a minha maneira de ser, me apoiando em meus ideais mesmo que para isso fiquemos separados, e pelos ótimos momentos que temos passado juntos. À família italiana que a vida me presenteou, Adele, Gaetano, Melania, Vincenzo, Davide Jr e Riccardino, por me receberem de braços abertos e fazerem parte dos meus melhores momentos durante o estágio no exterior. Vocês me fizeram sentir verdadeiramente em casa. Aos meus amigos italianos, Nicola e Gabriella, vocês são pessoas muito queridas, cuja amizade quero sempre cultivar, mesmo à distância.

Aos meus amigos que amo imensamente, Janyelle, Monique, Allisson, Hugo e a toda família EJC. Ao meu grande amigo, Emanuel (in memoriam), que partiu precocemente devido à COVID-19, sua personalidade única e sua alegria de viver

será sempre lembrada com imensa saudade. A todos os meus amigos de apartamento, o qual se fez extensão do nosso laboratório: Paula, Ana, Hellen, Herbert e Conceição. Vocês são companhias divertidas e maravilhosas. Agradeço por todos os momentos de risadas e trapalhadas. Aos meus eternos melhores vizinhos, Eduardo e Thiago, eu simplesmente adoro estar na companhia de vocês.

A todos os meus amigos do laboratório LEMTE, em especial, Larissa, Herbert, Gabriel, Thiago, Benigno, Anna, Guilherme, Carol, Daffany, Bianca e Lígia. Vocês são pessoas, no mínimo excêntricas. A companhia de vocês torna o ambiente do laboratório muito mais leve e divertido. Eu aprendi muito com vocês, em todos os sentidos. Juntos conseguimos avançar e ultrapassar todos os obstáculos. Aos funcionários do Laboratório Central: Edwards, Patrícia e dona Carmen. Vocês são pessoas maravilhosas. Obrigada por toda paciência, simpatia e apoio demonstrados diariamente.

Ao secretário do programa de pós-graduação em genética, Manassés, por todo cuidado e disposição na resolução dos nossos problemas, sempre com um sorriso a oferecer. A todos os professores, especialmente Jacinto, Antônio Roberto, e Tercílio, por todo o incentivo, amizade e dedicação. Aos meus colegas da pós-graduação, por todos os momentos compartilhados.

Ao meu orientador Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas, por ter me confiado o projeto e me manter motivada durante todo o processo, e em todos os recomeços. Por sempre nos fazer pensar e questionar sobre o tema das nossas pesquisas. Você é exemplo de pessoa e de profissional. Sua sabedoria, paciência, gentileza e humildade são fontes de inspiração para todos nós do laboratório. Aos meus coorientadores, Dr. Marcelo Nazário e Dr. André Luiz, vocês foram fundamentais

durante todo o processo. Obrigada pela imensa paciência e gentileza durante o compartilhamento das vossas experiências.

A todos do Istituto Nazionale Tumori Regina Elena, em Roma, Itália, em especial ao meu orientador no exterior Dr. Aldo Venuti, por ter aceitado com tanta presteza a minha orientação, por todo companheirismo e apoio prestado. A Francesca Paolini, por ter me acompanhado durante todas as etapas da pesquisa na Itália. Por toda solidariedade, dedicação, paciência, bom humor e amizade. Você é uma pessoa muito especial. Ao Dr. Sergio Anastasi, pela imensa gentileza no compartilhamento de protocolos e café. Sua amizade e bom humor tornaram meus dias mais leves. A técnica do laboratório, Giuliana, por todo auxílio e gentileza prestados. Carinhosamente você me fez compreender a necessidade de aprender a língua italiana com urgência. Obrigada pela amizade que nos une e por todos os sorrisos e gestos compartilhados durante a nossa comunicação. A Susanna e Federico, por todo apoio e companheirismo. A todos os funcionários que fazem parte do instituto, vocês são pessoas muito competentes e maravilhosas.

A todos os integrantes do laboratório LAIA, em especial a Prof.^a Dr.^a Cristiane Moutinho, por todo o auxílio prestado durante as etapas fundamentais da pesquisa, pelas palavras de conforto e por se doar tanto, mesmo em momentos difíceis. Eu não tenho palavras para expressar minha gratidão e a sua importância no desenvolvimento desse projeto. A Geoh, e Guilherme, por toda ajuda técnica e carisma. É sempre maravilhoso estar na companhia de vocês.

A todos os que contribuíram no desenvolvimento técnico deste trabalho, em especial ao professor Dr. Jacinto Costa, Maxwellinne, Helena, Roniere e Lucas Lopes. Sou imensamente grata ao apoio incondicional de vocês. A banca examinadora, pela presteza no aceite do convite e pelas valiosas sugestões.

A Universidade Federal de Pernambuco e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo suporte técnico e financeiro durante toda a pós-graduação.

“Vocês jovens, doutores, cientistas do futuro não se deixem abalar por um ceticismo estéril, nem se deixem desencorajar pela tristeza de certas horas que as nações passam.”

(Louis Pasteur)

RESUMO

O câncer cervical é quarta neoplasia mais prevalente em mulheres no mundo. Além disso, os cânceres associados à infecção pelo papilomavírus humano (HPV) incluem desde lesões neoplásicas anogenitais bem como orofaríngeas. A atividade da proteína E7 produzida por HPV de alto risco é apontada como uma das principais mediadoras da carcinogênese. O presente estudo objetivou desenvolver estratégias terapêuticas contra lesões associadas à infecção pelo HPV-16 através da elicitação de resposta imune contra epítomos imunogênicos da proteína E7 do HPV-16, em modelo pré-clínico. Como adjuvante vacinal foram utilizados o imunomodulador li-PADRE e sequências linkers. Quanto a confecção da vacina de DNA, os genes de interesse foram clonados no vetor pVAX. Camundongos C57 black foram desafiados com a linhagem tumoral C3, seguido de imunização em esquema *prime-boost* homólogo e eletroporação. A avaliação dos efeitos antitumorais foi realizada através da investigação de citocinas presentes no soro e nos tumores, além da pesagem, monitoramento do crescimento, e análise histopatológica dos tumores. Nossos dados não revelaram diferença estatística entre os grupos, porém é possível observar uma tendência para o aumento de citocinas Th1, menor densidade tumoral, e menor pleomorfismo em tumores de animais imunizados com o plasmídeo multi E7 associado ao li-PADRE, o que pode indicar um possível potencial imunogênico desta estratégia vacinal para a indução da resposta celular protetiva. Além disso, melhorias na construção vacinal E7 se fazem necessárias para obtenção de uma melhor performance.

Palavras-chave: Câncer cervical; Vacina de DNA; HPV-16; Imunoterapia; li-PADRE.

ABSTRACT

Cervical cancer is the fourth most prevalent neoplasm in women worldwide. Also, cancers associated with human papillomavirus (HPV) infection range from anogenital to oropharyngeal neoplastic lesions. The activity of the E7 protein produced by high-risk HPV is identified as one of the main mediators of carcinogenesis. The present study aimed to develop therapeutic strategies against lesions associated with HPV-16 infection through elicitation of the immune response against immunogenic epitopes of the E7 protein of HPV-16, in a preclinical model. As a vaccine adjuvant, the immunomodulator Ii-PADRE and linker sequences were used. As for the production of the DNA vaccine, the genes of interest were cloned into the pVAX vector. C57 black mice were challenged with the C3 tumor lineage, followed by homologous prime-boost immunization and electroporation. The assessment of antitumor effects was performed by investigating cytokines present in serum and tumors, in addition to weighing, monitoring growth, and histopathological analysis of tumors. Our data revealed no statistical difference between the groups, but it is possible to observe a slight trend towards an increase in Th1 cytokines, lower tumor density, and lower pleomorphism in tumors of animals immunized with the plasmid multi E7 associated with Ii-PADRE, which may indicate a possible immunogenic potential of this vaccine strategy for inducing a protective cellular response. Furthermore, improvements in the E7 vaccine construction are necessary to achieve better performance.

Key words: Cervical cancer; DNA vaccine; HPV-16; Immunotherapy; Ii-PADRE.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Representação diagramática do genoma circular do HPV.....	23
Quadro 1-	Relação sumarizada das proteínas de HPV e suas principais funções.....	23
Figura 2-	Ciclo de vida e expressão gênica do HPV.....	26
Figura 3-	Mecanismo de processamento e apresentação de uma vacina de DNA via MHC-I.....	34
Figura 4-	Diagrama esquemático da cadeia invariável Ii e da quimera Ii- <i>Pan HLA-DR reactive epitope</i> (PADRE).....	38
Quadro 2-	Descrição dos epítomos ligantes de MHC-I preditos pela ferramenta IEDB utilizados neste estudo.....	42
Figura 5-	Esquema ilustrativo do gene sintético multiepítopo para o antígeno E7 de HPV-16.....	42
Figura 6-	Esquema do ensaio de eficiência terapêutica das propostas vacinais.....	46
Figura 7-	Descrição dos diferentes grupos estudados.....	47
Figura 8-	Representação esquemática das diferentes amostras biológicas coletadas dos animais e seus respectivos processamentos.....	48
Figura 9-	Mapa do plasmídeo pVAX contendo o inserto multi E7 clonado em orientação <i>BamHI/XbaI</i>	53
Figura 10-	Mapa do plasmídeo pVAX contendo o inserto Ii-PADRE clonado em orientação <i>BamHI/XbaI</i>	54
Figura 11-	Amplificação através de PCR de um fragmento do plasmídeo pVAX para confirmação dos clones pVAX/multi E7 e pVAX/Ii-PADRE em <i>E. coli</i> TOP10 (vacinas de DNA).....	54
Figura 12-	Digestão de DNA plasmidial com as enzimas <i>BamHI/XbaI</i> para confirmação dos clones pVAX/multi E7 e pVAX/Ii-PADRE em <i>E. coli</i> TOP10 (vacinas de DNA).....	55
Gráfico 1-	Monitoramento do peso dos animais nos diferentes grupos vacinais.....	56

Figura 13-	Apresentação dos tumores de cada animal em seus respectivos grupos vacinais após secção longitudinal em uma placa de Petri.....	57
Gráfico 2-	Monitoramento do volume tumoral nos diferentes grupos vacinais.....	58
Gráfico 3-	Pesagem dos tumores nos diferentes grupos vacinais.....	59
Gráfico 4-	Comparação do volume médio com a densidade média dos tumores em cada grupo vacinal.....	59
Figura 14-	Perfil da produção de citocinas analisadas a partir de amostras do soro dos animais.....	61
Figura 15-	Perfil da produção de citocinas analisadas a partir de amostras de tumor dos animais.....	62
Figura 16-	Amostras representativas dos cortes histológicos de tumores derivados da linhagem celular C3 em camundongo em cada grupo vacinal.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Resultado das análises histopatológicas dos grupos vacinais estudados.....	64
------------------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

APC	Célula apresentadora de antígeno
DC	Célula dendrítica
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
DNMT1	DNA metiltransferase 1
E6AP	<i>E6-associated protein</i>
EGF	Fator de Crescimento Epidermal
EP	Eletroporação
EZH2	<i>Enhancer of zeste homolog 2</i>
FITC	Isocianato de fluoresceína
HDAC1	Histona desacetilase 1
HE	Hematoxilina-eosina
HPV	Papilomavírus humano
hrHPV	HPVs de alto risco
HSPG	Heparan sulfato dos proteoglicanos
ID	Intradermal
IEDB	<i>Immune Epitope Database</i>
IFN-γ	Interferon gama
Ii	Cadeia invariante
IM	Intramuscular
IPTG	<i>Isopropil-β-D-1-tiogalattopiranoside</i>
lrHPV	HPVs de baixo risco
LB	Luria-Bertani
MCS	<i>Multi cloning site</i>

MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MMP	Metaloproteinase de matriz
NIC	Neoplasia cervical intraepitelial
ORF	<i>Open read frame</i>
PADRE	<i>Pan HLA-DR reactive epitope</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pRB	Proteína do retinoblastoma
PRINT	Programa Institucional de Internacionalização
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
VLP	Partícula semelhante ao vírus
TAA	<i>Tumor-associated antigen</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1	EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER CERVICAL.....	20
2.2	O PAPILOMAVÍRUS HUMANO.....	21
2.2.1	Estrutura e organização do genoma.....	21
2.2.2	Mecanismo de infecção do vírus na célula hospedeira.....	24
2.2.3	O Ciclo viral.....	25
2.2.4	As oncoproteínas virais.....	27
2.2.5	A integração do genoma viral.....	28
2.2.6	Lesões provocadas por HPVs de alto risco.....	30
2.3	VACINA DE DNA COMO ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA CONTRA O CÂNCER CERVICAL.....	31
2.3.1	As oncoproteína E7 como antígeno vacinal.....	34
2.3.2	Imunomoduladores e estratégias para o aprimoramento de construções vacinais.....	36
3	OBJETIVOS.....	40
3.1	OBJETIVO GERAL.....	40
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
4	METODOLOGIA.....	41
4.1	GENES.....	41
4.2	CLONAGEM E OBTENÇÃO DOS PLASMÍDEOS VACINAIS.....	42
4.3	MODELO DE DESAFIO TUMORAL.....	44
4.4	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTITUMORAIS INDUZIDOS PELOS CANDIDATOS VACINAIS.....	45
4.5	MONITORAMENTO DO CRESCIMENTO TUMORAL.....	48
4.6	INVESTIGAÇÃO DE CITOCINAS PRODUZIDAS.....	48
4.7	ANÁLISE CITOPATOLÓGICA DO TUMOR PELO MÉTODO DE IMPRINT TUMORAL.....	49
4.8	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO TUMOR.....	50
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
5	RESULTADOS.....	53

5.1	OBTENÇÃO DOS PLASMÍDEOS VACINAIS.....	53
5.2	MONITORAMENTO DO CRESCIMENTO TUMORAL.....	55
5.3	INVESTIGAÇÃO DE CITOCINAS	60
5.4	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO TUMOR.....	62
6	DISCUSSÃO.....	65
7	CONCLUSÕES.....	78
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
	APÊNDICE A – REPRESENTAÇÃO DAS CONSTRUÇÕES VACINAIS	88
	APÊNDICE B – COLABORAÇÃO EM PUBLICAÇÃO DE ARTIGO DE	
	REVISÃO SOBRE VACINAS TERAPÊUTICAS CONTRA O CÂNCER	
	CERVICAL.....	90
	APÊNDICE C – COLABORAÇÃO EM PUBLICAÇÃO DE ARTIGO DE	
	REVISÃO SOBRE INFECÇÕES POR CORONAVÍRUS NA GRAVIDEZ	
	E DESENVOLVIMENTO FETAL.....	91
	APÊNDICE D – COLABORAÇÃO EM PUBLICAÇÃO DE ARTIGO DE	
	REVISÃO SOBRE A REALIDADE BRASILEIRA DURANTE O INÍCIO	
	DO SURTO DE PANDEMIA DA COVID-19.....	92
	APÊNDICE E – PUBLICAÇÃO DE ARTIGO DE REVISÃO COMO	
	PRIMEIRO AUTOR – ARTIGO PUBLICADO SOBRE	
	DESENVOLVIMENTO DE VACINAS ANTÍGENOS SINTÉTICOS	
	PARA COVID-19.....	93
	ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO PELA CEUA DA UFPE.....	94

1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde classifica o câncer cervical como a quarta neoplasia mais prevalente em mulheres em todo o mundo. No Brasil, estima-se que a prevalência do câncer cervical constitui também a terceira maior causa de câncer em mulheres, apenas superada pelo câncer de pele (não melanoma) e câncer de mama. Os cânceres associados à infecção pelo papilomavírus humano (HPV) incluem desde lesões neoplásicas anogenitais até orofaríngeas. Apenas para o câncer cervical, a OMS contabiliza mais de 604 mil novos casos em 2020. A infecção pelo HPV é principalmente contraída pelo contato sexual, através do qual microtraumas na mucosa permitem o acesso de partículas virais ao epitélio basal.

Evidências mostram que infecções persistentes causadas pelo HPV, relacionadas também a algum nível de comprometimento do sistema imunológico e variações hormonais, são fatores preponderantes para o desenvolvimento do câncer cervical. Embora seja um grave problema de saúde pública, o câncer cervical não possui um tratamento eficaz nos estágios mais avançados e sua prevenção depende majoritariamente de uma detecção precoce das lesões pré-malignas. A mais recente medida preventiva ao câncer cervical adotada em diversos países é a vacinação contra o HPV16 e 18. Entretanto, para uma eficiente proteção ao câncer cervical associado ao HPV, essa vacina deve ser administrada em mulheres que ainda não tenham sido infectadas pelo vírus, uma vez que a vacina não exerce significativo efeito terapêutico. Devido à alta disseminação da infecção pelo HPV entre indivíduos sexualmente ativos, a proteção contra os cânceres associados ao HPV pela vacinação ainda é muito restrita. Portanto, a busca por estratégias terapêuticas, como proposto no presente estudo, constitui um esforço global de pesquisa acerca do HPV.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER CERVICAL

Em 1976, Zur Hausen detectou o DNA de papilomavírus humano em diversas amostras de verrugas genitais e cânceres cervicais (Zur Hausen 1976). Em seus trabalhos subsequentes o conjunto de dados gerados constituiu uma das associações mais bem estabelecidas entre uma infecção viral e a carcinogênese. Nas décadas seguintes, estudos implicariam em mais de 98% dos casos de câncer cervical com a infecção pelo HPV (Zehbe & Wilander, 1997; Walboomers et al. 1999; Schiffman et al. 2000).

O câncer cervical é o quarto tipo mais prevalente de câncer em mulheres no mundo todo, sendo também a quarta maior causa de mortes por câncer, com cerca de 604.000 casos e 342.000 mortes no ano de 2020. Porém, considerando-se apenas os países de baixo IDH, o câncer cervical alcança a segunda posição em prevalência e morte de mulheres (Sung et al. 2021). Adicionalmente, sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer cervical é o terceiro mais incidente em mulheres no Brasil, e o primeiro mais incidente na região Norte. Nas regiões Nordeste e Centro-oeste, ocupa a segunda posição mais frequente; enquanto na região Sul ocupa a quarta posição, e na Sudeste, a quinta, constituindo assim um grave problema de saúde pública em todo o país (INCA 2019).

Estudos epidemiológicos destacam que a infecção por algum tipo de HPV ocorre cedo, logo após as primeiras atividades sexuais (Winer et al. 2003). Previsões indicam que mais de 80% da população mundial irá contrair infecção anogenital por α -HPV pelo menos uma vez durante a vida, sendo que a faixa etária mais atingida é entre 20 e 25 anos nos países desenvolvidos (Hammer et al. 2016).

O risco de infecção é proporcional ao número de parceiros sexuais e pelo fato de as infecções quase sempre serem assintomáticas, os indivíduos contaminam seus parceiros inadvertidamente (Ho et al. 1998; Winer et al. 2003).

2.2 O PAPILOMAVÍRUS HUMANO

2.2.1 Estrutura e organização do genoma

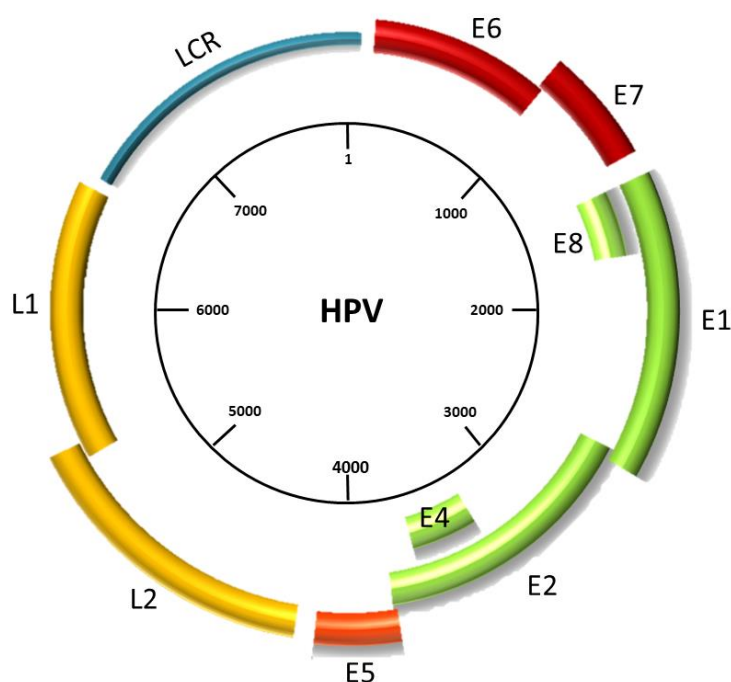
Os papilomavírus humano (HPVs) são vírus icosaédricos não envelopados, com genoma dupla fita de DNA circular com diâmetro de aproximadamente 55nm. Até o presente momento são conhecidos 226 tipos de HPV (Doorslaer and Dillner 2019) e cada genótipo difere um do outro em pelo menos 10% na sequência do gene L1, altamente conservado (Kocjan et al. 2015). Estes vírus podem causar infecções cutâneas e na mucosa epitelial que podem levar a lesões ou verrugas (Doorslaer and Dillner 2019).

Atualmente são definidos cinco grupos evolutivos de HPV (α , β , γ , μ , and ν). Destes, o maior grupo é constituído pelo grupo α (Doorslaer and Dillner 2019). Este grupo contém pelo menos 64 tipos de HPVs que infectam principalmente o epitélio de mucosas. Aproximadamente 40 destes HPVs podem infectar o trato anogenital e destes, pelo menos 14 tipos (HPVs 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 68, 73, 82) são classificados como HPVs de alto risco (*high risk HPV* ou hrHPV) (Graham, 2017), visto que podem causar neoplasias intraepiteliais de níveis progressivos, as quais podem progredir para o câncer invasivo (Graham, 2017). Os demais HPVs deste grupo são considerados HPVs de baixo risco (lrHPV – *low risk HPV*), o quais podem causar verrugas genitais ou hiperplasia epitelial focal oral (doença de Heck), dependendo do local da infecção. Dentre os lrHPVs, os tipos 6 e 11 são os mais prevalentes (Alemany et al. 2014; Serrano et al. 2015).

HPVs de alto risco são agentes causadores de aproximadamente 5,2% de todos os cânceres humanos no mundo. Incluindo quase todos os casos de cânceres cervicais, 90-93% dos cânceres anais, 12-63% de cânceres orofaríngeos, 40-64% dos cânceres vaginais, 40-51% dos cânceres vulvar e 36-40% de cânceres penianos (Chaturvedi 2010). Dentre os hrHPVs, os tipos 16 e 18 contribuem com 55% e 15% de todos os casos de câncer cervical, respectivamente. Os demais casos são distribuídos dentre os demais hrHPVs, sendo que dentre estes tipos menos prevalentes, os genótipos de maior incidência variam entre as diferentes populações (Stanley 2010).

O genoma viral pode ser dividido em três sessões funcionais: os genes E (*early* ou *precoce*), compostos por uma região codificante de pelo menos sete proteínas virais que desempenham funções regulatórias no epitélio infectado (E1, E2, E4, E5, E6, E7, E8); a região L (*late* ou *tardia*) que codifica as duas proteínas estruturais do vírus (L1 e L2) que formam o capsídeo e por fim, a região LCR (*Long control region*) contendo sítios regulatórios para o controle da replicação e transcrição dos genes virais (Graham, 2010) (**Figura 1**). A função resumida de cada gene viral se encontra no **quadro 1**.

Figura 1- Representação diagramática do genoma circular do HPV.



Fonte: A autora (2021). Os diferentes genomas possuem organização similar. As ORFs (*Open read frames* ou quadros abertos de leitura) são indicadas com arcos coloridos. L: genes tardios (*late*); E: genes precoces (*early*); LCR: região regulatória (*Long control region*).

Quadro 1- Relação sumarizada das proteínas de HPV e suas principais funções na célula hospedeira.

Proteína	Principais funções
E1	Replicação do DNA viral; possui função de helicase
E2	Ativador da replicação; regulador da transcrição viral (repressor de E6 e E7)
E4	Montagem e liberação da partícula viral
E5	Ativação do Fator de Crescimento Epidermal (EGF); dificulta a apresentação de antígenos via MHC
E6	Inativação do supressor tumoral p53 via degradação proteossomal
E7	Inativação do supressor tumoral pRB via degradação proteossomal
E8^E2	Resultado de processamento via <i>splicing</i> , Inibidor da transcrição e tradução dos genes virais
L1	Principal proteína do capsídeo
L2	Proteína interna do capsídeo

Fontes: Massimi et al. (2008); Moody & Laimins (2010); Dreer, van de Poel, & Stubenrauch (2016); Graham (2017); Songock, et al. (2017); Paolini et al. (2017); Estêvão, et al. (2019).

2.2.2 Mecanismo de infecção do vírus na célula hospedeira

Para o estabelecimento eficiente da infecção, os hrHPVs precisam infectar as células da camada basal, as quais se encontram em constante divisão celular (Pyeon et al. 2009). O acesso à essa camada basal de células se dá através de microabrasões no epitélio (Doorbar 2005). Adicionalmente, a infecção pode ocorrer na camada única de células localizada na junção escamocolunar entre a endo e a ectocervice denominada zona de transformação (Herfs et al. 2012).

O mecanismo exato de entrada do vírus na célula e alcance do núcleo pelo genoma ainda está sob debate, porém alguns estudos recentes apontam os receptores de heparan sulfato dos proteoglicanos (HSPG) como receptor primário para ligação inicial do vírus. Ao se ligar a esses receptores localizados na membrana basal ou na matriz extracelular, a proteína L1 do capsídeo viral sofre mudanças conformacionais expondo a região N-terminal da proteína capsidial L2 na superfície viral (Bienkowska-Haba et al. 2009; Aksoy et al. 2017). A proteína L2 por sua vez, sofre clivagem na região N-terminal mediada por furinas, o que leva à perda de afinidade da L2 pelo receptor HSPG permitindo o movimento do vírus para um complexo receptor (ainda desconhecido) promovendo a internalização do vírus provavelmente através de macropinocitose envolvendo actina (Day et al. 2008; Aksoy et al. 2017). Outra hipótese para a liberação do vírus da matriz extracelular para dentro do complexo de entrada na célula, envolve a clivagem do complexo receptor HSPG/L2 por metaloproteinases de matriz (MMPs) (Surviladze, Dziduszko, & Ozbun, 2012; Cerqueira et al. 2015).

No interior da célula, o vírus migra pelo citoplasma através da via endossomo/lisossomo, onde sofre a dissociação da proteína L1 devido às enzimas proteolíticas lisossomais, restando apenas a proteína L2 associada ao genoma viral

(Bienkowska-Haba et al. 2012; Gottschalk & Meneses, 2015). O complexo genoma viral/L2 por sua vez, alcança o Complexo de Golgi provavelmente através da interação da L2 com a proteína motora dineína através dos microtúbulos (Kamper et al. 2006), em seguida podendo entrar nas cisternas do Retículo Endoplasmático antes de alcançar o núcleo, durante o rompimento da membrana nuclear no decorrer da mitose (Aydin et al. 2014; Harden & Munger, 2017).

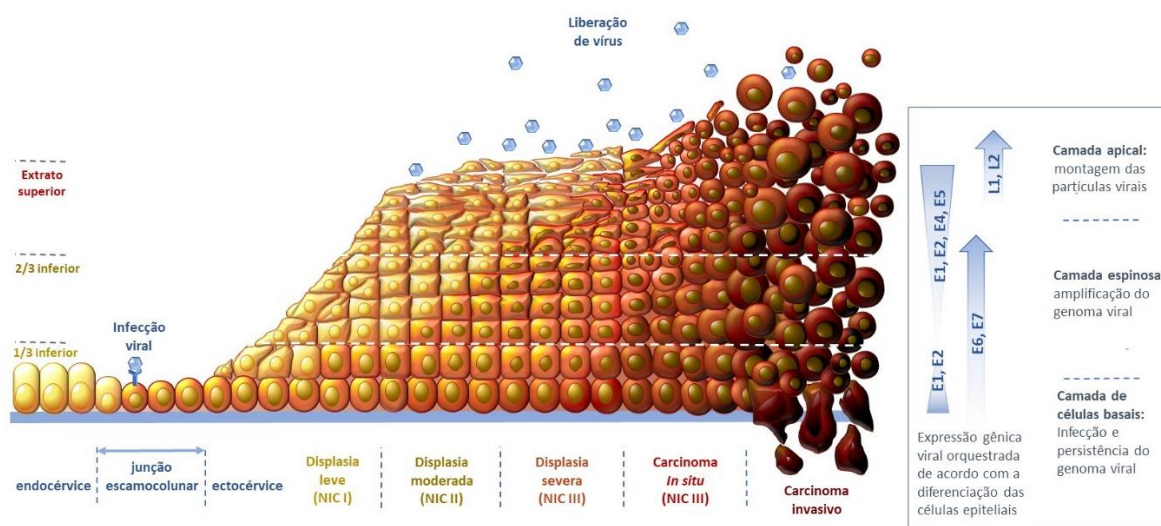
Assim que alcança o núcleo, a transcrição dos genes virais é iniciada. Em seguida, a proteína E2 se liga a proteína E1 na origem de replicação viral recrutando a maquinaria de replicação celular (Sanders and Stenlund 2000). Inicialmente, a replicação do genoma viral gera aproximadamente de 50 a 100 cópias episomais por núcleo, constituindo o início da manutenção do genoma viral nas células da camada basal. Ali, o genoma viral é replicado juntamente com o DNA celular e igualmente dividido entre as células filhas (Maglennon et al. 2011).

2.2.3 O Ciclo viral

Em um primeiro momento, as proteínas virais são expressas em baixos níveis evitando a ativação da resposta imune local (McBride 2013). Isto é possível devido à regulação negativa do gene E2 sobre o promotor dos genes E6 e E7. Desta forma, o HPV é capaz de manter uma infecção reprodutiva nas células epiteliais por um longo período de tempo, ao passo que evita a detecção pelo sistema imune. Enquanto isso, à medida que as células basais vão se diferenciando, migram para as camadas superiores do tecido, levando consigo as cópias do genoma viral. A evolução do vírus permitiu que este acoplasse seu ciclo de vida ao programa de diferenciação do epitélio através de uma refinada regulação da expressão gênica viral de acordo com a diferenciação do tecido (**Figura 2**). Um

exemplo disso é o fato de os genes tardios (L1 e L2), responsáveis pela formação do capsídeo viral, serem expressos nas camadas apicais do tecido, liberando as partículas virais juntamente com a descamação natural do tecido, evitando assim a necessidade de um ciclo lítico e, portanto, a detecção viral pelo sistema imune (Egawa et al. 2015; Westrich, Warren, & Pyeon, 2017).

Figura 2- Ciclo de vida e expressão gênica do HPV.



Fonte: A autora (2021). O ciclo viral acompanha a diferenciação dos queratinócitos. A figura exemplifica o ciclo viral e o surgimento e evolução da neoplasia no tecido devido à infecção viral persistente. O HPV pode se ligar à receptores diretamente na membrana basal (linha azul) através de micro abrasões no tecido (não mostrado) e continuar infectando as células basais do epitélio. Alternativamente, o vírus pode infectar as células basais localizadas na junção escamocolumnar. A diferenciação de células epiteliais basais infectadas pode dar origem à células diferenciadas repletas de cópias do genoma viral, visto que os principais oncogenes virais (E6 e E7) estimulam a divisão celular nessas células. Estas por sua vez, vão sendo transportadas para as camadas apicais do tecido, onde ocorre a expressão do capsídeo viral, montagem e liberação de novos vírus juntamente com a descamação normal do tecido.

Uma vez que o queratinócito diferenciado não sintetiza novas moléculas de DNA, as atividades das proteínas virais E5, E6 e E7 são especificamente adaptadas para prejudicar o programa normal de diferenciação desta célula, induzindo esta a iniciar novos ciclos celulares sucessivamente, conferindo assim vantagem para o vírus, visto que esses eventos aumentam a replicação do genoma viral de um baixo para um alto número de cópias por célula. Os eventos sucessivos incluem o agrupamento de células-filhas infectadas no tecido, estas por sua vez, se movem

lateralmente sobre a membrana basal ou mais adiante na camada celular espinosa, onde este subconjunto de queratinócitos aberrantes permanece em divisão celular amplificando o genoma viral (Egawa et al. 2015).

2.2.4 As oncoproteínas virais

E6 e E7 são as principais oncoproteínas virais de hrHPVs, atuando como proteínas multifuncionais (Martínez-Ramírez et al. 2018). Estas proteínas são responsáveis pela proliferação e sobrevivência celular, inibição da apoptose, instabilidade genômica e evasão da resposta imune do hospedeiro através das suas interações com um conjunto de proteínas-chave como o supressor tumoral p53 e a proteína do retinoblastoma (pRB), respectivamente (Yeo-Teh et al. 2018). Ambos os genes estão submetidos ao mesmo promotor e, portanto, possuem padrões semelhantes de expressão (Vande Pol & Klingelutz, 2013; Ann & Karl, 2013; Estêvão et al. 2019).

A oncoproteína E7 é considerada a principal proteína transformante de hrHPVs devido à sua interação com pelo menos 20 proteínas, incluindo importantes supressores tumorais como a pRB, além de diversos fatores de transcrição como STAT1, NF- κ B, c-Myc, E2F1 e E2F2 e CBP/p300 (Balsitis et al. 2005; Songock, et al. 2017; Martínez-Ramírez et al., 2018) e múltiplos elementos da maquinaria epigenética como a histona desacetilase 1 (HDAC1), a DNA metiltransferase 1 (DNMT1) e a histona metiltransferase EZH2 (Enhancer of zeste homolog 2). Desta forma, E7 possui potencial para provocar grandes alterações transcricionais em células infectadas levando à sua malignização. Talvez a função mais relevante da proteína E7 dos hrHPVs seja a sua habilidade em se ligar e promover a degradação proteossomal via ubiquitinação da proteína pRb, e supressão de outras proteínas

pocket como p107 e p130. Desta forma, o fator de transcrição E2F, na ausência do seu repressor pRB, fica livre para ativar a transcrição de genes como as ciclinas A e E, relacionadas ao avanço do ciclo celular da fase G1 para a fase S (Moody and Laimins 2010).

Em condições normais, a célula responde à eventos de proliferação não programada através da indução à apoptose. Porém, este evento é impedido pela proteína E6 de hrHPVs, visto que E6 interage com a ubiquitina ligase E6AP (*E6-associated protein*) levando o supressor tumoral p53 – um regulador-chave da apoptose – à degradação proteossomal, alterando assim todos os genes subordinados a este (Moody & Laimins, 2010; Vande Pol & Klingelutz, 2013; Martinez-Zapien et al. 2016). Além disso, a oncoproteína E6 possui um domínio de ligação ao motivo PDZ (*PDZ-binding motif*) e desta forma, é capaz de interagir com pelo menos outras 14 proteínas que contêm este motivo, o que na maioria dos casos as direciona à degradação proteossomal. A perda dessas proteínas resulta na alteração da morfologia celular, reorganização da rede de microfilamentos e perda das junções celulares, eventos associados à imortalização dos queratinócitos (Massimi et al. 2008; Yeo-Teh, Ito, & Jha, 2018).

2.2.5 A integração do genoma viral

A maioria das infecções por HPV são solucionadas pelo sistema imune do hospedeiro e, portanto, transitórias. Porém, em certos casos podem ocorrer mudanças ainda não completamente compreendidas no genoma viral, e/ou na célula hospedeira, tornando a infecção persistente, o que pode levar à progressão para o câncer (Walboomers et al. 1999). Um dos eventos chave nesse processo é a integração do genoma dos hrHPV no genoma do hospedeiro (Manawapat et al.

2012). Como mencionado anteriormente, os genes E1 e E2 são reguladores negativos da expressão dos principais oncogenes virais, desta forma, na ausência/redução drástica da expressão desses genes – como observado na forma integrada – ocorre o disparo da expressão dos genes E6 e E7 na célula, levando à progressão tumoral (Bechtold et al. 2003).

Os primeiros estudos realizados sobre a integração do genoma viral (El Awady et al. 1987) focaram principalmente nos genes E1 e E2 e, apesar das limitações tecnológicas da época, foram identificados sítios de quebra nesses genes como fator necessário à integração do genoma. Porém, recentes estudos, utilizando sequenciamentos massivos tem mostrado que a ruptura do gene E2 não é necessariamente requerida no processo de integração, já que foram identificados outros sítios de quebra ao longo do genoma do HPV, sugerindo assim que outros mecanismos regulatórios da expressão de E2 podem estar envolvidos no mecanismo de tumorigênese (Bhattacharjee & Sengupta, 2006; Ojesina et al. 2014; Hu et al. 2015; Oyervides-Muñoz et al. 2018).

A integração do genoma viral tem sido identificada no genoma do hospedeiro sob duas formas: cópia única ou múltiplas cópias repetidas em tandem (McBride and Warburton 2017). Sabe-se que o HPV pode utilizar a maquinaria de replicação e reparo da célula hospedeira para inserir seu genoma, porém o mecanismo exato de integração ainda é fonte de intensos debates. Neste sentido, uma das propostas sugere que a integração ocorra em regiões ricas em microhomologia; (Hu et al. 2015) entre os genomas do vírus e do hospedeiro.

2.2.6 Lesões provocadas por HPVs de alto risco

Estudos da história natural do HPV demonstram que a grande maioria das infecções é transiente. Um estudo demonstrou que aproximadamente 70% de mulheres jovens infectadas se tornaram HPV negativas após um ano, e após o segundo ano, 91% delas estavam livres da infecção, apresentando uma média de 8 meses de duração da infecção (Ho et al. 1998). Porém, uma pequena parte das infecções é persistente podendo levar a alterações no epitélio cervical, tais alterações podem ser detectadas no teste de Papanicolaou. Fatores associados com a infecção persistente de HPVs de alto risco incluem o início precoce das atividades sexuais, coinfeção com múltiplos tipos de HPVs, idade superior a 30 anos, multiparidade, imunossupressão, uso de contraceptivo oral e hábito de fumar (Castellsagué & Muñoz, 2003; Braaten & Laufer, 2008).

Quando diagnosticadas pelo teste histológico, as alterações no epitélio associadas ao HPV são denominadas neoplasias intraepiteliais cervicais (NICs). Estas são classificadas de I a III, dependendo da profundidade das células anormais presentes no tecido. A NIC I (ou lesão de baixo grau) inclui displasia suave com anormalidades do epitélio no 1/3 proximal da membrana basal. Enquanto isso, a NIC II (lesão de alto grau) envolve o avanço da displasia para os 2/3 proximais da membrana basal. E por último, a NIC III (lesão de alto grau) ou carcinoma *in situ*, na qual a anormalidade é observada em todas as camadas do epitélio, sem rompimento da membrana basal. Quando as alterações celulares se tornam mais severas e invadem a membrana basal, denomina-se carcinoma invasivo (Brasil, Secretaria de Atenção à Saúde, 2006).

As NICs causadas por HPVs de alto risco podem desaparecer sem tratamento, porém a taxa varia de acordo com a severidade da lesão. Cerca de

60% das NICs I regridem espontaneamente, enquanto isso, 10% destas podem progredir para NIC III, e apenas 1% progridem para o câncer invasivo. Já para as NICs III, aproximadamente um terço das lesões regridem, sendo a taxa de progressão para o câncer cervical maior que 12% se não tratadas (Ostör 1993).

2.3 VACINA DE DNA COMO ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA CONTRA O CÂNCER CERVICAL

Duas vacinas profiláticas baseadas em partículas semelhantes ao vírus (VLPs) estão comercialmente disponíveis: A Gardasil® (Villa et al. 2006) e a Cervarix® (Garland et al. 2007). A vacinação profilática contra o HPV foi implementada no mundo há 15 anos e ao longo desse tempo já é possível analisar o grande impacto no controle das infecções virais. Após 5-8 anos da vacinação, a prevalência de HPV 16/18 e NICs 2+ foi reduzida entre garotas de 13-19 anos de idade em 83% e 51%, respectivamente, com maior significância em países com maiores coberturas da vacina (Drolet et al. 2019). Esses dados refletem o impacto do desenvolvimento e implementação de novas tecnologias vacinais nos programas de saúde pública para profilaxia e combate ao câncer.

Os testes das vacinas profiláticas demonstraram uma excelente eficácia clínica nos indivíduos que nunca tinham sido expostos aos tipos virais vacinais. Entretanto, a eficácia da vacinação é muito baixa em mulheres com infecção prevalente por HPV (Paavonen et al. 2009), o que aponta para um baixo impacto no controle do câncer cervical pré-existente. Diante deste quadro é indispensável o desenvolvimento de estratégias terapêuticas no combate ao câncer cervical. No momento, o foco do combate ao câncer em mulheres já diagnosticadas com lesões consiste em aumentar as taxas de sobrevivência, principalmente por meio de

terapias direcionadas em combinação com a crioterapia, quimio-radiação padrão e histerectomia (del Campo et al. 2008).

A imunização mediada por DNA (imunização genética) começou nos anos 90, quando foi observado que um plasmídeo de DNA codificando uma nucleoproteína do vírus influenza conseguiu gerar uma resposta humoral e citotóxica específica protetiva (Yankauckas et al. 1993). Desde então, várias vacinas de DNA têm sido desenvolvidas para tratar uma grande variedade de patologias, incluindo alergias, doenças infecciosas, doenças autoimunes e câncer. As vacinas podem ser entregues por diferentes rotas, sendo as mais comuns a intramuscular (IM) e intradermal (ID) que resultam na transfecção direta de miócitos e queratinócitos, respectivamente, além de células apresentadoras de antígeno (APCs) especializadas (Shedlock and Weiner 2000; Lopes et al. 2019).

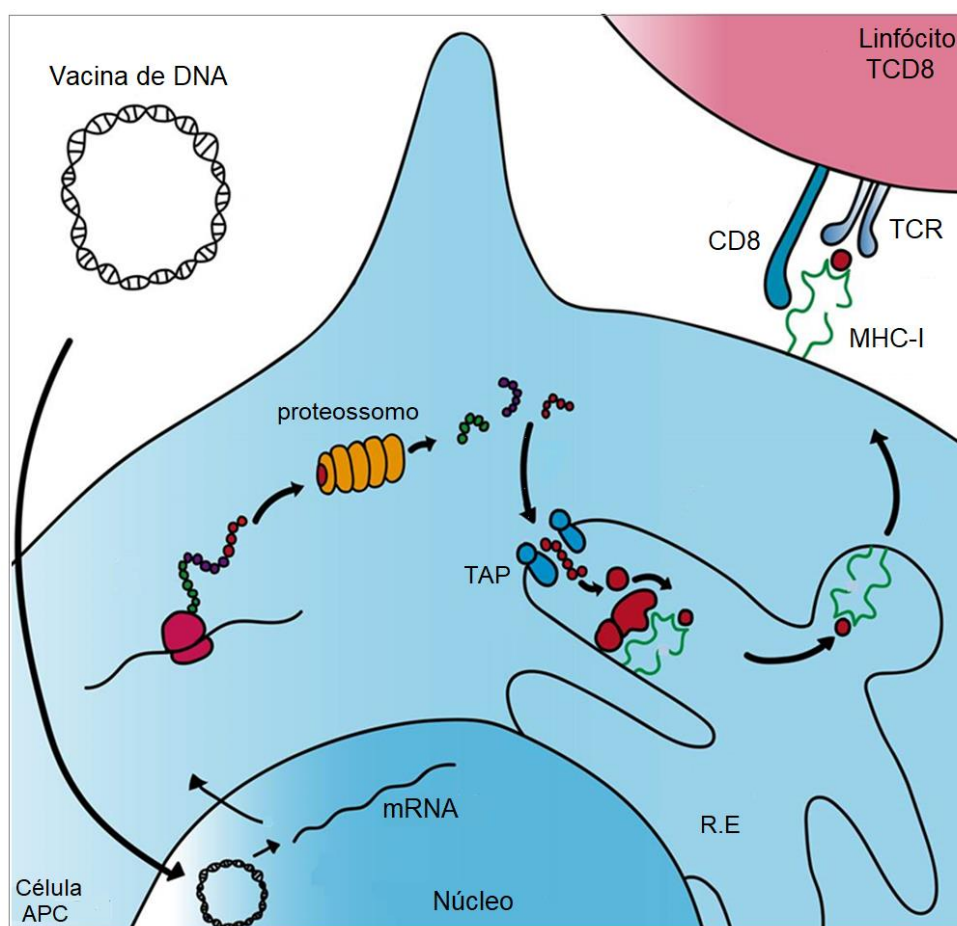
Para a efetiva entrega da vacina de DNA no núcleo da célula, é necessário romper as barreiras extra e intracelular, para isso, as estratégias de entrega mais comumente utilizadas são os métodos físicos como a eletroporação (EP) (Lambricht et al. 2016), a “tatuagem” de DNA (ou *DNA tattooing*) (van den Berg et al. 2014) e a biobalística (*gene gun*) (Bergmann-Leitner and Leitner 2015). Tais métodos além de entregar eficientemente a vacina, contribuem para a geração de uma pequena resposta inflamatória local com infiltração de células do sistema imune favorecendo a captação do antígeno vacinal por APCs.

Dentre estes métodos de entrega do plasmídeo vacinal, destaca-se a eletroporação *in vivo* (Lambricht et al. 2016), no qual a aplicação de pulsos elétricos desestabiliza a membrana plasmática, originando temporariamente poros hidrofílicos nesta, o que permite a passagem direta do DNA para o citoplasma célula (Wagner et al. 2004). O DNA injetado, obedecendo a um efeito eletroforético,

se movimenta através desses poros chegando ao núcleo, o que aumenta eficientemente a transfecção celular (Pavšelj and Prémat 2005). A rápida e eficiente captação do plasmídeo vacinal pelas células alvo é um fator importante, visto que Cappelletti e colaboradores (2003) demonstraram que grande parte do DNA injetado é degradado quatro horas após a inoculação, neste sentido, a EP contribui com o aumento da eficiência da imunização ao viabilizar a maior captação plasmidial pelas células do tecido.

Ao chegar no núcleo, o plasmídeo vacinal – codificando o antígeno de interesse – é transcrito, e em seguida traduzido no citoplasma da célula utilizando a maquinaria traducional do hospedeiro (**Figura 3**). A proteína vacinal, contendo os epítomos íntegros segue então para o processamento pela via de reconhecimento antigênico do MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade) e é apresentada para reconhecimento pelo sistema imunológico. Uma grande vantagem das vacinas de DNA é que elas podem ser codificadas para antígenos processados pela via MHC classe I e II, desta forma ativando ambas as respostas T CD8 e T CD4, respectivamente, promovendo assim uma resposta imune humoral (efeito da apresentação cruzada) e celular, esta última, tão necessária para o sucesso de uma terapia (Dunham 2002).

Figura 3- Mecanismo de processamento e apresentação de uma vacina de DNA via MHC-I.



Fonte: modificado de Cordeiro et al. (2018). Inicialmente o plasmídeo vacinal é captado pela célula. Neste caso, uma APC. Ao chegar ao núcleo, o plasmídeo é transcrito em mRNA e exportado para tradução do peptídeo vacinal no citoplasma. Antes de ser ligado a uma molécula do MHC no Retículo Endoplasmático (R.E), o peptídeo precisa ser processado no proteossomo, onde é clivado em peptídeos menores e introduzido no R.E via transportador TAP. Ao chegar no R.E, chaperonas acessórias fazem a ligação do peptídeo na molécula do MHC-I e o complexo MHC-I/peptídeo segue – através de transporte vesicular – para o Complexo de Golgi (não mostrado). O tráfego vesicular do complexo MHC-I/peptídeo vacinal continua a partir do Golgi, até finalmente ser apresentado na superfície celular, onde o complexo poderá ser reconhecido por um TCR específico de um linfócito citotóxico (T CD8), ativando esta célula. Um estímulo forte o suficiente, leva o linfócito T CD8 à maturação, produção de citocinas efetoras contra células produtoras do antígeno específico (neste caso, a célula tumoral) e expansão clonal com geração de células T de memória.

2.3.1 A oncoproteína E7 como antígeno vacinal

Como mencionado anteriormente, as atividades de duas proteínas virais produzidas por HPV de alto risco são apontadas como as principais mediadoras da carcinogênese. Pelo fato de a oncoproteína E7 atuar nas fases iniciais e avançadas da transformação de queratinócitos e no desenvolvimento de lesões cervicais

malignas, uma resposta imune elicitada contra epítomos imunogênicos dessa proteína deve erradicar as células tumorais eficientemente. Estudos pré-clínicos recentes sugerem antígenos virais baseados em E6 e E7, administrados através de imunização genética, como terapia anticânceres induzidos por HPV (Peng et al. 2004; Lopes et al. 2019).

Alguns testes clínicos começam a demonstrar os potenciais benefícios de vacinas de DNA contra lesões relacionadas ao HPV (Lopes et al. 2019). Tais estudos visaram principalmente avaliar a segurança e a resposta imunológica dessas vacinas. Dentre os ensaios para o câncer cervical com abordagem terapêutica, dois estudos já publicaram seus resultados até o momento.

O estudo clínico de fase IIb (NCT01304524) demonstrou a segurança e eficácia da vacina VGX-3100 codificando peptídeos baseados nos genes E6 e E7 de HPV-16 e 18 em pacientes com NICs II e III (Trimble et al. 2015). Neste estudo, 107 pacientes receberam 3 doses da vacina via injeção intramuscular seguida de eletroporação e 42 receberam o placebo. Os resultados histopatológicos demonstraram a regressão das lesões em 49.5% dos pacientes (n= 53) e a regressão espontânea das lesões em 30.6% (n=11) dos placebos. A vacina foi bem tolerada e após imunização não foram verificados efeitos colaterais graves, sendo que alguns pacientes registraram apenas reações leves no local da injeção, fadiga, náusea e mal-estar em geral. A análise imunológica demonstrou a ativação específica de linfócitos T CD8 significativamente maior nos pacientes vacinados, além de uma maior resposta humoral comparado ao placebo, tornando-se a primeira vacina terapêutica a provocar uma resposta imune adaptativa completa em pacientes com doença cervical pré-invasiva causada por HPV 16 e 18 (Trimble

et al. 2015). Dois ensaios clínicos de fase III (NCT03185013 e NCT03721978) usando a VGX-3100 estão em andamento no momento.

O estudo clínico (NCT01634503) de outra vacina de DNA, a GX-188E (Kim et al. 2014) que codifica epítomos imunogênicos de E6 e E7 de HPV-16 e 18, testou 3 doses vacinais via intramuscular seguido de eletroporação em 9 pacientes com NICs II e III. Destes, 8 dos 9 dos pacientes exibiram uma resposta polifuncional de células CD8 reativas específicas, e 7 dos 9 dos pacientes apresentaram uma regressão completa da lesão, com ausência do vírus após 36 semanas de acompanhamento. A administração dessa vacina também não provocou eventos efeitos colaterais graves, sendo considerada segura e bem tolerada.

Nezafat et al. (2014) utilizaram ferramentas de bioinformática a fim de desenhar uma vacina de DNA multiepítopo terapêutica. Dentre os antígenos componentes da vacina, estão epítomos oriundos da proteína E7 de HPV, preditos como ligantes para moléculas de MHC-I, resultando assim, na ativação de linfócitos T CD8 com resposta citotóxica (Nezafat et al. 2015). Assim como no estudo de Nezafat et al. (2014), neste estudo, utilizamos o servidor *Immune Epitope Database* (IEDB) (Vita et al. 2019) para predição de epítomos imunogênicos baseados no oncogene E7 de HPV-16 para desenvolvimento de uma construção vacinal multiepítopo antitumoral.

2.3.2 Imunomoduladores e estratégias para o aprimoramento de construções vacinais

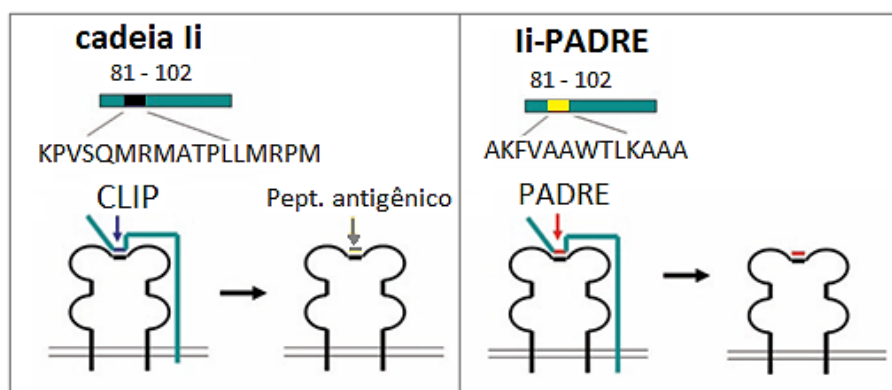
A maioria dos estudos reconhece a necessidade de incrementar a resposta imune elicitada por vacinas de DNA, através de associação a algum imunomodulador, adjuvante molecular ou terapia auxiliar. Os adjuvantes são

elementos essenciais para a administração de muitas vacinas, principalmente as de DNA, já que os vetores codificantes de DNA naturalmente possuem baixa imunogenicidade, especialmente em primatas superiores e humanos (Coban et al. 2011). A adição de adjuvantes a vacinas pode reduzir a quantidade de antígeno e o número de imunizações necessárias para se atingir a resposta imune desejada (Dubensky and Reed 2010) já que eles aumentam em grande parte a magnitude e a qualidade das respostas imunes específicas para o antígeno coadministrado (Degen et al. 2003). Além disso, estratégias para elicitar uma resposta imune celular mais eficiente incluem a indução simultânea de células T CD8 e CD4, explorando assim ambas as vias de processamento do antígeno (MHC-I e MHC-II) (Ji et al. 1999).

Diversos adjuvantes têm sido testados a fim de promover o aumento da resposta imune. Um potente imunomodulador descrito é o epítopo *pan* reativo HLA-DR para células T CD4, conhecido como PADRE. Este consiste em um epítopo promíscuo de alta afinidade de ligação a moléculas MHC-II para ativação de células T CD4 *helper*, em certos casos chegando a estimular esses linfócitos 1000 vezes mais eficientemente do que epítopos naturais comuns (Alexander et al. 1994). Esses linfócitos são capazes de ativar células dendríticas (DCs) através de vias de sinalização coestimulatórias, contribuindo para a geração de células T de memória (Castellino and Germain 2006).

O estudo de Hung et al. (2007) adotou a construção de um plasmídeo pVAX contendo a sequência PADRE em substituição à sequência CLIP do gene da cadeia I α , obtendo-se assim, um potente imunoestimulador conhecido como I α -PADRE (**Figura 4**). Neste estudo, foi verificada uma potente resposta imune elicitada por linfócitos T CD8, levando ao aumento da resposta antitumoral vacina específica.

Figura 4- Diagrama esquemático da cadeia invariante (Ii) e da quimera Ii-Pan HLA-DR reactive epitope (PADRE).



Fonte: Adaptado de Hung et al. (2007).

Como estratégia para o melhoramento da apresentação dos antígenos via MHC-I e II, é possível a utilização de sequências *linkers* espaçando os epítomos na construção vacinal. Dois motivos, HEYGAEALERAG e AAY, são utilizados como *linkers* para epítomos para ativação de linfócitos T citotóxicos. O primeiro motivo fornece alvos específicos de clivagem tanto para a via de degradação proteolítica lisossomal como proteossomal. Os doze resíduos peptídicos consistem em todos os cinco sítios de clivagem apropriados (A7-L8, A5-E6, Y3-G4, R10-A11 e L8-E9), os quais são específicos para complexos proteossomais de eucariotos (Dolenc et al. 1998). O segundo motivo (AAY) também aumenta a eficiência de apresentação, visto que depois da clivagem após este motivo, o C-terminal gerado no epítopo é um sítio adequado à ligação ao transportador TAP ou outras chaperonas (Bergmann et al. 1996). Epítomos de ligação ao transportador TAP tem papel central na apresentação de epítomos (Uebel et al. 1997).

Além das características citadas anteriormente, é ideal que os produtos dos genes das construções tenham um tamanho razoavelmente grande, já que peptídeos menores que 30 aminoácidos podem ligar diretamente a moléculas MHC-I ou MHC-II em células apresentadoras de antígenos não profissionais, o que potencialmente estimula a tolerância e anergia (Melief and van der Burg 2008). A

construção multiepítipo do presente estudo é constituída por 115 aminoácidos, o que consiste em um comprimento aceitável para vacinas anticâncer. Mais informações sobre estratégias utilizadas atualmente nos estudos de desenvolvimento de vacinas terapêuticas e adjuvantes vacinais podem ser encontradas em nosso artigo de revisão (**Apêndice B**) (Cordeiro et al. 2018).

Embora seja um grave problema de saúde pública, o câncer cervical ainda carece de opções terapêuticas menos invasivas e debilitantes e sua prevenção depende majoritariamente de uma detecção precoce das lesões pré-malignas. Ainda que sejam promissoras, nenhuma vacina de DNA terapêutica contra lesões associadas ao HPV se encontra licenciada, o que reforça a necessidade de estudos pré-clínicos que potencializem a eficiência em elicitar uma resposta imune adequada contra a proteína E7, fornecendo estratégias inovadoras no combate às neoplasias cervicais. A pesquisa aqui proposta contribui com a busca pelo aumento da qualidade e sobrevida de pacientes com lesões provocadas por HPV, através do desenvolvimento de estratégias terapêuticas voltadas para o controle de uma doença de difícil manejo, provocada por um vírus altamente disseminado na população.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver estratégias terapêuticas contra lesões associadas à infecção pelo HPV-16 em modelo pré-clínico.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir plasmídeos, antígenos de HPV e imunomodulador adjuvante em sistema bacteriano para imunoterapia contra o HPV-16;
- Avaliar em ensaio pré-clínico uma construção antigênica para imunização genética com epítomos ligantes de MHC-I preditos *in sílico* baseados no oncogene E7 de HPV-16, através da análise de expressão de citocinas no microambiente tumoral e no soro dos animais, além da análise histopatológica dos tumores;
- Explorar a potência do imunomodulador li-PADRE, para a indução de resposta T CD4 *helper*, combinado com a adição das sequências *linkers* HEYGAEALERAG e AAY, objetivando o aumento da apresentação dos antígenos pelo sistema imune.

4 METODOLOGIA

4.1 GENES

Genes sintéticos otimizados para expressão em células de mamífero foram adquiridos (GenScript) como antígenos propostos para cada estratégia vacinal. A construção vacinal multiepítopo é composta por sequências duplicadas para três epítomos preditos mais imunogênicos pelo banco de dados IEDB – ligantes de MHC-I, alelo H-2-Db – para ativação de linfócitos T citotóxicos presentes na oncoproteína E7 do HPV-16. A sequência dos epítomos presentes nas construções multiepítopo e do PADRE estão representados no **Quadro 2**.

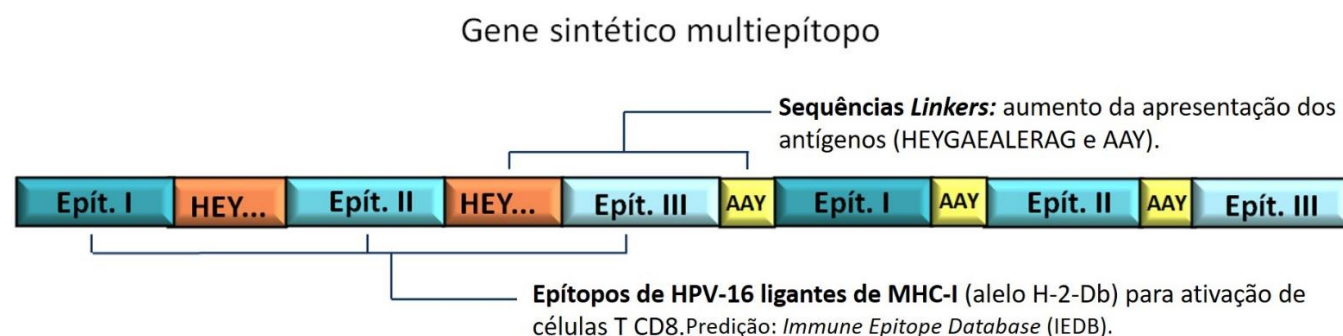
O gene multiepítopo foi intercalado por sequências *linkers* para sítios de clivagem proteossomal e lisossomal (HEYGAEALERAG e AAY) (Bergmann et al., 1996; Dolenc et al., 1998; Nezafat et al., 2014) como abordagem para aumento da apresentação via MHC. A duplicidade de cada epítopo foi arranjado de tal forma para que cada réplica pudesse ser circundada por um ou outro sítio de clivagem nas extremidades, consistindo na tentativa de aumentar a apresentação de cada epítopo pelo melhor processamento possível. Além disso, a sequência viral original dos epítomos foi otimizada para expressão em *Mus Musculus* permitindo aumentar a produção de proteína e, conseqüentemente, a imunogenicidade vacinal. Em relação a isso, vacinas anticâncer otimizadas demonstraram uma boa eficiência em diferentes modelos pré-clínicos (Lopes et al. 2017). O esquema da construção vacinal do gene E7 está ilustrado na **Figura 5**.

Quadro 2- Descrição dos epítomos ligantes de MHC-I preditos pela ferramenta IEDB utilizados neste estudo.

Gene	Epítopo I	Epítopo II	Epítopo III	Tamanho da construção (em pb)
E7 HPV-16 multiepítopo	QAEPDRAHYNIVT (44-56)	STLRVCVQSTHVDI (63-76)	VDIRTLEDLLMGTL (74-87)	372
PADRE	AKFVAAWTLKAAA	—	—	849

Fonte: A autora (2021).

Figura 5- Esquema ilustrativo do gene sintético multiepítopo para o antígeno E7 de HPV-16.



Fonte: A autora (2021).

Como no estudo de (Hung et al. 2007), nosso estudo também utilizou um plasmídeo contendo o imunodulador li-PADRE, visando elicitar a resposta imune de linfócitos T CD4 *helper*. Detalhes das sequências de cada construção, bem como de seus respectivos peptídeos, estão explicitadas no **Apêndice A**.

4.2 CLONAGEM E OBTENÇÃO DOS PLASMÍDEOS VACINAIS

Os genes de interesse foram adquiridos e propagados em plasmídeo pUC57 através de cultura de *Escherichia coli* TOP10 quimiocompetente. Para a transformação bacteriana, aproximadamente 100ng de DNA foram adicionados a 50μL de bactérias quimiocompetentes previamente tratadas com Cloreto de Cálcio (CaCl₂). Durante o

processo de transformação foi seguido o seguinte protocolo: Foram adicionadas a 50µL de células competentes a um volume de 10µL de DNA, seguido de incubação em gelo durante 20 a 30 minutos. Em seguida, elevou-se a temperatura a 42°C em termobloco por 5 minutos e novo resfriamento em gelo por 5 minutos. Adicionou-se 800µL de meio de cultura Luria-Bertani (LB) e incubou-se em estufa a 37°C por 1 hora. Posteriormente, centrifugou-se a cultura a 1200 rpm por 10 minutos, e descartou-se 600µL do sobrenadante. A cultura remanescente (200µL) foi utilizada para semeio em placa de Petri contendo meio de cultura LB sólido e antibiótico, seguido de crescimento *overnight* a 37°C. As colônias obtidas foram repicadas em nova placa para triagem dos clones. Após confirmados, os clones foram preservados (500µL de Glicerol 100% + 500µL de cultura) a -70°C.

Durante o processo de clonagem, os genes de interesse foram retirados do vetor comercial pUC57 e subclonados no vetor específico para expressão em célula de mamífero (pVAX). Para isto, o DNA das colônias foi extraído utilizando-se kit comercial de mini extração plasmidial (*KitYield™ Plasmid Miniprep System*) e submetido a digestão enzimática pelas enzimas de restrição BamHI e XbaI (Thermo Scientific™) de acordo com as recomendações do fabricante. Os genes de interesse foram então separados do vetor pUC57 através de eletroforese em gel de agarose a 1% e os recortes do gel foram purificados através de kit de purificação de DNA comercial (*kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System™* - Promega®) e subclonados, por meio de reação de ligação (*T4 DNA ligase* - Invitrogen™) no plasmídeo vacinal (pVAX) previamente digerido pelas enzimas correspondentes. Os clones foram selecionados utilizando-se o antibiótico de resistência contido nos diferentes vetores: ampicilina (100 µg/ml) para o vetor pUC57 e canamicina (50 µg/ml) para o vetor pVAX. Desta forma, para a obtenção das vacinas de DNA, cada

inserto (multi E7 e li-PADRE) foi inserido no vetor de expressão pVAX (Invitrogen™) em orientação para os sítios de clonagem BamHI-XbaI.

Todos os plasmídeos foram confirmados quanto à integridade das sequências através de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), clivagem com enzimas de restrição e sequenciamento de DNA dos clones. Para a análise do sequenciamento, foram utilizados os programas Pregap4 (pacote Staden V. 1.5) e Bio Edit V. 7.1.

4.3 MODELO DE DESAFIO TUMORAL

Como modelo de desafio tumoral para os ensaios pré-clínicos de imunoterapia anti-HPV, foi utilizada a linhagem tumoral C3, uma linhagem de células tumorais portadoras de mutação no gene *ras*, bem estabelecida para investigação pré-clínica do câncer cervical. A linhagem C3 é singênica ao camundongo C57BL/6 e derivada da linhagem embrionária murina B6 (B6mec), com a vantagem de que a primeira foi transfectada com o genoma completo do HPV-16 (Feltkamp et al. 1993), com expressão de todos os genes virais sob o domínio do próprio promotor viral (baixa expressão dos genes), mimetizando melhor um tumor originado através de uma infecção natural. Esse modelo indicou ser adequado para testes em camundongos *C57BL* imunizados com plasmídeos codificantes da proteína E5 de HPV16 (Paolini et al. 2017). Tais dados foram obtidos pelo nosso grupo em um estudo prévio em parceria com o Laboratório de Virologia do *Istituto Nazionale Tumori Regina Elena* em Roma.

As células de desafio tumoral foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino a temperatura de 37°C e 5% de CO². Antes do inóculo, as células C3 foram submetidas a tripsinização, seguido de duas lavagens com tampão PBS 1x e ressuspensas em solução salina para contagem

em câmara de Neubauer, seguido do preparo da solução para inoculação nos animais.

4.4 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTITUMORAIS INDUZIDOS PELOS CANDIDATOS VACINAIS

Para a realização desse experimento, grupos de camundongos *C57 black* (C57BL/6) fêmeas com 12 semanas de idade foram mantidos sob condições livres de agentes patogênicos no biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). É importante salientar que todos os procedimentos envolvendo experimentação animal foram executados estritamente de acordo com as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética para Utilização de Animais da instituição (processo n.002/20019) (**Anexo A**).

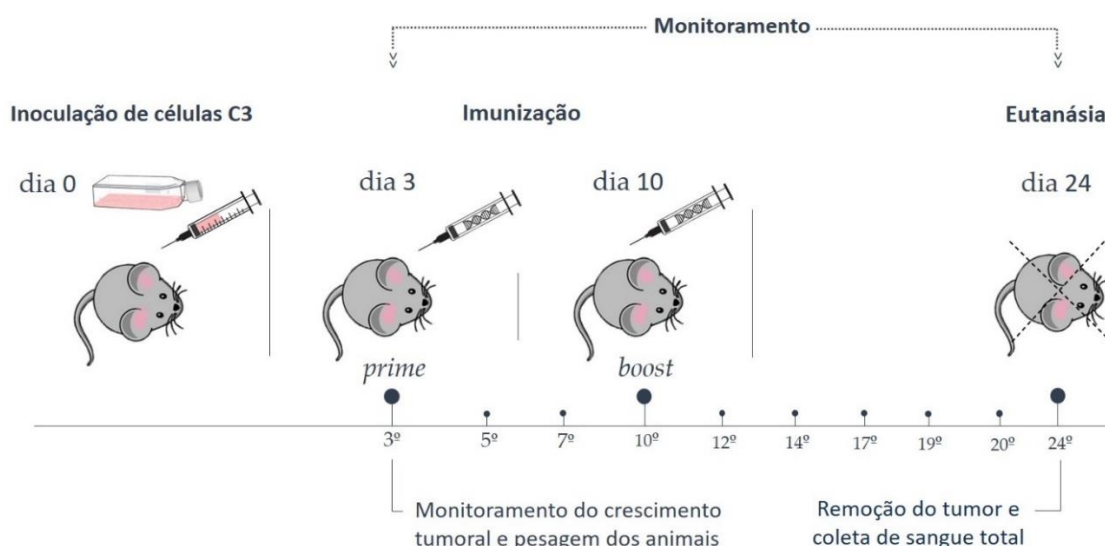
Para este ensaio, os animais previamente anestesiados com uma solução de cloridrato de xilazina (10mg/kg) e cetamina (115mg/kg) foram inoculados subcutaneamente com 5×10^5 células C3 eluídas em 50µL de meio DMEM na região dorsal previamente tricotomizada com o auxílio de aparelho elétrico de tosa de baixo ruído. Este último procedimento foi realizado para melhor palpação e mensuração do tumor nos dias seguintes.

Três dias após o desafio, os camundongos previamente anestesiados foram imunizados pela via intramuscular no músculo tibial da perna esquerda previamente tricotomizada. A remoção prévia dos pelos da área foi realizada a fim de permitir a passagem dos pulsos elétricos durante a eletroporação. A dose vacinal foi composta de 50µg de DNA eluído em soro fisiológico, seguida imediatamente por eletroporação *in vivo*. A eletroporação foi realizada com o equipamento Electro Square Porador TM (BTX [®] – ECM 830) através de eletrodo de pinças de 7mm do

mesmo fabricante (modelo 45-0488) em 3 posições – longitudinal, transversal e oblíquo – contando com um pulso de 100V de 50ms de duração em cada posição, totalizando assim 3 pulsos.

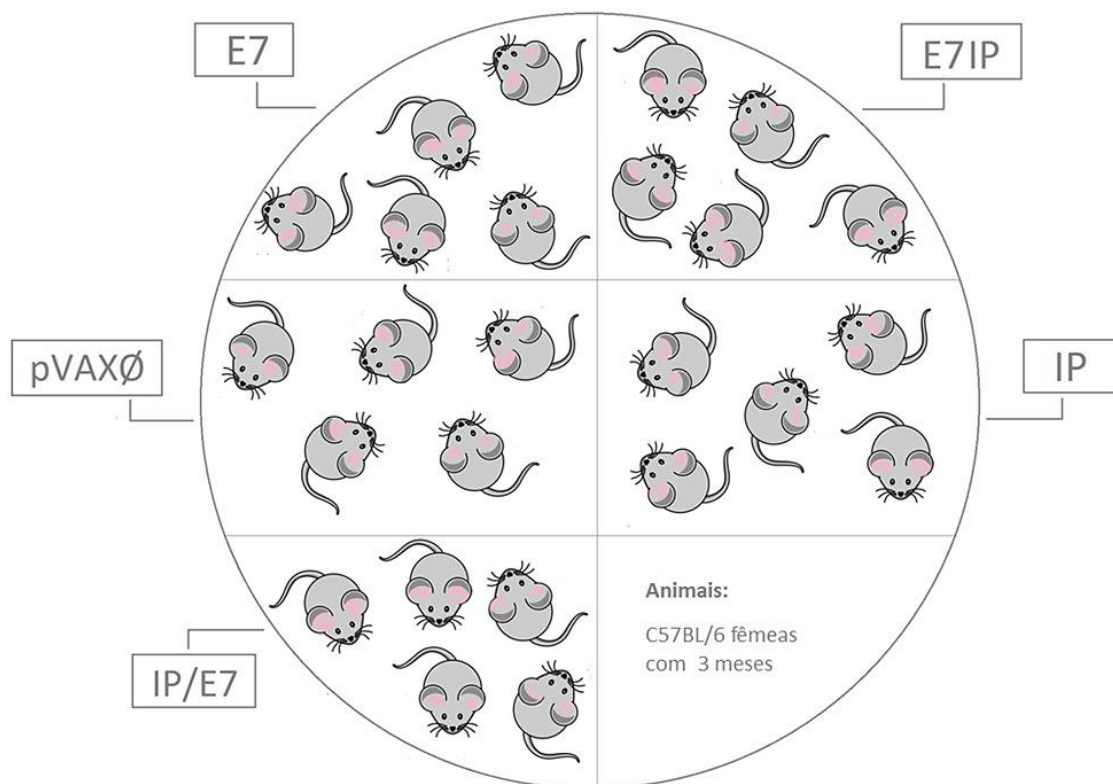
O processo de imunização obedeceu a regimes de *prime-boost* homólogo, contando com duas doses de 50µg de DNA vacinal. Cada dose foi eluída em 30µL de soro fisiológico e o intervalo entre as doses foi de uma semana (**Figura 6**). A imunização genética consistiu na administração no candidato vacinal pVAX-MultiE7, em associação ou não com o plasmídeo imunomodulador pVAX-li-PADRE. Como grupo controle, foram utilizados animais vacinados apenas com o plasmídeo pVAXØ (pVAXØ). Os demais grupos foram compostos por animais imunizados com: plasmídeo pVAX contendo a construção multiepítopo E7 (E7); plasmídeo pVAX contendo o adjuvante li-PADRE (IP); coadministração dos plasmídeos pVAX E7 e pVAX li-PADRE (E7IP); administração do plasmídeo pVAX li-PADRE no *prime* e do pVAX E7 no *boost* (IP/E7). A representação esquemática dos grupos deste estudo se encontra na **Figura 7**.

Figura 6- Esquema do ensaio de eficiência terapêutica das propostas vacinais.



Fonte: A autora (2021).

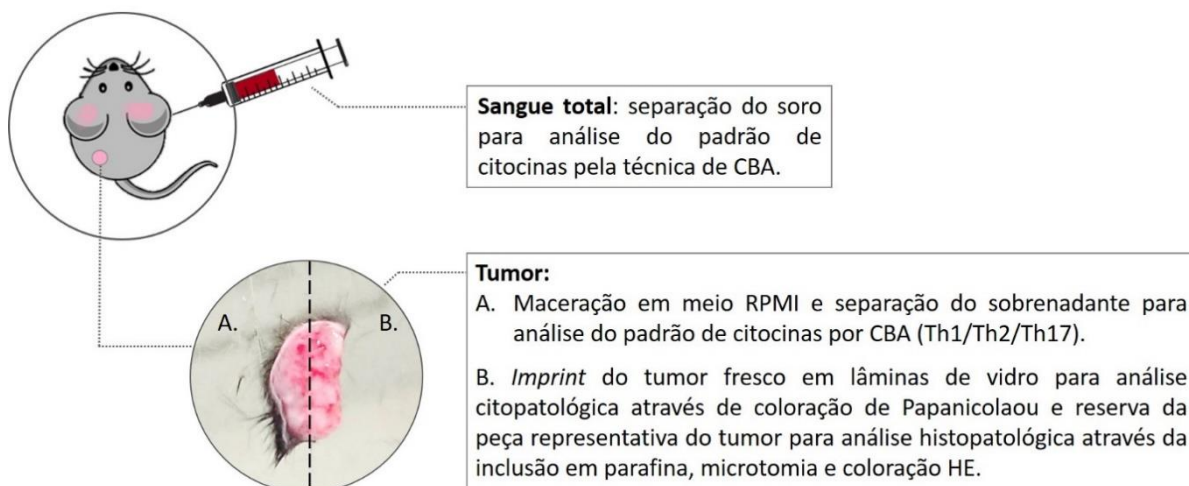
Figura 7- Descrição dos diferentes grupos estudados.



Fonte: A autora (2021). **pVAXØ**: plasmídeo pVAX vazio; **E7**: plasmídeo pVAX contendo a construção multiepítopo baseada no gene E7 de HPV-16; **IP**: plasmídeo pVAX contendo o adjuvante li-PADRE; **E7IP**: coadministração dos plasmídeos pVAX E7 e pVAX li-PADRE; **IP/E7**: administração do plasmídeo pVAX li-PADRE no *prime* e do pVAX E7 no *boost*.

A partir do 3º dia de experimento, três vezes por semana foram realizadas a mensuração do crescimento tumoral e pesagem dos animais a fim de detectar eventual perda de peso provocada por estresse ou pela presença dos tumores. A eutanásia foi realizada no 24º dia de experimento, quando ao menos um tumor (dentre todos os tumores) atingiu 2cm de diâmetro. Esta foi realizada a partir da coleta de sangue periférico total através de punção cardíaca nos animais previamente anestesiados, seguido da extração, secção, processamento e/ou conservação dos tumores. Cada tipo de amostra foi processado para uma análise específica, conforme descrito na **Figura 8**. As diferentes metodologias serão abordadas nos subtópicos seguintes.

Figura 8- Representação esquemática das diferentes amostras biológicas coletadas dos animais e seus respectivos processamentos.



Fonte: A autora (2021).

4.5 MONITORAMENTO DO CRESCIMENTO TUMORAL

Como mencionado no tópico anterior, a mensuração do crescimento tumoral e pesagem dos animais foram realizadas a partir do 3º dia de experimento, três vezes por semana até o momento da eutanásia no 24º dia. Em seguida, os tumores dos diferentes grupos estudados foram coletados, mensurados e pesados em balança analítica.

Para a mensuração dos tumores foi utilizado um caliper analógico e a pesagem dos animais ocorreu em balança digital de precisão. O cálculo do volume tumoral foi realizado através da fórmula: menor comprimento² (cm) x maior comprimento (cm) x 0,52. Já para o cálculo da densidade tumoral foi utilizada a fórmula: peso do tumor (g)/ volume tumoral (cm³).

4.6 INVESTIGAÇÃO DE CITOCINAS PRODUZIDAS

Após remoção, pesagem e secção longitudinal dos tumores, uma parte da amostra foi imediatamente armazenada em 1mL de meio DMEM, seguido de maceração em douncer de vidro. O sobrenadante resultante da centrifugação de cada amostra foi analisado quanto ao perfil de citocinas expressado pelos camundongos nos diferentes grupos vacinais. Para isto, foi utilizado um kit para ensaio CBA (*Cytometric Bead Array*) (BD™ CBA Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit), o qual inclui a análise das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN- γ e TNF- α .

A técnica de CBA consiste, resumidamente, na quantificação das diferentes citocinas na amostra a partir do emprego de microesferas de poliestireno conjugadas a anticorpos específicos para cada citocina. Tais esferas possuem tamanhos e intensidade de fluorescência diferentes para serem prontamente reconhecidas durante a citometria de fluxo. O reagente de detecção deste kit consiste em anticorpos conjugados a ficoeritrina (PE) que, ao se ligar ao complexo microesferas/analitos, fornecem um sinal de fluorescência correspondente a quantidade de cada citocina na amostra.

As amostras foram processadas de acordo com as recomendações do fabricante e analisadas em citômetro de fluxo (BD FACSCalibur™). Os dados resultantes foram analisados a partir da plataforma FACSVerse e processados através do software BD FACSuite®.

4.7 ANÁLISE CITOPATOLÓGICA DO TUMOR PELO MÉTODO DE *IMPRINT* TUMORAL

Imediatamente após a coleta e secção do tumor, foi realizado o imprint deste em lâmina de vidro como forma de análise preliminar à histopatologia, através do

método de Papanicolaou. Esta técnica permite a verificação da presença de células neoplásicas e infiltrados celulares, complementando assim as análises histopatológicas. Para isto, a amostra foi fixada em etanol 100% até o momento da coloração conforme descrito a seguir: A lâmina foi mergulhada 10 vezes em soluções de etanol 100%, etanol 95%, etanol 70% e água destilada; seguido de dois mergulhos em hematoxilina e incubação por dois minutos na mesma solução; 10 mergulhos em soluções de água destilada, etanol 70%, etanol 95% e etanol 100%; dois mergulhos em Orange G6, seguido de incubação por um minuto e 30 segundos na mesma solução; 10 mergulhos em duas soluções de etanol 100% (etanol 100% I e II); dois mergulhos em Eosina 65, seguido de incubação por dois minutos na mesma solução, finalizando com 10 mergulhos em duas soluções de etanol 100% (etanol 100% I e II). Após secagem, foi realizada a montagem com lamínula utilizando resina sintética (Entellan/Merck®) e análise em sistema de microscopia automática ZEN blue edition Axio zeiss®.

4.8 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO TUMOR

A análise histopatológica dos tumores de camundongos foi realizada a fim de caracterizar melhor essas amostras segundo a presença de um padrão na forma e tamanho das células e seus núcleos (pleomorfismo), eventos fibróticos, necróticos, celularidade e presença de fibroblastos e infiltrado de linfócitos. Neste sentido, a coloração com HE, é bastante utilizada, na qual a hematoxilina é um corante básico de cor azul-púrpura que, por ter afinidade por substâncias ácidas, cora o núcleo das células. Já a eosina é um corante ácido que destaca, por sua vez, o citoplasma na cor avermelhada, permitindo, desta forma, identificar a presença de parâmetros

importantes na patologia de tumores, especialmente pleomorfismos nucleares e celulares, presença de linfócitos infiltrados, dentre outros.

O preparo das amostras para esta análise iniciou-se com a fixação da amostra tumoral em formalina tamponada a 10% durante 24 horas, seguido de quatro lavagens com água destilada com duração de uma hora cada lavagem. Em seguida, as amostras foram acondicionadas em cassetes histológicos para dar início a desidratação do material. Esta foi realizada em soluções crescentes de álcool etanol, iniciando-se com o etanol 70%, seguido de etanol 80%, etanol 90% e finalmente três soluções de etanol 100% (etanol 100% I, II e III), durante uma hora cada solução. Posteriormente as amostras foram mergulhadas em uma solução de etanol-xilol (1:1) e duas soluções de xilol (xilol I e II) por uma hora cada. Em seguida, foi realizada a inclusão da parafina líquida à amostra. Nesta etapa o cassete contendo a amostra foi mergulhada em duas soluções de parafina (parafina I e II) aquecida previamente a 60° C por uma hora cada, seguido do emblocamento da amostra com parafina, microtomia – com espessura de cinco micra – e preparo da lâmina histológica para coloração com Hematoxilina-Eosina (HE). Tal coloração foi realizada conforme o protocolo a seguir: mergulho das lâminas em solução de Xilol I por 10 minutos; seguido por Xilol II durante cinco minutos; etanol-xilol durante cinco minutos; etanol 100%, seguido por etanol 90%, etanol 70% e água destilada durante cinco minutos em cada solução; hematoxilina durante um minuto; água destilada durante 10 minutos; eosina durante dois minutos, seguido por 10 mergulhos da lâmina histológica nas soluções de etanol 70%, etanol 90%, etanol 100%, etanol-xilol (1:1), xilol I e xilol II. Após secagem, foi realizada a montagem com lamínula utilizando resina sintética (Entellan/Merck®) e análise em sistema de microscopia automática ZEN blue edition Axio zeiss®.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos nos testes de CBA foram processados através do software BD FACSuite® e o volume e densidade tumorais foram analisados pelo teste ANOVA one-way e Kruskal-Wallis com confirmação pelo teste Mann-Whitney, utilizando significância de $p < 0,05$ pelo GraphPad Prism 5 Software®.

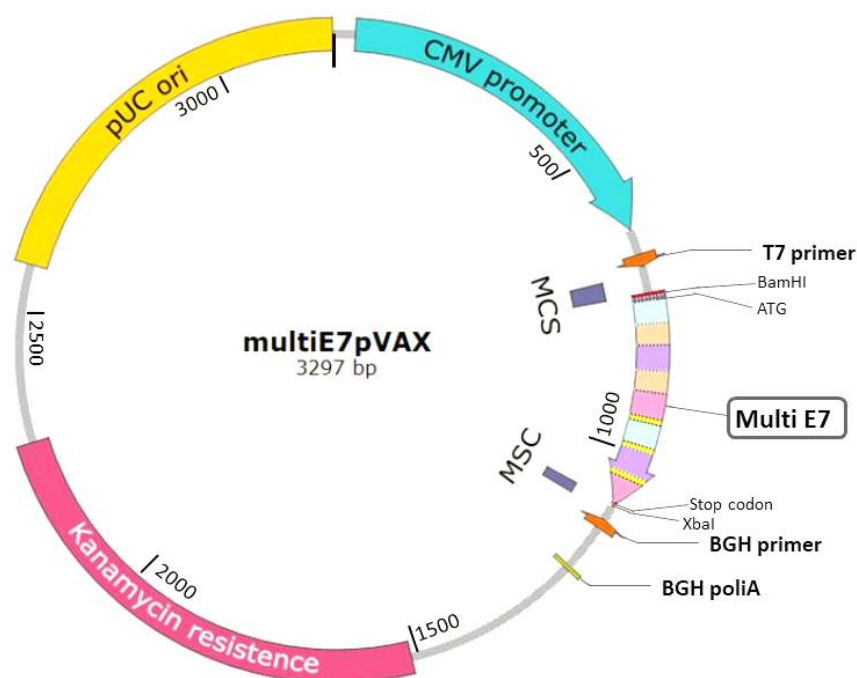
5 RESULTADOS

5.1 OBTENÇÃO DOS PLASMÍDEOS VACINAIS

Bactérias quimiocompetentes da linhagem *E. coli* TOP10 foram utilizadas no processo de clonagem para produção em grande escala dos plasmídeos e manutenção destes. A vacina de DNA do presente estudo consiste na clonagem dos insertos multi E7 e li-PADRE no vetor de expressão pVAX. Os insertos foram clonados em orientação *Bam*HI/*Xba*I, resultando em um plasmídeo pVAX com 3.297pb para o plasmídeo pVAX/multi E7 (**Figura 9**) e 3.774 pb para o plasmídeo pVAX/li-PADRE (**Figura 10**).

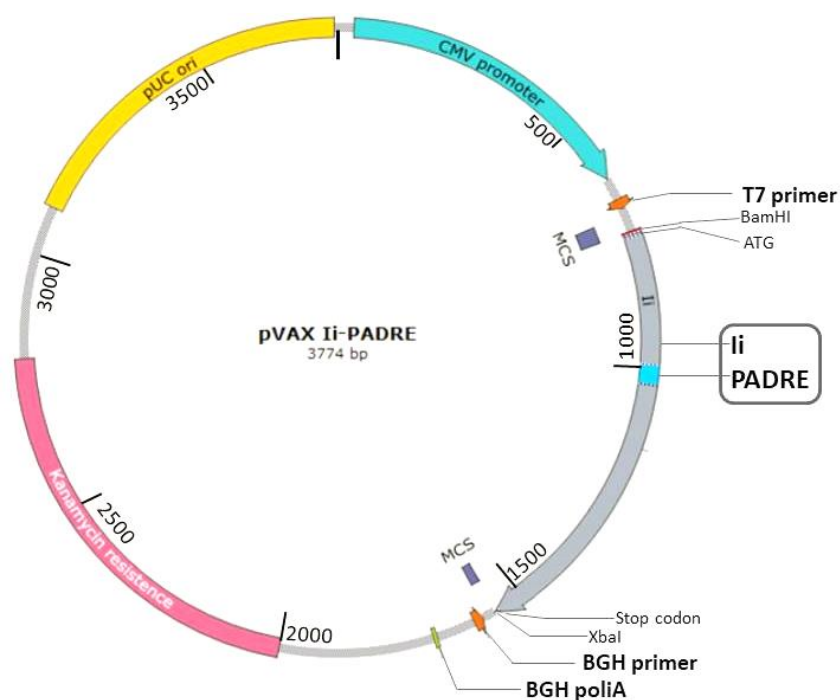
Os clones foram confirmados através de PCR (**Figura 11**), clivagem pelas respectivas enzimas de restrição (**Figura 12**) e sequenciamento de DNA.

Figura 9- Mapa do plasmídeo pVAX contendo o inserto multi E7 clonado em orientação *Bam*HI-*Xba*I.



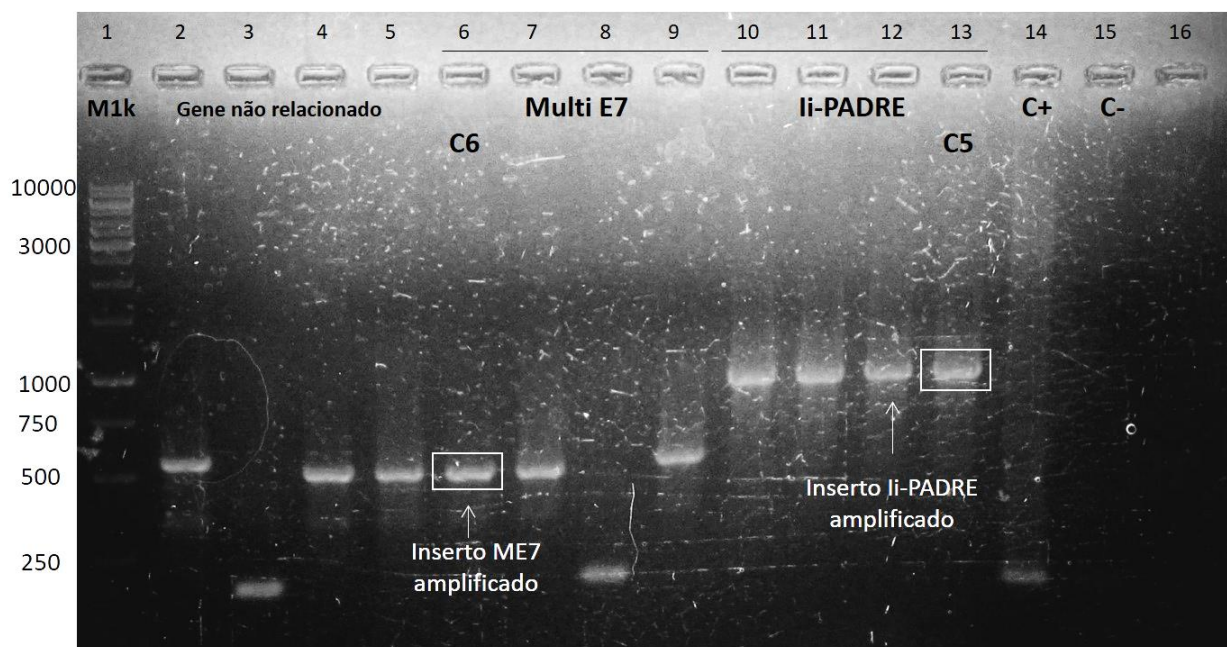
Fonte: A autora (2021). Mapa construído através do programa SnapGene v.4.0.8.

Figura 10- Mapa do plasmídeo pVAX contendo o inserto li-PADRE clonado em orientação *Bam*HI/*Xba*I.



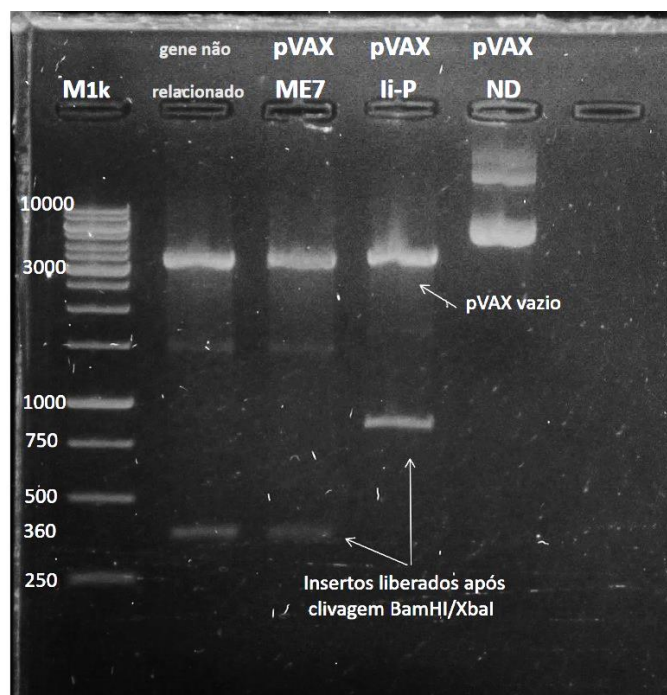
Fonte: A autora (2021). Mapa construído através do programa SnapGene v.4.0.8.

Figura 11- Amplificação através de PCR de um fragmento do plasmídeo pVAX para confirmação dos clones pVAX/multi E7 e pVAX/li-PADRE em *E. coli* TOP10 (vacinas de DNA).



Fonte: A autora (2021). Os clones selecionados para o estudo estão destacados. Poços 6-9: multi E7; Poços 10-13: li-PADRE. Tamanho dos amplicons: inserto multi E7: 475pb; li-PADRE: 952pb; Controle positivo (C+): 177pb. Primer F: 5'TAATACGACTCACTATAGGG-3; Primer R: 5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3'. Anelamento a 56°C; Gel de agarose a 1,5%; coloração por brometo de edídeo (0,5µg/mL); corrida: 1h/80V; M: marcador de peso molecular (GeneRuler 1 Kb -- Thermo Scientific); C: colônia; C+: PCR com DNA do pVAX vazio; C-: PCR sem DNA.

Figura 12- Digestão de DNA plasmidial com as enzimas *Bam*HI/*Xba*I para confirmação dos clones pVAX/multi E7 e pVAX/li-PADRE em *E. coli* TOP10 (vacinas de DNA).



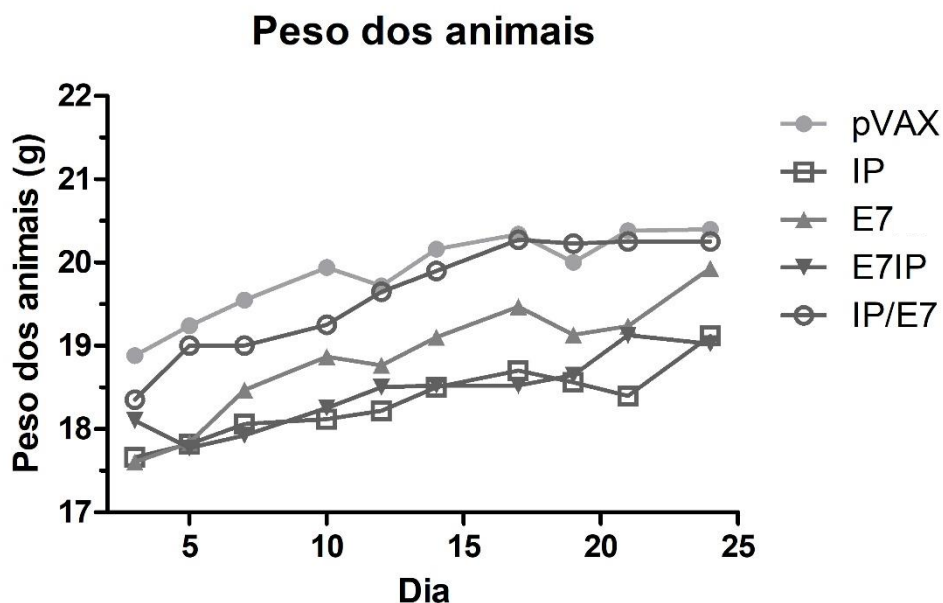
Fonte: A autora (2021). A digestão foi realizada em duas etapas durante 16 horas a 37°C, cada etapa. Tamanho dos insertos após clivagem com as enzimas *Bam*HI/*Xba*I: multi E7: 360pb; li-PADRE: 837pb. Gel de agarose a 1,5%; coloração por brometo de edídeo (0,5µg/mL); corrida: 1h/80V; M1k: Marcador de peso molecular (GeneRuler 1 Kb -- Thermo Scientific); ND: vetor pVAX vazio não digerido.

5.2 MONITORAMENTO DO CRESCIMENTO TUMORAL

O presente estudo teve início com cinco animais em cada grupo, sendo que ao longo do experimento um total de quatro animais vieram a óbito minutos após anestesia, o que acarretou uma redução no n amostral em alguns grupos: E7 n=3; E7IP n=4 e IP/E7 n=4. Desta forma, foram realizados alguns ajustes na dose do anestésico a fim de evitar a perda de mais animais. Assim, ao final do experimento, a viabilidade dos camundongos foi de 84%. É importante salientar que nenhum óbito ocorreu devido a presença do tumor ou aos procedimentos inerentes à imunização. Também foi observado que os tumores não provocaram nenhum tipo de ferida, secreção ou dano tecidual local, não interferindo inclusive, na proliferação de anexos do tecido epitelial, no qual o pelo voltou a crescer normalmente após

tricotomia. Além disso, ao longo do experimento os animais não apresentaram, falta de apetite, alteração no comportamento ou perda de peso significativo (**Gráfico 1**).

Gráfico 1- Monitoramento do peso dos animais nos diferentes grupos vacinais.



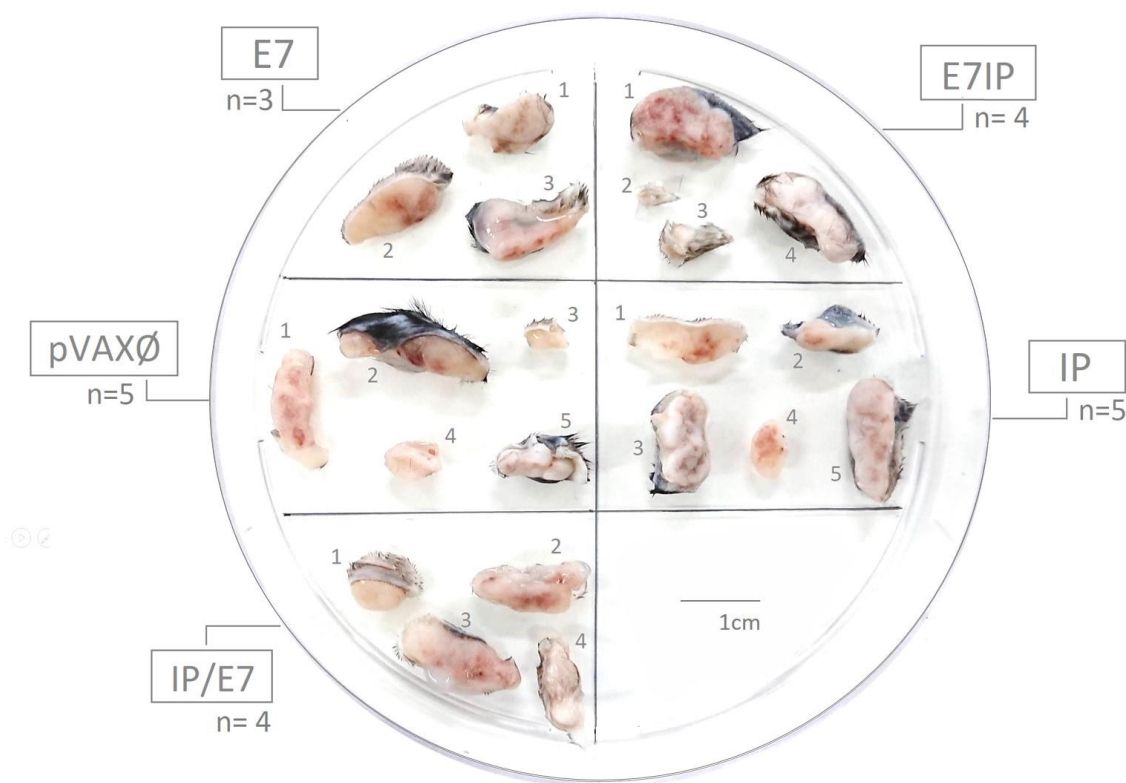
Fonte: A autora (2021). A pesagem foi realizada três vezes por semana durante o período de 24 dias de estudo. Os valores médios do peso dos camundongos ao fim do experimento foram: pVAXØ 20,4g; IP 19,12g; E7m 19,9g ; E7IP 19g; ;IP/E7 20,25g. **pVAX**: plasmídeo pVAX vazio; **E7**: plasmídeo pVAX contendo a construção multiepítipo E7; **IP**: plasmídeo pVAX contendo o adjuvante li-PADRE; **E7IP**: coadministração dos plasmídeos pVAX E7 e pVAX li-PADRE; **IP/E7**: administração do plasmídeo pVAX li-PADRE no *prime* e do pVAX E7 no *boost*.

Como mencionado anteriormente, a mensuração do crescimento tumoral e pesagem dos animais foram realizadas a partir do 3º dia de experimento, três vezes por semana até o momento da eutanásia no 24º dia, quando os tumores foram coletados, mensurados e pesados.

Em relação ao crescimento tumoral, ao final do experimento todos os animais apresentaram tumor e estes apresentaram, em sua maioria, um crescimento alongado no sentido crânio caudal. Na **Figura 13** se encontram os tumores seccionados longitudinalmente sobre uma placa de Petri e separados por grupo vacinal. A foto foi realizada durante o processamento para a análise histológica e representa apenas uma das metades de cada tumor. A outra metade fora

processada imediatamente após a remoção para investigação de citocinas. Como pode ser visto, em todos os grupos foram observados tumores pequenos ($\leq 0,28 \text{ cm}^3$), médios ($0,29 - 0,49 \text{ cm}^3$) e grandes ($\geq 0,5 \text{ cm}^3$).

Figura 13- Apresentação dos tumores de cada animal em seus respectivos grupos vacinais após secção longitudinal em uma placa de Petri.

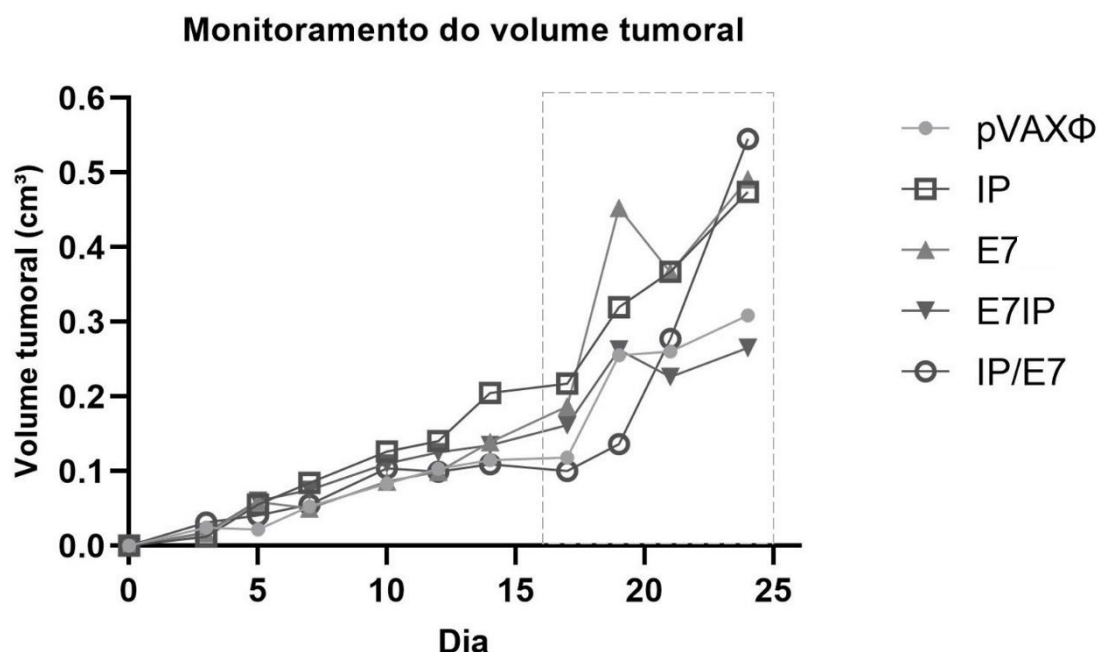


Fonte: A autora (2021). Na imagem está representada apenas uma metade de cada tumor. Os números ao lado de cada tumor representam a identificação do indivíduo em cada grupo. **pVAXØ**: plasmídeo pVAX vazio; **E7**: plasmídeo pVAX contendo a construção multiepítipo E7; **IP**: plasmídeo pVAX contendo o adjuvante li-PADRE; **E7IP**: coadministração dos plasmídeos pVAX E7 e pVAX li-PADRE; **IP/E7**: administração do plasmídeo pVAX li-PADRE no *prime* e do pVAX E7 no *boost*.

O monitoramento do crescimento tumoral ao longo dos 24 dias de experimento (**Gráfico 2**) revelou que o crescimento é constante e este apresenta um crescimento exponencial mais acentuado a partir do 17º dia em todos os grupos estudados. Ao fim do experimento, o grupo IP/E7 apresentou o maior volume tumoral médio ($0,54 \text{ cm}^3$), enquanto que o menor volume foi observado no grupo

E7IP (0,26 cm³). A análise estatística revelou que não houve diferença significativa no volume tumoral entre os diferentes grupos ($p>0,05$).

Gráfico 2- Monitoramento do volume tumoral nos diferentes grupos vacinais.

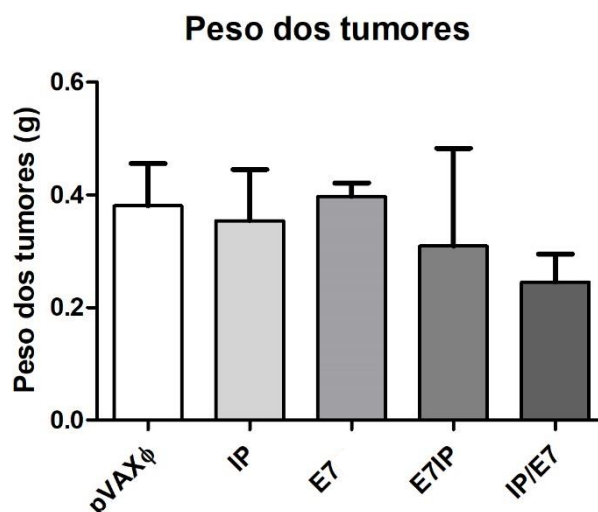


Fonte: A autora (2021). A mensuração do tumor foi realizada três vezes por semana durante o período de 24 dias de estudo. Para a obtenção do volume tumoral foi utilizada a fórmula: menor comprimento² (cm) x maior comprimento (cm) x 0,52. Os valores da média do volume tumoral de cada grupo ao fim do experimento (24º dia) foram: pVAXØ 0,31cm³ ($\pm 0,15$); IP 0,47cm³ ($\pm 0,35$); E7m 0,49cm³ ($\pm 0,27$); E7IP: 0,26cm³ ($\pm 0,25$); IP/E7 0,54cm³ ($\pm 0,26$). O destaque em linha tracejada indica o período de acentuado crescimento exponencial dos tumores. **pVAXØ**: plasmídeo pVAX vazio; **E7**: plasmídeo pVAX contendo a construção multiepítipo E7; **IP**: plasmídeo pVAX contendo o adjuvante li-PADRE; **E7IP**: coadministração dos plasmídeos pVAX E7 e pVAX li-PADRE; **IP/E7**: administração do plasmídeo pVAX li-PADRE no *prime* e do pVAX E7 no *boost*.

Embora o grupo IP/E7 tenha apresentado o maior volume tumoral ao final do experimento, este grupo foi também aquele que apresentou o menor peso tumoral, seguido do grupo E7IP (**Gráfico 3**). Desta forma, a fim de caracterizar melhor a relação entre o volume e o peso tumoral, foi realizado o cálculo da densidade de cada tumor – peso do tumor (g)/ volume tumoral (cm³) – e este dado revelou uma característica interessante: foi observada uma relação oposta entre o tamanho dos tumores e a sua densidade na maioria das amostras e em todos os grupos estudados, exceto IP/E7. Ou seja, com exceção deste último grupo, na maioria das

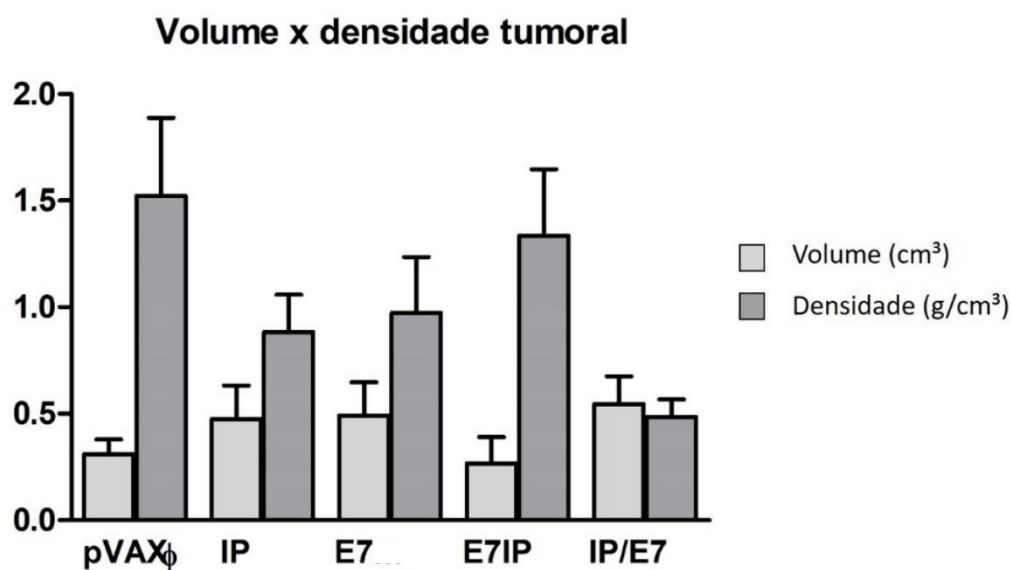
amostras, os tumores pequenos ($\leq 0,28 \text{ cm}^3$) apresentaram grande densidade ($\geq 1,2 \text{ g/cm}^3$) (**Gráfico 4**).

Gráfico 3- Pesagem dos tumores nos diferentes grupos vacinais.



Fonte: A autora (2021). A pesagem dos tumores ocorreu ao fim do estudo (24º dia) e os valores médio de cada grupo foram: pVAX ϕ 0,38g ($\pm 0,17$); IP 0,35g ($\pm 0,2$); E7m: 0,4g ($\pm 0,04$); E7IP: 0,3g ($\pm 0,34$); IP/E7: 0,24g ($\pm 0,1$). **pVAX ϕ** : plasmídeo pVAX vazio; **E7**: plasmídeo pVAX contendo a construção multiepítipo E7; **IP**: plasmídeo pVAX contendo o adjuvante li-PADRE; **E7IP**: coadministração dos plasmídeos pVAX E7 e pVAX li-PADRE; **IP/E7**: administração do plasmídeo pVAX li-PADRE no *prime* e do pVAX E7 no *boost*.

Gráfico 4- Comparação do volume médio com a densidade média dos tumores em cada grupo vacinal.



Fonte: A autora (2021). Os valores da densidade tumoral foram coletados ao fim do experimento (24º dia) após a remoção e pesagem dos tumores. Para a obtenção da densidade de cada tumor foi utilizada a fórmula: peso do tumor (g)/ volume tumoral (cm^3). A média da densidade em cada

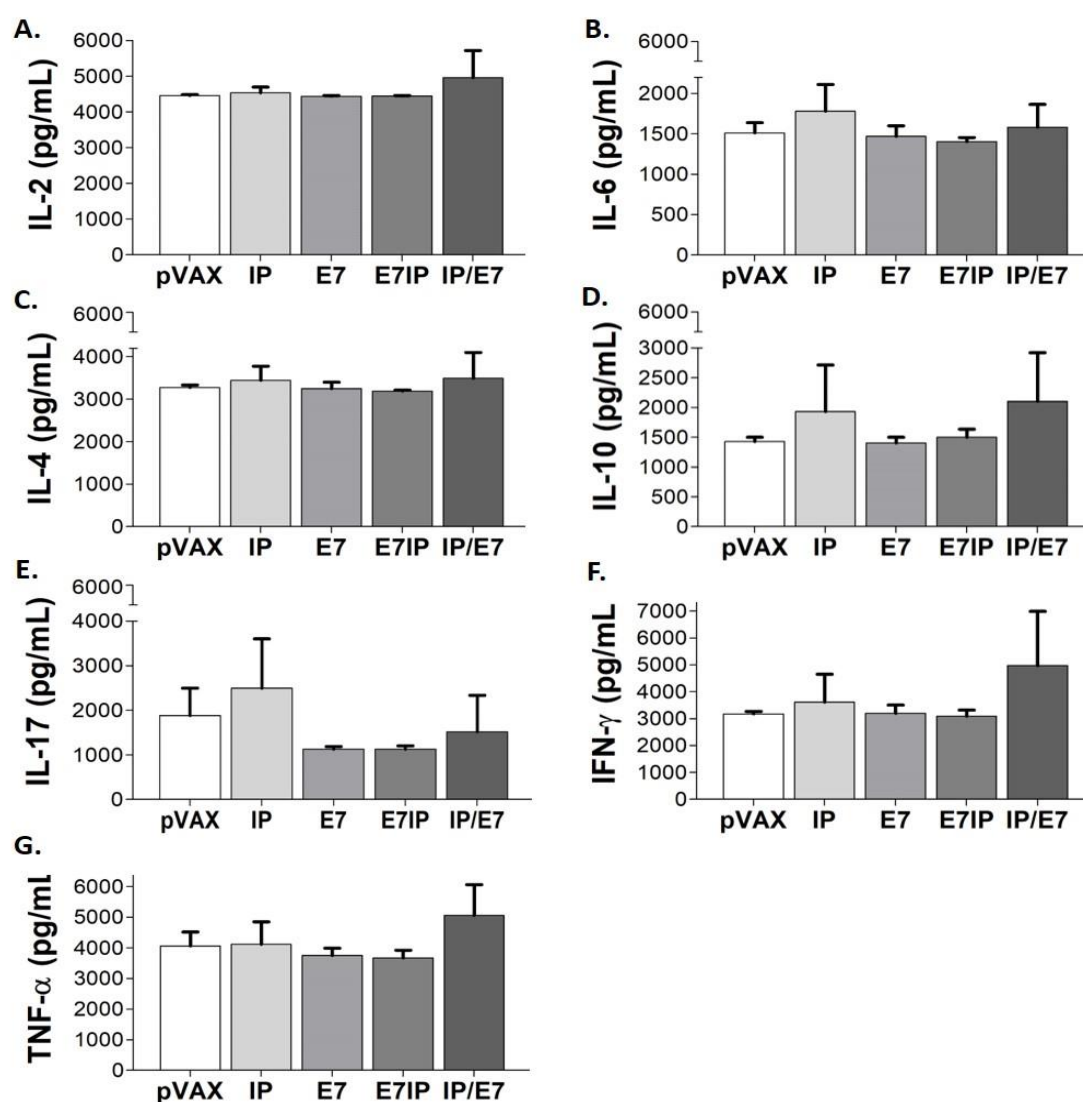
grupo foi: pVAXØ 1,52g/cm³ ($\pm 0,82$); IP 0,88g/cm³ ($\pm 0,39$); E7m 0,97g/cm³ ($\pm 0,45$); E7IP: 1,33g/cm³ ($\pm 0,62$); IP/E7 0,48g/cm³ ($\pm 0,16$). **pVAXØ**: plasmídeo pVAX vazio; **E7**: plasmídeo pVAX contendo a construção multiepítopo E7; **IP**: plasmídeo pVAX contendo o adjuvante li-PADRE; **E7IP**: coadministração dos plasmídeos pVAX E7 e pVAX li-PADRE; **IP/E7**: administração do plasmídeo pVAX li-PADRE no *prime* e do pVAX E7 no *boost*.

5.3 INVESTIGAÇÃO DE CITOCINAS

Conforme mencionado anteriormente, as citocinas de camundongo – IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN- γ e TNF- α – foram mensuradas a partir das amostras de soro dos animais (**Figura 14**), como também do sobrenadante de cada tumor (macerado) (**Figura 15**).

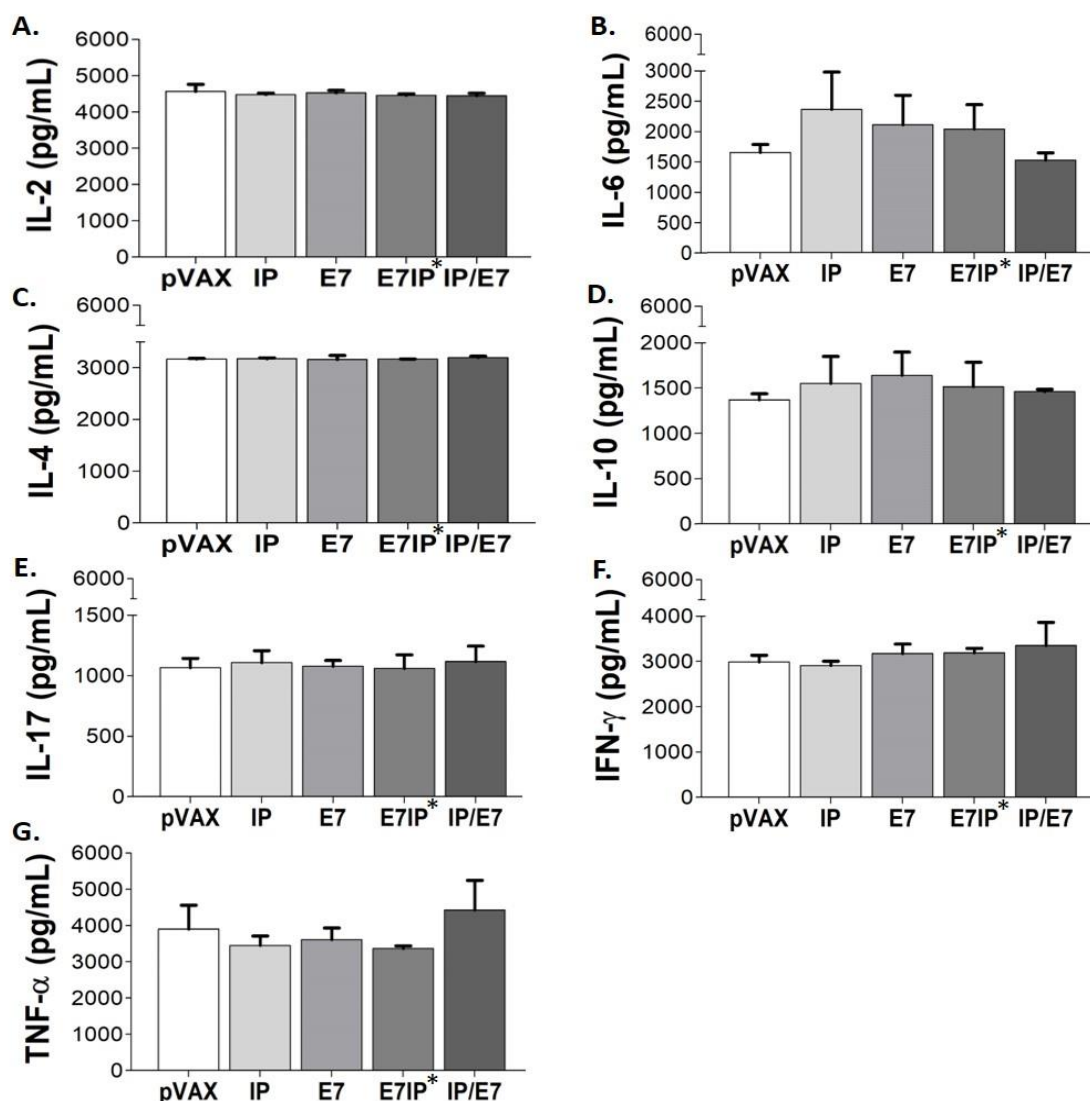
Nossos resultados não apontaram diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$). Considerando todos os grupos, as citocinas mais expressas tanto em amostras de soro quanto em amostras de tumor foram IL-2, IFN- γ e TNF- α , seguido de IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17. Além disso, o grupo IP/E7 apresentou um discreto aumento da expressão de citocinas, com destaque para aquelas de perfil Th1, como IFN- γ e TNF- α . Este desempenho não foi observado no grupo E7IP, porém é importante salientar que neste grupo, durante a investigação de citocinas das amostras de tumor, foram incluídas na análise apenas as amostras dos dois maiores tumores (indivíduos 1 e 4), já que não houve massa tumoral suficiente nos tumores pequenos desse grupo (indivíduos 2 e 3) para integrar essa análise.

Figura 14- Perfil da produção de citocinas analisadas a partir de amostras do soro dos animais.



Fonte: A autora (2021). A. IL-2; B. IL-6; C. IL-4; D. IL-10; E. IL-17; F. IFN- γ ; G. TNF- α . **pVAX $\emptyset$** : plasmídeo pVAX vazio; **E7**: plasmídeo pVAX contendo a construção multiepítoto E7; **IP**: plasmídeo pVAX contendo o adjuvante li-PADRE; **E7IP**: coadministração dos plasmídeos pVAX E7 e pVAX li-PADRE; **IP/E7**: administração do plasmídeo pVAX li-PADRE no *prime* e do pVAX E7 no *boost*.

Figura 15- Perfil da produção de citocinas analisadas a partir de amostras de tumor dos animais.



Fonte: A autora (2021). A. IL-2; B. IL-6; C. IL-4; D. IL-10; E. IL-17; F. IFN- γ ; G. TNF- α . *Nos gráficos do grupo E7IP estão representados somente as amostras dos maiores tumores do grupo (indivíduos 1 e 4), pois não houve massa tumoral suficiente para esta análise para os tumores pequenos deste grupo (indivíduos 2 e 3). **pVAXØ**: plasmídeo pVAX vazio; **E7**: plasmídeo pVAX contendo a construção multiepítopo E7; **IP**: plasmídeo pVAX contendo o adjuvante li-PADRE; **E7IP**: coadministração dos plasmídeos pVAX E7 e pVAX li-PADRE; **IP/E7**: administração do plasmídeo pVAX li-PADRE no *prime* e do pVAX E7 no *boost*.

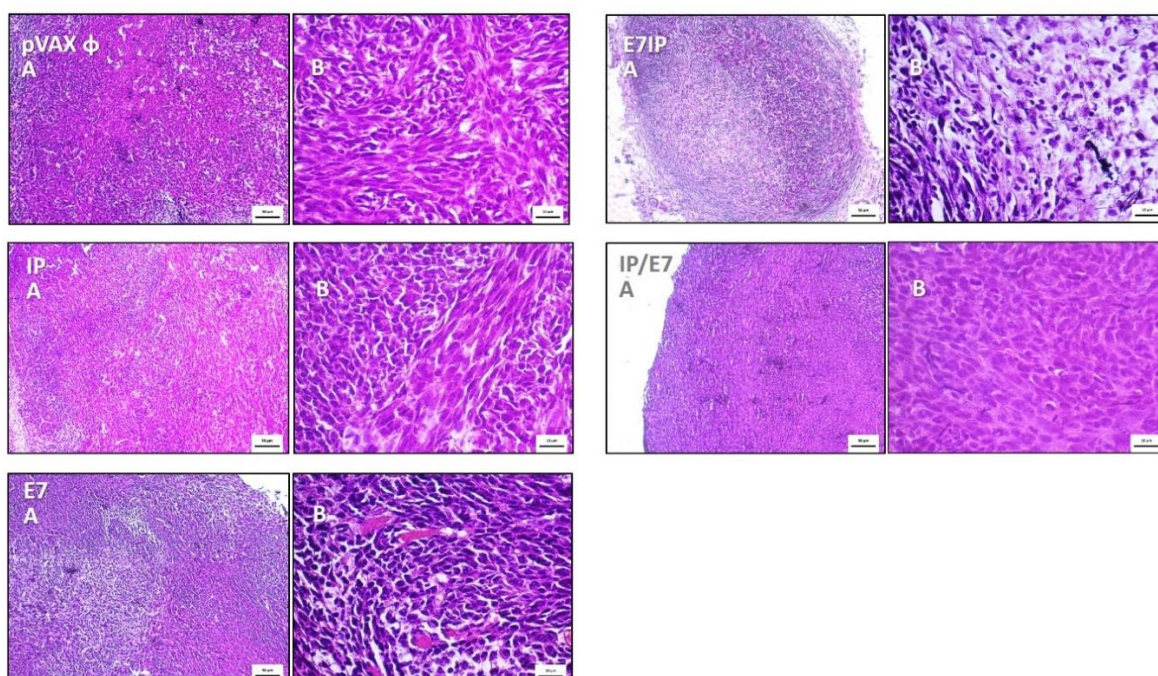
5.4 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO TUMOR

Após a coleta e secção do tumor, metade da amostra foi processada a fim de realizar a análise histopatológica dos tumores emblocados em parafina, como descrito na seção 4.8 da Metodologia. Tal análise revelou uma composição eminentemente de células neoplásicas (compatíveis com a natureza de uma

linhagem de células de desafio tumoral) nas amostras, com intenso pleomorfismo celular e nuclear, eventuais entraves fibróticos e áreas de necrose.

Algumas amostras apresentaram relevante população de fibroblastos e fibrose mais destacada. A exemplo do grupo E7IP que apresentou aumento no número de fibroblastos com padrão levemente diferente dos demais, principalmente nos indivíduos 2 e 3 (o que corresponde aos menores tumores deste grupo). Enquanto isso, o indivíduo 4 do grupo IP/E7 apresentou acentuado número de fibroblastos. Não foi observado presença de infiltrados inflamatórios, inclusive nas áreas periféricas, em nenhum grupo estudado (**Figura 16**). A **Tabela 1** mostra o resultado das análises histopatológicas para cada grupo vacinal.

Figura 16- Amostras representativas dos cortes histológicos de tumores derivados da linhagem celular C3 em camundongo em cada grupo vacinal.



Fonte: A autora (2021). As fotos revelam amostras com intensa celularidade entremeada por filamentos fibrosos, sangue e fibroblastos. As células neoplásicas apresentam elevado pleomorfismo celular e nuclear o que caracteriza seu elevado grau de anaplasia. Verifica-se também áreas de necrose composta de detritos celulares e material amórfico. Coloração por HE. A: 100x e barra de escala de 50 micra; B: 400x e barra de escala de 10 micra. **pVAXØ A-B:** plasmídeo pVAX vazio - indivíduo 4; **E7 A-B:** plasmídeo pVAX contendo a construção multiepítipo E7 - indivíduo 1; **IP A-B:** plasmídeo pVAX contendo o adjuvante li-PADRE - indivíduo 3; **E7IP A-B:** coadministração dos plasmídeos pVAX E7 e pVAX li-PADRE - indivíduo 3; **IP/E7 A-B:** administração do plasmídeo pVAX li-PADRE no *prime* e do pVAX E7 no *boost* - indivíduo 3.

Tabela 1- Resultado das análises histopatológicas dos grupos vacinais estudados.

Grupo	Celularidade	Pleomorfismo	Fibrose	Necrose
pVAXØ	100% Intensa	60% Intenso [2-4] 40% Moderado [1 e 5]	100% Ausente	80% Ausente [1-3 e 5] 20% Moderada [4]
IP	100% Intensa	80% Intenso [1-3 e 5] 20% Moderado [4]	80% Ausente [1- 4] 20% Leve [5]	60% Ausente [2-4] 40% Moderada [1 e 5]
E7	100% Intensa	100% Intenso	66% Ausente [1 e 2] 33% Moderada [3]	66% Leve [1 e 2] 33% Ausente [3]
E7IP	100% Intensa	50% Intenso [1 e 4] 50% Moderado [2 e 3]	50% Moderada [1 e 4] 50% Ausente [2 e 3]	75% Leve [2-4] 25% Intensa [1]
IP/E7	100% Intensa	100% Moderado	75% Ausente [1-3] 25% Intensa [4]	50% Ausente [3 e 4] 25% Leve [1] 25% Moderada [2]

Fonte: A autora (2021). Os números entre colchetes representam os indivíduos de cada grupo. **pVAXØ**: plasmídeo pVAX vazio; **E7**: plasmídeo pVAX contendo a construção multiepítipo E7; **IP**: plasmídeo pVAX contendo o adjuvante li-PADRE; **E7IP**: coadministração dos plasmídeos pVAX E7 e pVAX li-PADRE; **IP/E7**: administração do plasmídeo pVAX li-PADRE no *prime* e do pVAX E7 no *boost*.

6 DISCUSSÃO

Apesar de o câncer cervical ter passado de terceiro para o quarto câncer mais incidente em mulheres no mundo todo, o número de casos aumentou de 530.000 em 2011 para 604.000 em 2020, bem como o número de mortes. Além disso, são em países de menor IDH que esta doença tem maior impacto, situação semelhante ocorre nas regiões Centro-oeste, Nordeste e principalmente no Norte do Brasil (INCA 2019; Sung et al. 2021). Infelizmente a vacina profilática não é eficaz no combate de lesões já existentes (Paavonen et al., 2009) e a cobertura e reforço da vacina varia muito entre os países, sendo necessário, portanto, o desenvolvimento de estratégias terapêuticas no combate às lesões provocadas por HPV de alto risco.

O presente estudo objetivou desenvolver estratégias terapêuticas contra o câncer cervical em modelo pré-clínico. Para este fim, utilizamos como proposta vacinal, uma vacina de DNA contendo epítomos imunogênicos ligantes de MHC I baseado no oncogene viral E7 de HPV-16, uma proteína constitutivamente expressa em lesões malignas e pré-malignas (Talebi et al. 2017), na qual sua expressão aumenta conforme o tumor progride (Padilla-Paz 2005; Daftarian et al. 2006). Desta forma, teoricamente, uma vacina capaz de elicitar uma resposta imune eficiente contra esse gene, é capaz de limitar a progressão e/ou induzir a regressão das lesões intraepiteliais não invasivas através da elicitação da resposta citotóxica.

Uma das vantagens em se trabalhar com vacinas de DNA é a possibilidade de utilizar diversas técnicas de design para otimização de sequências e escolha dos epítomos preditos mais imunogênicos para alelos específicos de moléculas MHC I. Neste estudo, durante a escolha das sequências dos epítomos preditos mais

imunogênicos, foram preservados alguns aminoácidos marginais das sequências fornecidas pelo programa, a fim de evitar a perda de aminoácidos imunogênicos importantes nas extremidades durante o processamento proteossomal.

Como modelo de desafio tumoral utilizamos a linhagem celular C3. Ao final do experimento, todos os animais apresentaram tumor e estes foram monitorados quanto ao crescimento ao longo do estudo. A análise estatística não apontou diferença significativa em relação a regressão/supressão tumoral entre os grupos estudados. Além disso, todos os grupos vacinais apresentaram tumores grandes ($\geq 0,5 \text{ cm}^3$), médios ($0,29 - 0,49 \text{ cm}^3$) e pequenos ($\leq 0,28 \text{ cm}^3$).

Ao final do experimento, o cálculo da densidade de cada tumor revelou uma interessante relação oposta entre o tamanho dos tumores e a sua densidade na maioria das amostras e em todos os grupos estudados, exceto no grupo IP/E7. Ou seja, em geral um pequeno volume tumoral ($\leq 0,28 \text{ cm}^3$) foi compensado por uma grande densidade ($\geq 1,2 \text{ g/cm}^3$) e vice-versa. Diferentemente dos demais grupos experimentais, o grupo IP/E7 apresentou baixos valores de densidade em todos os tumores, independentemente do seu tamanho. Em contraste, o grupo pVAXØ apresentou valores altíssimos de densidade ($1,9 - 2,25 \text{ g/cm}^3$), especialmente nos tumores pequenos. Neste sentido, infere-se que, um microambiente tumoral muito denso poderia representar um ambiente mais imunossupressor, visto que o aumento da densidade pode dificultar a penetração de células de defesa, citocinas e até mesmo drogas terapêuticas (Heldin et al. 2004; Sun et al. 2020).

O microambiente tumoral compreende uma estrutura complexa composta por uma vasculatura desorganizada entremeada por uma variedade de populações celulares que incluem células cancerosas em intensa proliferação, células imunoestimulatórias/imunossupressoras e células estromais embebidas em uma

matriz extracelular rica em proteínas, produtos resultantes do intenso metabolismo das células tumorais e moléculas de sinalização (Chandler et al. 2019; Rumfield et al. 2020). Neste sentido, uma matriz extracelular densa e rígida, associada à compressão da massa tumoral crescente, acarreta o aumento da pressão de fluido intersticial, interferindo na difusão e atividade de agentes terapêuticos, além de dificultar a penetração de células de defesa e citocinas no interstício tumoral (Heldin et al. 2004; Sun et al. 2020). Associado a todos esses fatores, a hipóxia e acidose criam um microambiente intratumoral imunossupressor ao ataque imunológico (Kobayashi et al. 2014). Desta forma, se for considerado apenas o parâmetro volume tumoral durante a caracterização de tumores, corre-se o risco de perder uma análise qualitativa mais aprofundada destes. Um exemplo é o nosso grupo IP/E7, visto que, se fosse considerado apenas o volume tumoral, este grupo representaria o pior tratamento. Porém, se os parâmetros volume tumoral e densidade forem levados em consideração, logo o painel terapêutico se inverte, apontando este grupo como o que obteve os melhores resultados.

De acordo com o que foi discutido anteriormente, a relação volume x densidade tumoral detectada no nosso estudo, nos encoraja a levantar as seguintes questões para estudos futuros: 1- O volume tumoral é realmente o único parâmetro que deve ser levado em consideração como prognóstico dos tumores em testes pré-clínicos, como fazem grande parte dos estudos? 2- Os tumores pequenos do grupo controle (pVAXØ) realmente podem ser considerados menos agressivos, mesmo apresentando altíssimos valores de densidade?

Assim como nosso estudo, Rumfield et al. (2020) utilizou o peso dos tumores como um indicador adicional de atividade antitumoral e observaram que os tumores com menor peso apresentavam um maior número de linfócitos ativados (Rumfield

et al. 2020). Em relação ao peso tumoral observado no nosso estudo, os grupos IP/E7 e E7IP apresentaram os menores pesos médios, 0,24g e 0,3g, respectivamente. Desta forma, esse dado pode fornecer bons indícios para a administração do adjuvante li-PADRE em associação ao plasmídeo E7 como adjuvante vacinal.

A fim de realizar uma melhor caracterização do status imunológico dos animais experimentais, amostras de soro e de tumores foram investigadas quanto a expressão de citocinas. Essa avaliação é importante a fim de caracterizar o perfil funcional das células T CD4+ – em Th1, Th2 ou Th17 – elicitado pelas nossas estratégias vacinais através da expressão qualitativa e quantitativa de citocinas, visto que, para o combate de células infectadas e eliminação de patógenos intracelulares – a exemplo de uma infecção viral – a polarização para a resposta imune Th1, com secreção de IFN- γ é crítica. (Yasaghi and Mahdavi 2016).

A diferenciação de células T CD4+ naïve (Th0) nos fenótipos Th1 ou Th2 determina se o antígeno ativará predominantemente uma resposta imune celular ou humoral, respectivamente. Em relação a resposta Th17, esta possui como citocina de assinatura a IL-17 e promove inflamação e emigração de neutrófilos para os locais de infecção. Desta forma, o tipo de resposta induzida pela célula Th0 costuma ser decisiva para o desfecho da doença. No caso dos tumores provocados por HPV, o fenótipo câncer, bem como a sua manutenção, foi fortemente associado à falha em montar uma forte resposta helper Th1 e citotóxica específicas contra o HPV (Desmedt et al. 1998; Welters et al. 2008; Bagarazzi et al. 2012; Morrow et al. 2013).

A fim de detectar a polarização imune da resposta helper elicitada pelos nossos candidatos vacinais, as citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN- γ e TNF-

α foram avaliadas. Nossos resultados não apontaram diferença estatística entre os grupos ($p>0,05$), porém foi observado uma forte tendência para a polarização Th1, já que as citocinas mais expressas, tanto em amostras de soro, quanto de tumor foram as citocinas efetoras comuns desta via: IFN- γ e TNF- α . Adicionalmente, foi observado uma alta expressão da citocina IL-2, proliferativa para linfócitos.

Nossos resultados demonstraram que o grupo controle produziu uma quantidade de citocinas semelhante aos demais grupos. Isso pode ter ocorrido devido ao efeito adjuvante da eletroporação aplicada nesse grupo logo após a inoculação do DNA contendo o vetor vazio (pVAXØ). Estudos demonstram que o leve grau de dano muscular e necrose provocado pela eletroporação induz, por si só, um ambiente inflamatório apropriado, levando a produção imediata de citocinas responsáveis pela sinalização de perigo e pelo recrutamento de macrófagos, células dendríticas e linfócitos T (Arcuri et al. 2008; Chiarella et al. 2013). Além disso, a própria inoculação das células de desafio tumoral pode ter tido alguma influência no estímulo do sistema imune.

Em relação ao desempenho dos demais grupos vacinais, apesar de ter apresentado o maior volume tumoral, o grupo IP/E7 foi o que apresentou, em geral, a maior expressão de citocinas de perfil Th1. Neste sentido, vale destacar que este grupo atingiu uma concentração de 5000pg/mL das citocinas IFN- γ e TNF- α no soro, em detrimento a apenas 3500pg/mL de IL-4 nesta amostra. Adicionalmente, este grupo apresentou 5000pg/mL no soro para IL-2. Já o grupo E7IP não apresentou o mesmo desempenho na produção destas citocinas, porém é importante salientar que neste grupo, durante a investigação de citocinas das amostras de tumor, foram incluídas na análise apenas as amostras dos dois maiores tumores (indivíduos 1 e 4), já que não houve massa tumoral suficiente nos

tumores pequenos desse grupo (indivíduos 2 e 3) para integrar essa análise, sendo que toda a amostra tumoral foi encaminhada para a análise histológica. Desta forma, o gráfico resultante do ensaio de CBA do tumor para o grupo E7IP pode não representar de forma fiel a performance desse tratamento.

De acordo com os resultados expostos anteriormente, o uso do imunomodulador li-PADRE parece fornecer algum suporte à vacina E7. Nesse sentido, embora a resposta citotóxica seja considerada a principal protagonista em vacinas antitumorais, a inserção de um epítopo ligante de MHC II para ativação da resposta helper pode ativar uma ampla resposta imune, já que diversos estudos apontam a importância da resposta T CD4 atuando coordenadamente com a resposta citotóxica através de vias de coativação (Galaine et al. 2015; Protti et al. 2014; Kreiter et al. 2015; Efremova et al. 2017). Neste sentido, Ishioka et al (1999), ao investigarem uma vacina de DNA multiepítopo, encontraram que a imunogenicidade de pelo menos alguns epítopos no minigene era dependente da resposta helper, visto que a deleção do imunomodulador PADRE da construção inibiu as respostas citotóxicas específicas de quatro dos seis epítopos testados, sendo que em um deles, a redução foi de 20 a 30 vezes.

Como mencionado anteriormente, nossos dados da produção de citocinas parecem indicar um efeito adjuvante vacinal maior quando utilizamos o imunomodulador li-PADRE apenas no *prime*, conforme representado pelo grupo IP/E7. Nesse sentido, um estudo que utilizou uma vacina de DNA codificante de E7 de HPV-16, encontrou que a administração do li-PADRE apenas no *prime*, induziu uma resposta citotóxica específica para E7 mais eficiente e duradoura do que com o regime reverso, produzindo cerca de 3 vezes mais células T CD8+ específicas (Park et al. 2010). Neste sentido, este estudo sugere ainda que as células T CD4+

ativadas na fase inicial são importantes para gerar as respostas T CD8+ específicas para E7 e células de memória, visto que, quando cultivadas na presença de células T CD4+ específicas para PADRE, as DCs que expressavam E7 foram protegidas do efeito letal das células T CD8 específicas para este antígeno.

Em relação ao desempenho da nossa vacina de DNA multiepítopo E7, quando esta foi administrada sozinha não apresentou uma boa performance. Neste sentido, apesar de as vacinas de DNA surgirem como uma estratégia promissora como imunoterapia contra o câncer, a imunogenicidade inerentemente baixa dessas vacinas exige a adição de adjuvantes a fim de garantir uma forte ativação da resposta imune (Park et al. 2010). Na nossa construção vacinal multiepítopo, optamos pela adição de apenas 3 epítomos do oncogene viral E7 em duplicata, a fim de evitar uma possível competição de uma grande quantidade epítomos imunodominantes pelos sítios MHC na mesma célula, ou até mesmo a imunotolerância (Cordeiro et al. 2018; Khalili et al. 2015). No entanto, é possível também que um número muito reduzido de epítomos possa limitar a resposta celular em relação ao próprio componente genético MHC do indivíduo. Desta forma, melhorias podem ser realizadas na nossa construção vacinal a fim de incluir um maior número de epítomos, adicionando inclusive mais alvos terapêuticos, a exemplo do oncogene E6 de HPV-16.

Um estudo clínico de fase 1 para uma vacina de DNA terapêutica contendo antígenos E6 e E7 de HPV16 e 18 encontrou que as maiores detecções de IFN- γ no ensaio ELISpot foram medidas contra o antígeno E6 de HPV18, seguido de E6 de HPV16 (Bagarazzi et al. 2012). Adicionalmente, um outro estudo envolvendo uma vacina de DNA terapêutica testada em pacientes com NIC III que utilizou uma construção E6/E7 de HPV 16 e 18, encontrou que o antígeno E6 ativou uma

resposta mais vigorosa do que o antígeno E7, 69-89% contra 11-31%, respectivamente, no ensaio ELISpot após a vacinação (Kim et al. 2014).

Outra estratégia que vem ganhando atenção no aprimoramento da resposta de vacinas genéticas é a utilização de regimes de *prime-boost* heterólogo, visto que ensaios clínicos dessas vacinas, quando utilizadas sozinhas ou em regimes de reforço homólogo repetidos, não obtiveram o efeito desejado (Lin et al. 2003). Neste sentido, um estudo utilizando uma vacina de DNA codificante de E6/E7 e uma proteína de fusão contendo L2/E6/E7 de HPV-16, encontrou que o esquema consistindo em dois *primes* com a vacina de DNA, seguido de um *boost* com proteína, obteve um resultado muito superior em relação à todas as demais combinações testadas, com geração de forte resposta T CD8+ específica. Além disso, a vacina alcançou um potente efeito tanto profilático quanto terapêutico (Peng et al. 2016).

Ao final do experimento, os tumores também foram caracterizados histologicamente. Nossos dados apontam que, em geral os grupos vacinais apresentaram características semelhantes, com destaque para algumas amostras de grupos específicos contendo um nível mais acentuado de pleomorfismo, fibroblastos e fibrose. O termo pleomorfismo neste contexto, refere-se à variabilidade no tamanho e forma das células tumorais e seus núcleos, sendo a intensidade deste parâmetro relacionada a um pior prognóstico em diversos tipos de tumores. Adicionalmente, o pleomorfismo tem sido amplamente utilizado por sua importância diagnóstica na diferenciação de lesões pré-malignas e malignas de diferentes neoplasias humanas, incluindo na carcinogênese cervical (Srivastava et al. 2013). Além disso, nossos resultados apontam que não foram observados infiltrados inflamatórios nos tumores.

A presença de infiltração de células T CD4⁺ e CD8⁺ no tumor está bem caracterizado na literatura como fator-chave na regressão deste, e está também associado à sobrevida do paciente em uma ampla variedade de tipos de tumores (Pagès et al. 2010; Zeng et al. 2016). Desta forma, a ausência de infiltração linfocitária neste estudo poderia explicar a ausência de regressão tumoral significativa nos grupos estudados. Isso pode ter acontecido devido à falha das nossas vacinas em elicitar uma forte resposta imune precoce, de modo a impedir a geração de um ambiente intratumoral imunossupressor, conforme comentado anteriormente. Neste sentido, algumas abordagens têm sido aplicadas, a exemplo da utilização de um indutor apoptótico no tumor durante o *prime*, acarretando na redução da densidade celular deste, além da expansão do espaço intersticial e na maior penetração intratumoral de nanomedicamentos (Jang et al. 2001).

A fibrose é a formação de tecido conjuntivo em excesso que se segue após uma injúria no tecido, câncer ou infecção, causando o adensamento estromal e formação de cicatriz. A relação existente entre fibrose, regeneração e carcinogênese são complexas e às vezes contraditórias. Uma hipótese plausível para a manutenção da fibrose mesmo em face da perda funcional do tecido, é que em organismos superiores, a regeneração pode ter sido selecionada negativamente e substituída pela fibrose no curso da evolução, visto que a produção e proliferação desenfreada de células pluripotentes aumentaria o risco de desenvolvimento de tumores nos indivíduos (Cernaro et al. 2012). A ocorrência de fibrose associada ao câncer pode ser explicada pelo fato de que o câncer é uma doença de inflamação crônica que mimetiza uma “ferida que não cicatriza”, ativando assim mecanismos fibróticos (Dvorak 2015).

O papel da fibrose no início, manutenção e metástase do câncer ainda é controverso e estudos encontraram a fibrose tanto inibindo, quanto sustentando o câncer sob determinadas condições. Tais condições parecem variar de acordo com o contexto estudado como o tipo de tumor e estágio em que este se encontra, visto que o estroma associado a um tumor metastático é diverso do estroma encontrado no tumor primário ou em lesões pré-malignas. Nesse contexto, os fibroblastos são considerados um dos principais efetores da fibrose, visto que são células estromais que controlam a integridade do tecido, por meio do remodelamento (através da secreção de MMPs) ou deposição de matriz extracelular (Parsonage et al. 2005; Chandler et al. 2019). Alguns estudos relataram que a fibrose suporta o crescimento do câncer por meio de uma variedade de mecanismos, incluindo a remodelação da matriz extracelular. Em contraste, há evidências que argumentam que a fibrose relacionada ao tumor tem o papel de restringir a proliferação deste. Em modelos que utilizaram células estromais normais, tanto os fibroblastos quanto as células-tronco mesenquimais inibiram o crescimento do câncer (Alkasalias et al. 2014; Chandler et al. 2019).

Os resultados da histologia dos tumores revelaram que, com exceção do grupo pVAXØ, todos os tumores pequenos apresentaram pleomorfismo moderado e fibrose ausente o que poderia indicar que, apesar de pequenos, os tumores dos indivíduos 3 e 4 do nosso grupo controle não imunizado (pVAXØ) não representa necessariamente tumores menos agressivos. Além disso, 60% dos indivíduos desse grupo possuem pleomorfismo intenso e altíssima densidade (1,9 - 2,25g/cm³).

O grupo IP/E7, por outro lado, apesar de conter dois tumores grandes (indivíduos 2 e 3), apresentou a maior taxa de tumores com pleomorfismo

moderado (100% das amostras), seguido pelo grupo E7IP (50% das amostras). Enquanto isso, os demais grupos apresentaram a maioria das amostras com pleomorfismo intenso, indicando um possível efeito protetor ao imunizar os camundongos com o adjuvante li-PADRE, principalmente na primeira dose vacinal, como discutido anteriormente. Além disso, a intensa fibrose observada no indivíduo 4 do grupo IP/E7 pode ser explicada pelo acentuado número de fibroblastos nesse tumor.

Apesar de o grupo E7IP ter apresentado uma grande densidade tumoral – superado apenas pelo grupo controle (pVAXØ) – isto pode estar relacionado a grande quantidade de fibroblastos observada neste grupo, o qual contou com pleomorfismo moderado em metade das amostras. Apesar disto, um tumor deste grupo apresentou uma intensa necrose, o que provavelmente está relacionado com a combinação grande densidade ($1,8 \text{ g/cm}^3$) e grande volume tumoral ($0,52 \text{ cm}^3$) especialmente acentuados nessa amostra (indivíduo 1 - E7IP). Neste sentido, a hipóxia gerada nesses grandes tumores é um fator-chave para o desenvolvimento de necrose, como demonstrado por estudo em carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço localmente avançados e positivos para HPV (Ou et al. 2018).

É importante ressaltar também que o grupo E7IP, apresentou aumento no número de fibroblastos com padrão levemente diferente dos demais. Além disso, metade dos indivíduos (indivíduos 2 e 3) responderam satisfatoriamente a vacina, apresentando uma leve regressão tumoral ao longo dos 24 dias do estudo (**Gráfico 2**), e ainda pleomorfismo moderado (**Tabela 1**), com presença de uma quantidade maior de fibroblastos. Em contraste, na outra metade da amostra deste grupo (indivíduos 1 e 4) foram observados grande e médios volumes tumorais (indivíduos 1 e 4, respectivamente) e intenso pleomorfismo (**Tabela 1**), o que pode ter ocorrido

devido a existência de alguma variabilidade genética intrínseca aos organismos. Desta forma, mais estudos são necessários a fim de compreender melhor as divergências intragrupos encontradas neste estudo.

O projeto proposto faz parte de um conjunto de pesquisas que incluiu uma colaboração com Instituto Nazionale Tumori Regina Elena, em Roma, Itália, sob a supervisão do Dr. Aldo Venuti através de dois programas na modalidade Doutorado Sanduíche no exterior, sendo eles o PDSE (seleção 2018 – Edital nº 47/2017 - Processo: 88881.189738/2018-01) e CAPES - PRINT (seleção 2019 – Edital nº41/2017 - Processo: 88887.467001/2019-00). Após o estágio no exterior, as metodologias aplicadas em Roma, foram implementadas pela doutoranda no biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) através da realização de novos ensaios pré-clínicos, visto que o início e agravamento da pandemia no novo coronavírus – especialmente na Itália em fevereiro de 2020 – coincidiu com o período de seis meses de estágio neste país, não sendo possível desenvolver a pesquisa em sua plenitude no instituto de Roma. Desta forma, ao retorno da doutoranda, um novo experimento foi iniciado no biotério do departamento de antibióticos da UFPE e, devido a problemas de tempo de doutorado e recursos escassos, não foi possível realizar o teste das duas construções vacinais previstas anteriormente (genes E6 e E7). Desta forma, foi possível testar apenas a construção multiepítopo E7 e o adjuvante li-PADRE. Apesar desses obstáculos, o estágio no exterior contribuiu para estabelecer a transferência de tecnologia em vacinas de DNA para a UFPE.

Embora não tenha sido verificada diferença estatística entre os grupos controle e tratados, quando tomados em conjunto, nossos dados apontam uma tendência discreta para um melhor estímulo de resposta imune celular nos grupos

tratados com a vacina E7 adjuvantada com o imunomodulador li-PADRE. Adicionalmente, estudos posteriores com um maior número amostral são necessários para confirmar nossos resultados.

7 CONCLUSÕES

Quanto tomados em conjunto, nossos resultados demonstram que a nossa vacina multiepítopo E7 associada ao imunomodulador li-PADRE pode fornecer alguma proteção contra células do desafio tumoral em modelo pré-clínico, visto que foram observados um discreto aumento de citocinas Th1, menor densidade tumoral e menor pleomorfismo em tumores de animais imunizados com variações deste tratamento. Embora seja apenas uma tendência, estes resultados indicam o potencial imunogênico desta estratégia vacinal para a indução da resposta celular protetiva. Mostramos também que a vacina E7 sozinha não alcançou uma boa performance. Desta forma, o suporte do imunomodulador li-PADRE, principalmente no *prime*, se faz necessário para o reforço da resposta imune. Além disso, melhorias na nossa construção vacinal podem ser realizadas, como a adição de mais epítomos imunogênicos, incluindo aqueles baseados no gene E6 de HPV-16, e a utilização de esquema de *prime-boost* heterólogo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aksoy P, Gottschalk EY and Meneses PI (2017) HPV entry into cells. *Mutat Res* 772:13. doi: 10.1016/J.MRREV.2016.09.004
- Aleman L, Saunier M, Tinoco L, Quirós B, Alvarado-Cabrero I, Alejo M, Joura EA, Maldonado P, Klaustermeier J, Salmerón J et al. (2014) Large contribution of human papillomavirus in vaginal neoplastic lesions: A worldwide study in 597 samples. *Eur J Cancer* 50:2846–2854. doi: 10.1016/j.ejca.2014.07.018
- Alexander J, Sidney J, Southwood S, Ruppert J, Oseroff C, Maewal A, Snoke K, Serra HM, Kubo RT, Sette A et al. (1994) Development of high potency universal DR-restricted helper epitopes by modification of high affinity DR-blocking peptides. *Immunity* 1:751–761. doi: 10.1016/S1074-7613(94)80017-0
- Alkasalias T, Flaberg E, Kashuba V, Alexeyenko A, Pavlova T, Savchenko A, Szekely L, Klein G and Guven H (2014) Inhibition of tumor cell proliferation and motility by fibroblasts is both contact and soluble factor dependent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:17188–17193. doi: 10.1073/PNAS.1419554111
- Ann R and Karl M (2013) The papillomavirus E7 proteins. *Virology* 445:138–168. doi: 10.1016/j.virol.2013.04.013.
- Arcuri M, Cappelletti M, Zampaglione I, Aurisicchio L, Nicosia A, Ciliberto G and Fattori E (2008) Synergistic effect of gene-electro transfer and adjuvant cytokines in increasing the potency of hepatitis C virus genetic vaccination. *J Gene Med* 10:1048–1054. doi: 10.1002/JGM.1217
- Aydin I, Weber S, Snijder B, Samperio Ventayol P, Kühbacher A, Becker M, Day PM, Schiller JT, Kann M, Pelkmans L et al. (2014) Large Scale RNAi Reveals the Requirement of Nuclear Envelope Breakdown for Nuclear Import of Human Papillomaviruses. *PLoS Pathog* 10:e1004162. doi: 10.1371/journal.ppat.1004162
- Bagarazzi ML, Yan J, Morrow MP, Shen X, Parker RL, Lee JC, Giffear M, Pankhong P, Khan AS, Broderick KE et al. (2012) Immunotherapy Against HPV16/18 Generates Potent TH1 and Cytotoxic Cellular Immune Responses. *Sci Transl Med* 4:155ra138. doi: 10.1126/SCITRANSLMED.3004414
- Balsitis S, Dick F, Lee D, Farrell L, Hyde RK, Griep AE, Dyson N and Lambert PF (2005) Examination of the pRb-Dependent and pRb-Independent Functions of E7 In Vivo. *J Virol* 79:11392–11402. doi: 10.1128/JVI.79.17.11392-11402.2005
- Bechtold V, Beard P and Raj K (2003) Human papillomavirus type 16 E2 protein has no effect on transcription from episomal viral DNA. *J Virol* 77:2021–8. doi: 10.1128/jvi.77.3.2021-2028.2003
- Bergmann-Leitner ES and Leitner WW (2015) Vaccination Using Gene-Gun Technology. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). pp 289–302
- Bergmann CC, Yao Q, Ho CK and Buckwold SL (1996) Flanking residues alter antigenicity and immunogenicity of multi-unit CTL epitopes. *J Immunol* 157:3242–9.
- Bhattacharjee B and Sengupta S (2006) CpG methylation of HPV 16 LCR at E2 binding site proximal to P97 is associated with cervical cancer in presence of intact E2. *Virology* 354:280–285. doi: 10.1016/j.virol.2006.06.018
- Bienkowska-Haba M, Patel HD and Sapp M (2009) Target Cell Cyclophilins Facilitate Human Papillomavirus Type 16 Infection. *PLoS Pathog* 5:e1000524. doi: 10.1371/journal.ppat.1000524
- Bienkowska-Haba M, Williams C, Kim SM, Garcea RL and Sapp M (2012) Cyclophilins Facilitate Dissociation of the Human Papillomavirus Type 16 Capsid Protein L1 from

- the L2/DNA Complex following Virus Entry. *J Virol* 86:9875–9887. doi: 10.1128/JVI.00980-12
- Braaten KP and Laufer MR (2008) Human Papillomavirus (HPV), HPV-Related Disease, and the HPV Vaccine. *Rev Obstet Gynecol* 1:2–10.
- Cappelletti M, Zampaglione I, Rizzuto G, Ciliberto G, Monica N La and Fattori E (2003) Gene electro-transfer improves transduction by modifying the fate of intramuscular DNA. *J Gene Med* 5:324–332. doi: 10.1002/jgm.352
- Castellino F and Germain RN (2006) COOPERATION BETWEEN CD4 + AND CD8 + T CELLS: When, Where, and How. *Annu Rev Immunol* 24:519–540. doi: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115825
- Castellsagué X and Muñoz N (2003) Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis--role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst Monogr* 20–8.
- Cernaro V, Lacquaniti A, Donato V, Fazio MR, Buemi A and Buemi M (2012) Fibrosis, regeneration and cancer: what is the link? *Nephrol Dial Transplant* 27:21–27. doi: 10.1093/NDT/GFR567
- Cerqueira C, Samperio Ventayol P, Vogeley C and Schelhaas M (2015) Kallikrein-8 Proteolytically Processes Human Papillomaviruses in the Extracellular Space To Facilitate Entry into Host Cells. *J Virol* 89:7038–7052. doi: 10.1128/JVI.00234-15
- Chandler C, Liu T, Buckanovich R and Coffman L (2019) The double edge sword of fibrosis in cancer. *Transl Res* 209:55. doi: 10.1016/J.TRSL.2019.02.006
- Chaturvedi AK (2010) Beyond Cervical Cancer: Burden of Other HPV-Related Cancers Among Men and Women. *J Adolesc Heal* 46:S20–S26. doi: 10.1016/j.jadohealth.2010.01.016
- Chiarella P, Michele Fazio V and Signori E (2013) Electroporation in DNA Vaccination Protocols Against Cancer. *Curr Drug Metab* 14:291–299. doi: 10.2174/1389200211314030004
- Coban C, Kobiyama K, Aoshi T, Takeshita F, Horii T, Akira S and Ishii KJ (2011) Novel strategies to improve DNA vaccine immunogenicity. *Curr Gene Ther* 11:479–84. doi: 10.2174/156652311798192815
- Cordeiro MN, De Lima R de CP, Paolini F, Melo AR da S, Campos APF, Venuti A and De Freitas AC (2018) Current research into novel therapeutic vaccines against cervical cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 18:365–376. doi: 10.1080/14737140.2018.1445527
- Daftarian P, Mansour M, Benoit AC, Pohajdak B, Hoskin DW, Brown RG and Kast WM (2006) Eradication of established HPV 16-expressing tumors by a single administration of a vaccine composed of a liposome-encapsulated CTL-T helper fusion peptide in a water-in-oil emulsion. *Vaccine* 24:5235–5244. doi: 10.1016/j.vaccine.2006.03.079
- Day PM, Gambhira R, Roden RBS, Lowy DR and Schiller JT (2008) Mechanisms of Human Papillomavirus Type 16 Neutralization by L2 Cross-Neutralizing and L1 Type-Specific Antibodies. *J Virol* 82:4638–4646. doi: 10.1128/JVI.00143-08
- Degen WG, Jansen T and Schijns VE (2003) Vaccine adjuvant technology: from mechanistic concepts to practical applications. *Expert Rev Vaccines* 2:327–335. doi: 10.1586/14760584.2.2.327
- del Campo JM, Prat A, Gil-Moreno A, Pérez J and Parera M (2008) Update on novel therapeutic agents for cervical cancer. *Gynecol Oncol* 110:S72–S76. doi: 10.1016/j.ygyno.2008.04.016

- Desmedt M, Rottiers P, Doms H, Fiers W and Grooten J (1998) Macrophages induce cellular immunity by activating Th1 cell responses and suppressing Th2 cell responses. *J Immunol* 160:5300–8.
- Dolenc I, Seemüller E and Baumeister W (1998) Decelerated degradation of short peptides by the 20S proteasome. *FEBS Lett* 434:357–61. doi: 10.1016/s0014-5793(98)01010-2
- Doorbar J (2005) The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol* 32:7–15. doi: 10.1016/j.jcv.2004.12.006
- Doorslaer K Van and Dillner J (2019) The Launch of an International Animal Papillomavirus Reference Center. *Viruses*. doi: 10.3390/V11010055
- Drolet M, Bénard É, Pérez N, Brisson M, Ali H, Boily M-C, Baldo V, Brassard P, Brotherton JML, Callander D et al. (2019) Population-level impact and herd effects following the introduction of human papillomavirus vaccination programmes: updated systematic review and meta-analysis. *Lancet* 6736:1–13. doi: 10.1016/s0140-6736(19)30298-3
- Dubensky TW and Reed SG (2010) Adjuvants for cancer vaccines. *Semin Immunol* 22:155–161. doi: 10.1016/j.smim.2010.04.007
- Dunham SP (2002) The application of nucleic acid vaccines in veterinary medicine. *Res Vet Sci* 73:9–16.
- Dvorak HF (2015) Tumors: Wounds that do not heal--Redux. *Cancer Immunol Res* 3:1. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0209
- Efreanova M, Finotello F, Rieder D and Trajanoski Z (2017) Neoantigens Generated by Individual Mutations and Their Role in Cancer Immunity and Immunotherapy. *Front Immunol* 8:1679. doi: 10.3389/fimmu.2017.01679
- Egawa N, Egawa K, Griffin H and Doorbar J (2015) Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia. *Viruses* 7:3863–3890. doi: 10.3390/v7072802
- El Awady MK, Kaplan JB, O'Brien SJ and Burk RD (1987) Molecular analysis of integrated human papillomavirus 16 sequences in the cervical cancer cell line SiHa. *Virology* 159:389–398. doi: 10.1016/0042-6822(87)90478-8
- Estêvão D, Costa NR, Gil da Costa RM and Medeiros R (2019) Hallmarks of HPV carcinogenesis: The role of E6, E7 and E5 oncoproteins in cellular malignancy. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech* 1862:153–162. doi: 10.1016/j.bbagr.2019.01.001
- Feltkamp MCW, Smits HL, Vierboom MPM, Minnaar RP, De Jongh BM, Drijfhout JW, Schegget J Ter, Melief CJM and Kast WM (1993) Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope-containing peptide protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16-transformed cells. *Eur J Immunol* 23:2242–2249. doi: 10.1002/eji.1830230929
- Galaine J, Borg C, Godet Y and Adotévi O (2015) Interest of Tumor-Specific CD4 T Helper 1 Cells for Therapeutic Anticancer Vaccine. *Vaccines* 3:490–502. doi: 10.3390/vaccines3030490
- Garland SM, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, Perez G, Harper DM, Leodolter S, Tang GWK, Ferris DG, Steben M, Bryan J et al. (2007) Quadrivalent Vaccine against Human Papillomavirus to Prevent Anogenital Diseases. *N Engl J Med* 356:1928–1943. doi: 10.1056/NEJMoa061760
- Gottschalk EY and Meneses PI (2015) A Dual Role for the Nonreceptor Tyrosine Kinase Pyk2 during the Intracellular Trafficking of Human Papillomavirus 16. *J Virol* 89:9103–9114. doi: 10.1128/JVI.01183-15

- Graham SV (2017) The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review. *Clin Sci* 131:2201–2221. doi: 10.1042/CS20160786
- Graham S V (2010) Human papillomavirus: gene expression, regulation and prospects for novel diagnostic methods and antiviral therapies. *Future Microbiol* 5:1493–1506. doi: 10.2217/fmb.10.107
- Hammer A, Rositch A, Qeadan F, Gravitt PE and Blaakaer J (2016) Age-specific prevalence of HPV16/18 genotypes in cervical cancer: A systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer* 138:2795–2803. doi: 10.1002/ijc.29959
- Harden ME and Munger K (2017) Human papillomavirus molecular biology. *Mutat Res - Rev Mutat Res* 772:3–12. doi: 10.1016/j.mrrev.2016.07.002
- Heldin C-H, Rubin K, Pietras K and Östman A (2004) High interstitial fluid pressure — an obstacle in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2004 410 4:806–813. doi: 10.1038/nrc1456
- Herfs M, Yamamoto Y, Laury A, Wang X, Nucci MR, McLaughlin-Drubin ME, Münger K, Feldman S, McKeon FD, Xian W et al. (2012) A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:10516–10521. doi: 10.1073/pnas.1202684109
- Ho GYF, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ and Burk RD (1998) Natural History of Cervicovaginal Papillomavirus Infection in Young Women. *N Engl J Med* 338:423–428. doi: 10.1056/NEJM199802123380703
- Hu Z, Zhu D, Wang W, Li W, Jia W, Zeng X, Ding W, Yu L, Wang X, Wang L et al. (2015) Genome-wide profiling of HPV integration in cervical cancer identifies clustered genomic hot spots and a potential microhomology-mediated integration mechanism. *Nat Genet* 47:158–163. doi: 10.1038/ng.3178
- Hung C-F, Tsai Y-C, He L and Wu T-C (2007) DNA Vaccines Encoding Ii-PADRE Generates Potent PADRE-specific CD4+ T-Cell Immune Responses and Enhances Vaccine Potency. *Mol Ther* 15:1211–1219. doi: 10.1038/sj.mt.6300121
- INCA (2019) Estimativa Incidência de Câncer no Brasil - 2020. Ministério da Saúde, Inst Nac do Câncer, Bras. doi: 978-85-7318-389-4
- Ishioka GY, Fikes J, Hermanson G, Livingston B, Crimi C, Qin M, del Guercio MF, Oseroff C, Dahlberg C, Alexander J et al. (1999) Utilization of MHC class I transgenic mice for development of minigene DNA vaccines encoding multiple HLA-restricted CTL epitopes. *J Immunol* 162:3915–25.
- Jang SH, Wientjes MG and Au JL-S (2001) Enhancement of Paclitaxel Delivery to Solid Tumors by Apoptosis-Inducing Pretreatment: Effect of Treatment Schedule. *J Pharmacol Exp Ther* 296:1035–42.
- Ji H, Wang T-L, Chen C-H, Pai SI, Hung C-F, Lin K-Y, Kurman RJ, Pardoll DM and Wu T-C (1999) Targeting Human Papillomavirus Type 16 E7 to the Endosomal/Lysosomal Compartment Enhances the Antitumor Immunity of DNA Vaccines against Murine Human Papillomavirus Type 16 E7-Expressing Tumors. *Hum Gene Ther* 10:2727–2740. doi: 10.1089/10430349950016474
- Kamper N, Day PM, Nowak T, Selinka H-C, Florin L, Bolscher J, Hilbig L, Schiller JT and Sapp M (2006) A Membrane-Destabilizing Peptide in Capsid Protein L2 Is Required for Egress of Papillomavirus Genomes from Endosomes. *J Virol* 80:759–768. doi: 10.1128/JVI.80.2.759-768.2006
- Kim TJ, Jin HT, Hur SY, Yang HG, Seo YB, Hong SR, Lee CW, Kim S, Woo JW, Park KS et al. (2014) Clearance of persistent HPV infection and cervical lesion by therapeutic DNA vaccine in CIN3 patients. *Nat Commun* 5:1–14. doi: 10.1038/ncomms6317

- Kobayashi H, Watanabe R and Choyke PL (2014) Improving Conventional Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effects; What Is the Appropriate Target? *Theranostics* 4:81. doi: 10.7150/THNO.7193
- Kocjan BJ, Bzhalava D, Forslund O, Dillner J and Poljak M (2015) Molecular methods for identification and characterization of novel papillomaviruses. *Clin Microbiol Infect* 21:808–816. doi: 10.1016/j.cmi.2015.05.011
- Kreiter S, Vormehr M, van de Roemer N, Diken M, Löwer M, Diekmann J, Boegel S, Schrörs B, Vascotto F, Castle JC et al. (2015) Mutant MHC class II epitopes drive therapeutic immune responses to cancer. *Nature* 520:692–696. doi: 10.1038/nature14426
- Lambricht L, Lopes A, Kos S, Sersa G, Pr  at V and Vandermeulen G (2016) Clinical potential of electroporation for gene therapy and DNA vaccine delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 13:295–310. doi: 10.1517/17425247.2016.1121990
- Lin C-T, Hung C-F, Juang J, He L, Lin K-Y, WooKim T and Wu T-C (2003) Boosting with recombinant vaccinia increases HPV-16 E7-Specific T cell precursor frequencies and antitumor effects of HPV-16 E7-Expressing sindbis virus replicon particles. *Mol Ther* 8:559–566. doi: 10.1016/S1525-0016(03)00238-7
- Lopes A, Vandermeulen G and Pr  at V (2019) Cancer DNA vaccines: current preclinical and clinical developments and future perspectives. *J Exp Clin Cancer Res* 38:1–24. doi: 10.1186/s13046-019-1154-7
- Lopes A, Vanvarenberg K, Pr  at V and Vandermeulen G (2017) Codon-Optimized P1A-Encoding DNA Vaccine: Toward a Therapeutic Vaccination against P815 Mastocytoma. *Mol Ther - Nucleic Acids* 8:404–415. doi: 10.1016/j.omtn.2017.07.011
- Maglennon GA, McIntosh P and Doorbar J (2011) Persistence of viral DNA in the epithelial basal layer suggests a model for papillomavirus latency following immune regression. *Virology* 414:153–163. doi: 10.1016/j.virol.2011.03.019
- Manawapat A, Stubenrauch F, Russ R, Munk C, Kjaer SK and Iftner T (2012) Physical state and viral load as predictive biomarkers for persistence and progression of HPV16-positive cervical lesions: results from a population based long-term prospective cohort study. *Am J Cancer Res* 2:192–203.
- Martínez-Ramírez I, Carrillo-García A, Contreras-Paredes A, Ortiz-Sánchez E, Cruz-Gregorio A and Lizano M (2018) Regulation of cellular metabolism by high-risk human papillomaviruses. *Int J Mol Sci*. doi: 10.3390/ijms19071839
- Martinez-Zapien D, Ruiz FX, Poirson J, Mitschler A, Ramirez J, Forster A, Cousido-Siah A, Masson M, Pol S Vande, Podjarny A et al. (2016) Structure of the E6/E6AP/p53 complex required for HPV-mediated degradation of p53. *Nature* 529:541–545. doi: 10.1038/nature16481
- Massimi P, Shai A, Lambert P and Banks L (2008) HPV E6 degradation of p53 and PDZ containing substrates in an E6AP null background. *Oncogene* 27:1800–1804. doi: 10.1038/sj.onc.1210810
- McBride AA (2013) The Papillomavirus E2 proteins. *Virology* 445:57–79. doi: 10.1016/j.virol.2013.06.006
- McBride AA and Warburton A (2017) The role of integration in oncogenic progression of HPV-associated cancers. *PLOS Pathog* 13:e1006211. doi: 10.1371/journal.ppat.1006211
- Melief CJM and van der Burg SH (2008) Immunotherapy of established (pre)malignant disease by synthetic long peptide vaccines. *Nat Rev Cancer* 8:351–360. doi: 10.1038/nrc2373
- Moody CA and Laimins LA (2010) Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer* 10:550–560. doi: 10.1038/nrc2886

- Morrow MP, Yan J and Sardesai NY (2013) Human papillomavirus therapeutic vaccines: Targeting viral antigens as immunotherapy for precancerous disease and cancer. *Expert Rev Vaccines* 12:271–283. doi: 10.1586/erv.13.23
- Nezafat N, Ghasemi Y, Javadi G, Khoshnoud MJ and Omidinia E (2014) A novel multi-epitope peptide vaccine against cancer: An in silico approach. *J Theor Biol* 349:121–134. doi: 10.1016/j.jtbi.2014.01.018
- Nezafat N, Sadraeian M, Rahbar MR, Khoshnoud MJ, Mohkam M, Gholami A, Banihashemi M and Ghasemi Y (2015) Production of a novel multi-epitope peptide vaccine for cancer immunotherapy in TC-1 tumor-bearing mice. *Biologicals* 43:11–17. doi: 10.1016/j.biologicals.2014.11.001
- Ojesina AI, Lichtenstein L, Freeman SS, Peadarallu CS, Imaz-Rosshandler I, Pugh TJ, Cherniack AD, Ambrogio L, Cibulskis K, Bertelsen B et al. (2014) Landscape of genomic alterations in cervical carcinomas. *Nature* 506:371–375. doi: 10.1038/nature12881
- Ostör AG (1993) Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol* 12:186–92.
- Ou D, Garberis I, Adam J, Blanchard P, Nguyen F, Levy A, Casiraghi O, Gorphe P, Breuskin I, Janot F et al. (2018) Prognostic value of tissue necrosis, hypoxia-related markers and correlation with HPV status in head and neck cancer patients treated with bio- or chemo-radiotherapy. *Radiother Oncol* 126:116–124. doi: 10.1016/J.RADONC.2017.10.007
- Oyervides-Muñoz MA, Pérez-Maya AA, Rodríguez-Gutiérrez HF, Gómez-Macias GS, Fajardo-Ramírez OR, Treviño V, Barrera-Saldaña HA and Garza-Rodríguez ML (2018) Understanding the HPV integration and its progression to cervical cancer. *Infect Genet Evol* 61:134–144. doi: 10.1016/j.meegid.2018.03.003
- Paavonen J, Naud P, Salmerón J, Wheeler CM, Chow SN, Apter D, Kitchener H, Castellsague X, Teixeira JC, Skinner SR et al. (2009) Efficacy of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by oncogenic HPV types (PATRICIA): final analysis of a double-blind, randomised study in young women. *Lancet* 374:301–314. doi: 10.1016/S0140-6736(09)61248-4
- Pagès F, Galon J, Dieu-Nosjean M, Tartour E, Sautès-Fridman C and Fridman W (2010) Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene* 29:1093–1102. doi: 10.1038/ONC.2009.416
- Paolini F, Curzio G, Cordeiro MN, Massa S, Mariani L, Pimpinelli F, de Freitas AC, Franconi R and Venuti A (2017) HPV 16 E5 oncoprotein is expressed in early stage carcinogenesis and can be a target of immunotherapy. *Hum Vaccines Immunother* 13:291–297. doi: 10.1080/21645515.2017.1264777
- Park JY, Jin D-H, Lee C-M, Jang MJ, Lee SY, Shin HS, Chung YH, Kim KY, Kim SS, Lee WB et al. (2010) CD4+ TH1 Cells Generated by Ii-PADRE DNA at Prime Phase Are Important to Induce Effectors and Memory CD8+ T Cells. *J Immunother* 33:510–522. doi: 10.1097/CJI.0b013e3181d75cef
- Parsonage G, Filer A, Haworth O, Nash G, Rainger G, Salmon M and Buckley C (2005) A stromal address code defined by fibroblasts. *Trends Immunol* 26:150–156. doi: 10.1016/J.IT.2004.11.014
- Pavšelj N and Prétat V (2005) DNA electrotransfer into the skin using a combination of one high- and one low-voltage pulse. *J Control Release* 106:407–415. doi: 10.1016/j.jconrel.2005.05.003

- Peng S, Ji H, Trimble C, He L, Tsai Y-C, Yeatermeyer J, Boyd DAK, Hung C-F and Wu T-C (2004) Development of a DNA Vaccine Targeting Human Papillomavirus Type 16 Oncoprotein E6. *J Virol* 78:8468–8476. doi: 10.1128/JVI.78.16.8468-8476.2004
- Peng S, Qiu J, Yang A, Yang B, Jeang J, Wang JW, Chang Y-N, Brayton C, Roden RBS, Hung C-F et al. (2016) Optimization of heterologous DNA-prime, protein boost regimens and site of vaccination to enhance therapeutic immunity against human papillomavirus-associated disease. *Cell Biosci* 2016 61 6:1–14. doi: 10.1186/S13578-016-0080-Z
- Protti MP, Monte LD, Lullo GD, Di Lullo G and Lullo GD (2014) Tumor antigen-specific CD4 + T cells in cancer immunity: from antigen identification to tumor prognosis and development of therapeutic strategies. *Tissue Antigens* 83:237–246. doi: 10.1111/tan.12329
- Pyeon D, Pearce SM, Lank SM, Ahlquist P and Lambert PF (2009) Establishment of Human Papillomavirus Infection Requires Cell Cycle Progression. *PLoS Pathog* 5:e1000318. doi: 10.1371/journal.ppat.1000318
- Rumfield CS, Pellom ST, Il YMM, Schlom J and Jochems C (2020) Original research: Immunomodulation to enhance the efficacy of an HPV therapeutic vaccine. *J Immunother Cancer*. doi: 10.1136/JITC-2020-000612
- Sanders CM and Stenlund A (2000) Transcription Factor-dependent Loading of the E1 Initiator Reveals Modular Assembly of the Papillomavirus Origin Melting Complex. *J Biol Chem* 275:3522–3534. doi: 10.1074/jbc.275.5.3522
- Schiffman M, Herrero R, Hildesheim A, Sherman ME, Bratti M, Wacholder S, Alfaro M, Hutchinson M, Morales J, Greenberg MD et al. (2000) HPV DNA Testing in Cervical Cancer Screening. *JAMA* 283:87. doi: 10.1001/jama.283.1.87
- Serrano B, de Sanjosé S, Tous S, Quiros B, Muñoz N, Bosch X and Alemany L (2015) Human papillomavirus genotype attribution for HPVs 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 and 58 in female anogenital lesions. *Eur J Cancer* 51:1732–1741. doi: 10.1016/j.ejca.2015.06.001
- Shedlock DJ and Weiner DB (2000) DNA vaccination: antigen presentation and the induction of immunity. *J Leukoc Biol* 68:793–806.
- Songock WK, Kim S, Bodily JM and State L (2017) The human papillomavirus E7 oncoprotein as a regulator of transcription. *Virus Res* 56–75. doi: 10.1016/j.virusres.2016.10.017.The
- Srivastava A, Srivastava S, Bansal C and Misra J (2013) Diagnostic importance of AgNOR pleomorphism in cervical carcinogenesis. *Ecancermedicallscience*. doi: 10.3332/ECANCER.2013.287
- Stanley M (2010) Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecol Oncol* 117:S5–S10. doi: 10.1016/j.ygyno.2010.01.024
- Sun B, Hyun H, Li L and Wang AZ (2020) Harnessing nanomedicine to overcome the immunosuppressive tumor microenvironment. *Acta Pharmacol Sin* 2020 417 41:970–985. doi: 10.1038/s41401-020-0424-4
- Sung H, Ferlay J, Siegel R, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A and Bray F (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 71:209–249. doi: 10.3322/CAAC.21660
- Surviladze Z, Dziduszko A and Ozburn MA (2012) Essential roles for soluble virion-associated heparan sulfonated proteoglycans and growth factors in human papillomavirus infections. *PLoS Pathog* 8:e1002519. doi: 10.1371/journal.ppat.1002519

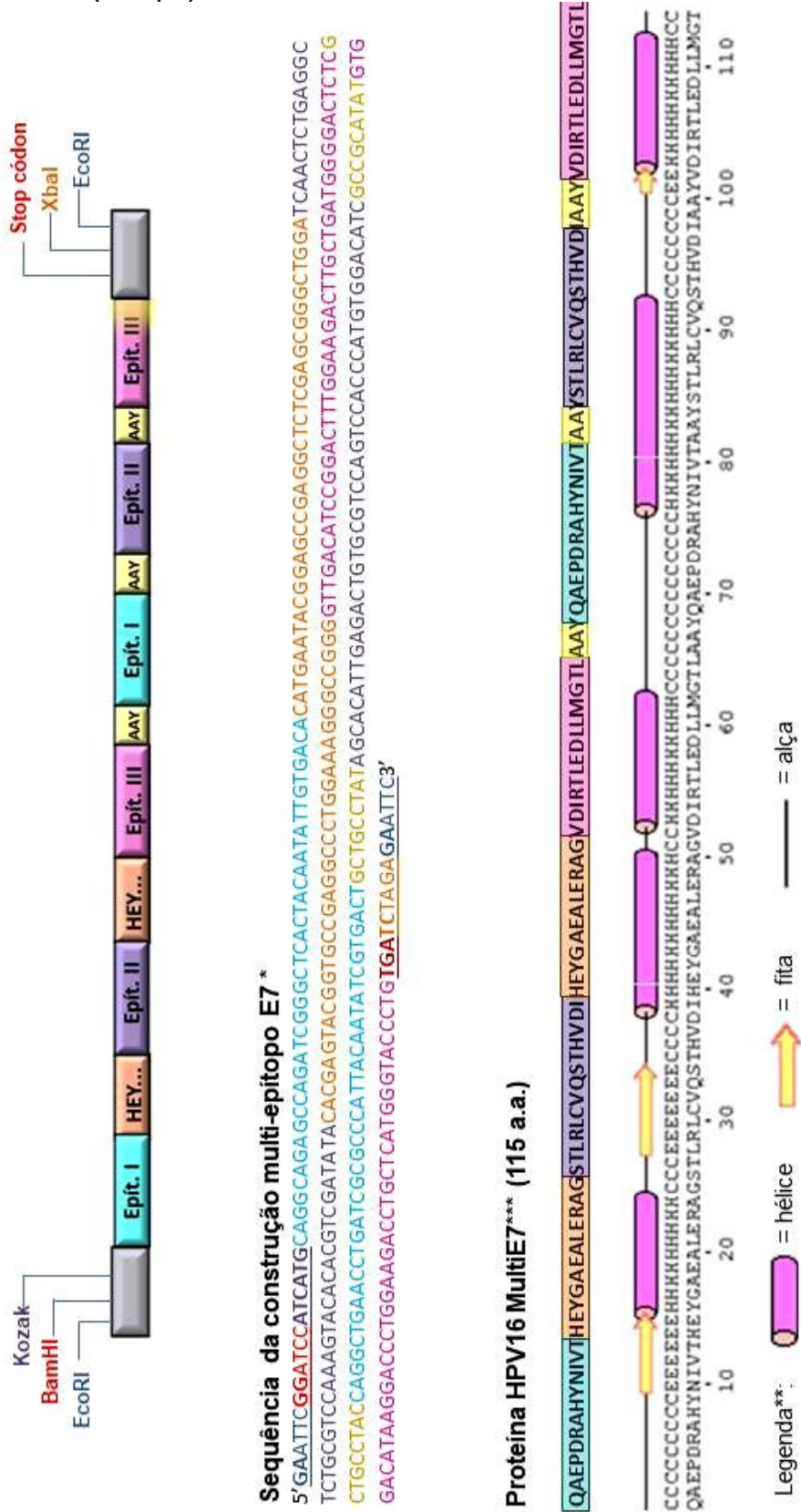
- Talebi S, Bolhassani A, Sadat SM, Vahabpour R, Agi E and Shahbazi S (2017) Hp91 immunoadjuvant: An HMGB1-derived peptide for development of therapeutic HPV vaccines. *Biomed Pharmacother* 85:148–154. doi: 10.1016/j.biopha.2016.11.115
- Trimble CL, Morrow MP, Kraynyak kimberly A, Shen X, Dallas M, Yan J and Edwards J (2015) Safety, efficacy, and immunogenicity of VGX-3100, a therapeutic synthetic DNA vaccine targeting human papillomavirus 16 and 18 E6 and E7 proteins for cervical intraepithelial neoplasia 2/3: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2b trial. *Lancet* 386:2078–2088. doi: 10.1016/S0140-6736(15)00239-1.
- Uebel S, Kraas W, Kienle S, Wiesmüller KH, Jung G and Tampé R (1997) Recognition principle of the TAP transporter disclosed by combinatorial peptide libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:8976–8981. doi: 10.1073/pnas.94.17.8976
- van den Berg JH, Oosterhuis K, Schumacher TNM, Haanen JBAG and Bins AD (2014) Intradermal Vaccination by DNA Tattooing. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). pp 131–140
- Vande Pol SB and Klingelutz AJ (2013) Papillomavirus E6 oncoproteins. *Virology* 445:115–137. doi: 10.1016/j.virol.2013.04.026
- Villa LL, Costa RLR, Petta CA, Andrade RP, Paavonen J, Iversen O-E, Olsson S-E, Høye J, Steinwall M, Riis-Johannessen G et al. (2006) High sustained efficacy of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus types 6/11/16/18 L1 virus-like particle vaccine through 5 years of follow-up. *Br J Cancer* 95:1459–1466. doi: 10.1038/sj.bjc.6603469
- Vita R, Mahajan S, Overton JA, Dhanda SK, Martini S, Cantrell JR, Wheeler DK, Sette A and Peters B (2019) The Immune Epitope Database (IEDB): 2018 update. *Nucleic Acids Res* 47:D339–D343. doi: 10.1093/nar/gky1006
- Wagner E, Kircheis R and Walker GF (2004) Targeted nucleic acid delivery into tumors: new avenues for cancer therapy. *Biomed Pharmacother* 58:152–161. doi: 10.1016/j.biopha.2004.01.003
- Walboomers JMM, Jacobs M V., Manos MM, Bosch FX and Kummer JA (1999) Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 189:12–19.
- Welters MJP, Kenter GG, Piersma SJ, Vloon APG, Lowik MJG, Berends-van der Meer DMA, Drijfhout JW, Valentijn ARPM, Wafelman AR, Oostendorp J et al. (2008) Induction of Tumor-Specific CD4+ and CD8+ T-Cell Immunity in Cervical Cancer Patients by a Human Papillomavirus Type 16 E6 and E7 Long Peptides Vaccine. *Clin Cancer Res* 14:178–187. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1880
- Westrich JA, Warren CJ and Pyeon D (2017) HHS Public Access. *Virus Res* 21–33. doi: 10.1002/cncr.27633.
- Winer RL, Lee S-K, Hughes JP, Adam DE, Kiviat NB and Koutsky LA (2003) Genital Human Papillomavirus Infection: Incidence and Risk Factors in a Cohort of Female University Students. *Am J Epidemiol* 157:218–226. doi: 10.1093/aje/kwf180
- Yankauckas MA, MORROW JE, PARKER SE, ABAI A, RHODES GH, DWARKI VJ and GROMKOWSKI SH (1993) Long-Term Anti-Nucleoprotein Cellular and Humoral Immunity Is Induced by Intramuscular Injection of Plasmid DNA Containing NP Gene. *DNA Cell Biol* 12:771–776. doi: 10.1089/dna.1993.12.771
- Yasaghi M and Mahdavi M (2016) Potentiation of human papilloma vaccine candidate using naloxone/alum mixture as an adjuvant: increasing immunogenicity of HPV-16E7d vaccine. *Iran J Basic Med Sci* 19:1003.
- Yeo-Teh N, Ito Y and Jha S (2018) High-Risk Human Papillomaviral Oncogenes E6 and E7 Target Key Cellular Pathways to Achieve Oncogenesis. *Int J Mol Sci* 19:1706. doi: 10.3390/ijms19061706

- Zehbe I and Wilander E (1997) Human papillomavirus infection and invasive cervical neoplasia: a study of prevalence and morphology. *J Pathol* 181:270–275.
- Zeng D-Q, Yu Y-F, Ou Q-Y, Li X-Y, Zhong R-Z, Xie C-M and Hu Q-G (2016) Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes for clinical therapeutic research in patients with non-small cell lung cancer. *Oncotarget* 7:13765. doi: 10.18632/ONCOTARGET.7282
- Zur Hausen H (1976) Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer Res* 36:1–2.

APÊNDICE A – REPRESENTAÇÃO DAS CONSTRUÇÕES VACINAIS.

MULTI E7 (374 pb)

Representação esquemática da construção multi-epitopo E7



*Gene otimizado para expressão em *Mus musculus*;
**Gráfico PSIPRED para a predição de estrutura secundária da proteína HPV16 MultiE7;
***Ept. I: QAEPRAHYNIVT Ept. II: STLRVCVQSTHVDI Ept. III: VDIRTLEDLLMGTL

APÊNDICE B – COLABORAÇÃO EM PUBLICAÇÃO DE ARTIGO DE REVISÃO SOBRE VACINAS TERAPÊUTICAS CONTRA O CÂNCER CERVICAL.

EXPERT REVIEW OF ANTICANCER THERAPY, 2018
https://doi.org/10.1080/14737140.2018.1445527



REVIEW



Current research into novel therapeutic vaccines against cervical cancer

Marcelo Nazário Cordeiro^a, Rita de Cássia Pereira De Lima^a, Francesca Paolini^b, Alanne Rayssa da Silva Melo^a, Ana Paula Ferreira Campos^a, Aldo Venuti^{b*} and Antonio Carlos De Freitas^{a*}

^aLaboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental – LEMTE, Brazil Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Brazil; ^bHPV-Unit UOSD Immunology and Tumor Immunotherapy, IRCCS Regina Elena National Cancer Institute, Rome, Italy

ABSTRACT

Introduction: Cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia (CIN) are well-known outcomes of a human papillomavirus (HPV) infection. Viral oncogenes expressions like E6, E7, and, recently recognized E5, lead to HPV-related malignant progression. Although HPV prevention by powerful vaccines against most frequent and oncogenic genotypes is feasible, current treatment against cervical neoplasia is distant from an ideal one. In addition, late diagnosis is commonly associated with a poor prognosis. On top of that, radiotherapy, chemotherapy, or surgery are less effective in high-grade lesions.

Areas covered: Due to their peculiarities, HPV oncogenes represent an excellent target for cancer immunotherapy. Safety, efficacy, and potential immunogenicity are features achieved by DNA vaccines targeting HPV. The literature search has indicated that genetic immunotherapy is becoming a pharmacological tool and therapeutic option against cervical disease, as more and more DNA vaccines are reaching clinical trial phases.

Expert commentary: Among some of the promising results, a phase II randomized trial showed a clinical activity of a nucleic acid-based vaccine in HPV16 or HPV18 positive CIN patients. The concept of a synergic combination of anti-HPV DNA vaccines with radiotherapy, chemotherapy, sophisticated delivery methods, immunomodulators or immune adjuvants opens a new and interesting perspective in cervical malignancy treatment.

ARTICLE HISTORY

Received 8 November 2017
Accepted 22 February 2018

KEYWORDS

Human papillomavirus;
cervical cancer; therapeutic
vaccines; immunotherapy;
DNA vaccines; HPV

1. Introduction

Spontaneous regression of tumors has been attributed to a reactivation of immune response mechanisms, which some of them are not necessarily specific against tumor cells. In fact, this regression can be elicited by the defensive reaction resulting from the presence of uncorrelated pathogens, such as viruses, bacteria, fungi, and protozoa. Some of the first anti-tumor immunotherapeutic attempts were based on non-specific immunostimulatory approaches [1], from which the concept of therapeutic vaccines was developed.

Vaccines are developed as preventive measures. Primarily, vaccines are immunity inducers by either humoral or cellular ways. Their role is to prepare the immune system to attack pathogens before establishing a productive infection or another health menace. The protective effect, therefore, depends on the adequate production of highly specific neutralizing antibodies or activation of specialized cells to immediate recognition and attack to infected cells. However, defense against immune-evasive viruses, such as high-risk human papillomaviruses (HPV), or against epidermal/mucosal tumors, as observed in HPV-related genital warts, relies on both a strong cytolytic response of CD8⁺ lymphocytes [2] as well as a specific and long-term CD4⁺ helper lymphocytes response [3]. Despite the fact that anti-HPV prophylactic

vaccines can provide a significant impact on cervical cancer incidence [4], control measures against high-disseminated HPVs still require therapeutic alternatives. Therapeutic vaccines, such as DNA and RNA-based vaccines through genetic manipulation and synthetic long peptides, allowed to design immunostimulatory strategies against virus-infected and/or tumor cells antigens. Gene therapy appears to be one of the most promising tools to induce strong effective immune responses and, therefore, this review will be focused on DNA vaccine immunotherapy. Briefly, this approach consists of *in vivo* transfection of antigen-expressing recombinant plasmids or viral vectors into key recognition cells, namely local dendritic cells (major therapy target), or even muscle cells (cross-priming), allowing activation pathways of cytolytic and helper T cells responses. Consequently, choosing the appropriate antigen to be encoded into a DNA vaccine is the most important determinant of a successful approach. Other key features of a genetic vaccine are the level of antigen expression in the target cell, its post-translational processing, and its effective binding to lymphocyte cell family receptors. Furthermore, the immune response is modulated against tumor cells or even oncogenic virus host cells at a level of specificity and efficacy still rarely achieved.

Therapeutic vaccine research is growing up for the need of innovative approaches toward anti-tumor therapy in order to

CONTACT Aldo Venuti aldo.venuti@ifo.gov.it HPV-Unit UOSD Tumor Immunology and Immunotherapy, Regina Elena National Cancer Institute, Rome, Italy

*These authors contributed equally to this work.

APÊNDICE C – COLABORAÇÃO EM PUBLICAÇÃO DE ARTIGO DE REVISÃO SOBRE INFECÇÕES POR CORONAVÍRUS NA GRAVIDEZ E DESENVOLVIMENTO FETAL.

Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction xxx (2019) xxx–xxx



Available online at
ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com/en



Review

SARS-CoV, MERS-CoV and SARS-CoV-2 infections in pregnancy and fetal development

Guilherme Antonio de Souza Silva^a, Suellen Pedrosa da Silva^b,
Marcos Aurélio Santos da Costa^c, Abdênego Rodrigues da Silva^b,
Robson Raion de Vasconcelos Alves^b, Fernanda das Chagas Ângelo Mendes Tenório^c,
Alanne Rayssa da Silva Melo^d, Antonio Carlos de Freitas^d,
Cristiane Moutinho Lagos de Melo^{a,*}

^aLaboratory of Immunological and Antitumor Analysis, Department of Antibiotics, Bioscience Center, Federal University of Pernambuco, Brazil

^bLaboratory of Protein Biochemistry, Department of Biochemistry, Bioscience Center, Federal University of Pernambuco, Brazil

^cLaboratory of Histology, Department of Histology and Embryology, Bioscience Center, Federal University of Pernambuco, Brazil

^dLaboratory of Molecular Studies and Experimental Therapy, Department of Genetics, Bioscience Center, Federal University of Pernambuco, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 May 2020

Received in revised form 11 June 2020

Accepted 24 June 2020

Available online xxx

Keywords:

2019-nCoV

Pregnancy

Pandemic

SARS

Newborns

ABSTRACT

Recently, in China, in 2019, a new type of disease has arisen caused by a new strain of coronavirus, the SARS-CoV-2 virus, considered extremely worrying due to its high infectivity power and the easy ability to spread geographically. For patients in general, the clinical features resulting from respiratory syndromes can trigger an asymptomatic condition. However, 25 % of patients infected by SARS-CoV-2 can progress to severity. Pregnant women are an unknown field in this complex process, and although they have symptoms similar to non-pregnant women, some points should be considered, such as complications during pregnancy and postpartum. Thus, the aim of this study was to understand the consequences of pregnancy and fetal development, caused by infections by the SARS-CoV, MERS-CoV and SARS-CoV-2 viruses. Among the aforementioned infections, MERS-CoV seems to be the most dangerous for newborns, inducing high blood pressure, pre-eclampsia, pneumonia, acute renal failure, and multiple organ failure in mother. This also causes a higher occurrence of emergency cesarean deliveries and premature births, in addition, some deaths of mothers and fetuses were recorded. Meanwhile, SARS-CoV and SARS-CoV-2 appear to have less severe symptoms. Furthermore, although a study found the ACE2 receptor, used by SARS-CoV-2, widely distributed in specific cell types of the maternal-fetal interface, there is no evidence of vertical transmission for any of the coronaviruses. Thus, the limited reported obstetric cases alert to the need for advanced life support for pregnant women infected with coronaviruses and to the need for further investigation for application in clinical practice.

© 2020 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	00
2. Methodology	00
3. Epidemiological overview of infections by SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2	00
4. Characterization of viral particles and their cellular interactions	00
5. Immune response to MERS-CoV, SARS-CoV and SARS-CoV-2 infection	00
6. Clinical aspects in pregnant women infected with MERS-CoV, SARS-CoV and SARS-CoV-2 and the influence on fetal development	00
7. Treatment strategies	00

* Corresponding author at: Department of Antibiotics, Federal University of Pernambuco, P.O. Box: 50740-525, Recife, Brazil.

E-mail addresses: guilherme.assufpe@gmail.com (G.A. de Souza Silva), suellenpedrosasilva@gmail.com (S.P. da Silva), marcosxp17@gmail.com (M.A.S. da Costa), rodriguesabdenego@gmail.com (A.R. da Silva), robson.raion@gmail.com (R.R. de Vasconcelos Alves), fcas14@hotmail.com (Ed.C. Ângelo Mendes Tenório), rayssa.biologia@hotmail.com (A.R. da Silva Melo), acfreitas.ufpe@gmail.com (A.C. de Freitas), cristiane.moutinho@ufpe.br (C.M. Lagos de Melo).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jogoh.2020.101846>

2468-7847/© 2020 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Please cite this article in press as: G.A. de Souza Silva, et al., SARS-CoV, MERS-CoV and SARS-CoV-2 infections in pregnancy and fetal development, J Gynecol Obstet Hum Reprod (2020), <https://doi.org/10.1016/j.jogoh.2020.101846>

APÊNDICE D – COLABORAÇÃO EM PUBLICAÇÃO DE ARTIGO DE REVISÃO SOBRE A REALIDADE BRASILEIRA DURANTE O INÍCIO DO SURTO DE PANDEMIA DA COVID-19.



An Acad Bras Cienc (2020) 92(4): e20200709 DOI 10.1590/0001-3765202020200709
 Anais da Academia Brasileira de Ciências | *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*
 Printed ISSN 0001-3765 | Online ISSN 1678-2690
 www.scielo.br/aabc | www.fb.com/aabcjournal

HEALTH SCIENCES

COVID-19 pandemic outbreak: the Brazilian reality from the first case to the collapse of health services

CRISTIANE M.L. DE MELO, GUILHERME A.S. SILVA, ALANNE R.S. MELO &
 ANTÔNIO C. DE FREITAS

Abstract: Coronavirus is associated with several infectious diseases that cause outbreaks in humans, such as SARS in 2002-2003 and MERS in 2012. In December 2019, COVID-19, promoted by the SARS-CoV-2 virus, was first reported in Wuhan (China) as a new coronavirus disease. This outbreak quickly reached a pandemic status, affecting at least 185 countries and territories to date on all continents. The first case of COVID-19 reported in São Paulo city (Brazil) occurred in February 26th. Days later, 182 suspected cases in 16 states were being monitored. In May 30th, 514,849 cases and 29,314 deaths were confirmed in Brazil comprising all 26 states and Federal District. The primary measure in order to contain the spread of SARS-CoV-2 involved social isolation. At that time there were not enough diagnostic tests to identify infected individuals and data were strongly associated with sub notifications. Nevertheless, the effectiveness of this measure largely depends on the individual's social responsibility. This measure has a severe economic and social impact, as in other countries. In this review, we present an overview and scientific perspectives of the evolution of COVID-19 from Brazilian databases in which climate and economic situations differ from China, European countries, and the USA.

Key words: COVID-19, SARS-CoV-2, Pandemic, Brazil.

INTRODUCTION

Coronaviridae is a family of enveloped positive-stranded RNA viruses of vertebrates, introduced into humans from a zoonotic reservoir and which can promote a respiratory syndrome. In the past, the Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS), with a fatality rate of around 10% (8,098 cases and 774 deaths), and the Middle East Respiratory Syndrome (MERS), around 34% (2,494 cases and 858 deaths) are the major representants of this virus family (Gorbalenya 2020, Mahase 2020). Currently, a new virus representative of this family, named SARS-CoV-2, has been promoted a worldwide pandemic outbreak, the 2019-nCoV (disused term) or COVID-19 disease. The human first cases were detected in Wuhan, China, in

November 2019, probably from a horseshoe bat contagion in Yunnan Province (Wang & Hu 2013, Murdoch & French 2020, Huang et al. 2020).

The COVID-19 growth curve in China was built through daily infographics (Figure 1), with an initial plateau in February 29th and new increase of confirmed cases and deaths in April 30th. The evidence of the pandemic could be observed in Figure 2, and 188 countries presented confirmed cases and elevated the number to more than six million people.

VIRUS CHARACTERIZATION AND CELL INTERACTION

SARS-CoV-2 is a positive single-stranded RNA virus (ssRNA) of approximately 29802 nucleotides

APÊNDICE E - PUBLICAÇÃO DE ARTIGO DE REVISÃO COMO PRIMEIRO AUTOR – ARTIGO PUBLICADO SOBRE DESENVOLVIMENTO DE VACINAS ANTÍGENOS SINTÉTICOS PARA COVID-19.

HUMAN VACCINES & IMMUNOTHERAPEUTICS
https://doi.org/10.1080/21645515.2021.1974288



REVIEW



Development of synthetic antigen vaccines for COVID-19

Maria da Conceição Viana Invenção ¹, Alanne Rayssa da Silva Melo ², Larissa Silva de Macêdo ³,
Thaís Souto Paula da Costa Neves ⁴, Cristiane Moutinho Lagos de Melo ⁵, Marcelo Nazário Cordeiro ⁶,
Marcus Vinicius de Aragão Batista ⁷, and Antonio Carlos de Freitas ⁸

¹Laboratory of Molecular Studies and Experimental Therapy – LEMTE, Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Brazil; ²Laboratory of Immunological and Antitumor Analysis, Department of Antibiotics, Bioscience Center, Federal University of Pernambuco, Brazil; ³Laboratory of Molecular Genetics and Biotechnology, Department of Biology, Federal University of Sergipe, Brazil

ABSTRACT

The current pandemic called COVID-19 caused by the SARS-CoV-2 virus brought the need for the search for fast alternatives to both control and fight the SARS-CoV-2 infection. Therefore, a race for a vaccine against COVID-19 took place, and some vaccines have been approved for emergency use in several countries in a record time. Ongoing prophylactic research has sought faster, safer, and precise alternatives by redirecting knowledge of other vaccines, and/or the development of new strategies using available tools, mainly in the areas of genomics and bioinformatics. The current review highlights the development of synthetic antigen vaccines, focusing on the usage of bioinformatics tools for the selection and construction of antigens on the different vaccine constructions under development, as well as strategies to optimize vaccines for COVID-19.

ARTICLE HISTORY

Received 15 April 2021
Revised 4 August 2021
Accepted 24 August 2021

KEYWORDS

SARS-CoV-2; nucleic acid vaccines; *in silico*; immunoinformatics; adjuvants

The current pandemic called COVID-19 caused by the SARS-CoV-2 virus is responsible for over 200 million cases and 4 million deaths.¹ It has also brought the need for new political, economic, and social perspectives which maximize the search for fast alternatives to both control and fight the SARS-CoV-2 infection. Therefore, a race for a vaccine against COVID-19 took place, and in less than a year, some of the studies have reached phase 3 of vaccine trials as well as some others have been approved for emergency use in several countries.^{2,3} Ongoing prophylactic research has sought faster, safer, and precise alternatives that can be reached by redirecting knowledge of other vaccines that already exist for other diseases, and/or the development of new strategies using available tools, mainly in the areas of genomics and bioinformatics.⁴ The current review highlights the development of synthetic antigen vaccines, focusing on the usage of bioinformatics tools for the selection and construction of antigens on the different vaccine constructions under development, as well as strategies to optimize vaccines for COVID-19.

Vaccine development landscape in the context of COVID-19

Vaccines are excellent tools in controlling infectious diseases and preventing humanitarian epidemics crisis by inducing the establishment of an immune response capable of quickly controlling and eliminating pathogens. This long-term protection is usually characterized by antibody persistence and cell-mediated immune response.⁵ As a result, vaccines are the main prophylactic alternative to prevent the spread of

COVID-19.⁶ There are currently 185 candidates being evaluated during the pre-trial vaccine and 102 with eight different technology platforms under clinical evaluation⁷ (Table 1). So far, 17 vaccines have been approved for use in humans in several countries.

Many laboratories have invested in more modern vaccine strategies besides older vaccine platforms such as the attenuated or inactive virus, especially during the COVID 19 pandemic. A survey carried out *in silico* by Defrancesco2 showed that several vaccine platforms are being tested, such as protein subunit vaccines, virus-like particle vaccines, DNA- and RNA-based vaccines, viral vector-based vaccines, among other strategies.

Nucleic acid vaccines are new and versatile strategies that use recombinant DNA technology for immunization or immunotherapy. They consist of viral vector-based vaccines, in which a virus unrelated to the pathology, live or inactive, carries the genetic material of the target antigen, along with DNA- and RNA-based vaccine platforms, in which the gene sequence (of one or more genes) encoding the protein of the pathogen of interest will be delivered as a vaccine. Another alternative used in these nucleic acid approaches is the use of epitope coding sequences whose immunogenicity is rigorously selected *in silico*, in the so-called synthetic antigen vaccine. In this review, we will focus on these synthetic antigen vaccines, which are an interesting strategy since they can combine one or more antigens from the same pathogen or even from different variants in the same vaccine.^{27,28} In this review, we will focus on DNA and mRNA vaccine platforms, especially multiepitope ones that use synthetic antigens.

CONTACT Antonio Carlos de Freitas [✉] acf_ufpe@yahoo.com.br [✉] Laboratory of Molecular Studies and Experimental Therapy – Lemte, Department of Genetics, Center for Biological Sciences, Federal University of Pernambuco, Av. Moraes Rego, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brazil

*These authors contributed equally to this work.

© 2021 Taylor & Francis Group, LLC

ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO PELA CEUA DA UFPE



Universidade Federal de Pernambuco
 Centro de Biociências
 Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
 50670-420 / Recife – PE – Brasil
 Fones: 2126 8842
 ceua@ufpe.br

Recife, 28 de maio de 2019

Ofício nº 29/19

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof. Cristiane Moutinho Lagos de Melo**

Departamento de Antibióticos

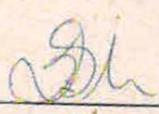
Universidade Federal de Pernambuco

Processo nº 0002/2019

Certificamos que a proposta intitulada “Investigação imunomoestimulatória de microrganismos utilizados como carreadores e adjuvantes vacinais.” registrado com o nº 0002/2019 sob a responsabilidade de **Prof. Cristiane Moutinho Lagos de Melo** o que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 28/05/2019.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Maio 2019 a agosto 2021
Espécie/linhagem/raça	Camundongo heterogenico
Nº de animais	30
Peso/Idade	35g/6-8 semanas
Sexo	Macho (30)
Origem: Biotério de Criação	Biotério Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA)
Destino: Biotério de Experimentação	Biotério Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA)

Atenciosamente,


 Prof. Sebastião R. F. Silva
 Vice-Presidente CEUA/UFPE
 SIAPE 2345691

