



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

ANA PAULA FERREIRA CAMPOS

**AVALIAÇÃO DO PERFIL IMUNOGÊNICO INDUZIDO POR VACINA DE DNA E5
MULTIEPÍTOPOS COMO IMUNOTERAPIA CONTRA O CÂNCER DO COLO DO
ÚTERO.**

Recife
2021

ANA PAULA FERREIRA CAMPOS

**AVALIAÇÃO DO PERFIL IMUNOGÊNICO INDUZIDO POR VACINA DE DNA E5
MULTIEPÍTOPOS COMO IMUNOTERAPIA CONTRA O CÂNCER DO COLO DO
ÚTERO.**

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.

Orientador: Dr. Antonio Carlos de Freitas

Coorientador: Dr. Marcelo Nazário Cordeiro

Recife

2021

Catálogo na Fonte:
Elaine C Barroso, CRB-4/1728

Campos, Ana Paula Ferreira

Avaliação do perfil imunogênico induzido por vacina de DNA E5 multiepítomos como imunoterapia contra o câncer do colo do útero / Ana Paula Ferreira Campos – 2021.

98 f.: il., fig., tab.

Orientador: Antônio Carlos de Freitas

Coorientador: Marcelo Nazário Cordeiro

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Genética, Recife, 2021.

Inclui referências, apêndice e anexo.

1. Papilomavírus humano 2. Câncer colo do útero 3. Vacinas I. Freitas, Antônio Carlos de (orient.) II. Cordeiro, Marcelo Nazário (coorient.) III. Título

5798.2445

CDD (22.ed)

UFPE/CB-2021-362

ANA PAULA FERREIRA CAMPOS

**AVALIAÇÃO DO PERFIL IMUNOGÊNICO INDUZIDO POR VACINA DE DNA E5
MULTIEPÍTOPOS COMO IMUNOTERAPIA CONTRA O CÂNCER DO COLO DO
ÚTERO.**

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: 30/08/2021.

BANCA EXAMINADORA

Profº Dr. Antonio Carlos de Freitas (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Profº Dr. Tercilio Calsa Junior (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Profº Dr. Marcos Antonio de Moraes Junior (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Ana Pavla Almeida Diniz Gurgel (Examinador Externo)
Universidade Federal da Paraíba

Profº Dr. Jacinto da Costa Silva Neto (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho à minha avó,
Angelina Alves Ferreira (*in memoriam*),
Por todo amor dedicado a mim.

AGRADECIMENTOS

Poder finalizar o doutorado é um momento muito esperado na vida acadêmica, e torna-se ainda mais significativo na vida pessoal e profissional quando se vive o processo diante da atual pandemia. Por isso, começo agradecendo a chance de chegar ao final dessa etapa viva e com saúde. Dedico este trabalho aos meus concidadãos brasileiros que não tiveram a mesma oportunidade à vida.

Agradeço à minha mãe e ao meu pai, Amujacy e Joel. Seus cuidados, amor, dedicação, educação e trabalho árduo, foram exemplos essenciais na formação do meu caráter e me deram o chão para prosseguir no caminho da educação, mesmo diante dos obstáculos da vida, não há formas reais para agradecer por tudo isso.

Agradeço as minhas duas irmãs, Pollyanna e Joanna, companheiras e amigas fiéis, são presentes que a minha mãe me deu na terra, amo muito vocês.

Agradeço aos meus sobrinhos Ghabriel, Samuel e Pérola, são a alegria e vida nova da família Ferreira.

Agradeço à minha avó materna, Angelina Alves Ferreira (im memoriam), minha segunda mãe, por toda bondade, cuidado e amor. Sentirei eternas saudades das nossas brincadeiras.

Agradeço à minha família materna e paterna, por todo apoio dado diante da jornada da vida. Agradeço imensamente aos meus avós, Araci e Cristiano, por toda torcida, amor, suporte e preocupação comigo, a força e história da vida de vocês me serve como exemplo diário de luta, e espero estar sempre à altura para honrá-los.

Agradeço ao meu companheiro de vida e colega de profissão, Dr. André Luiz, pela dedicação, o seu carinho, paciência e amor são essenciais em minha vida.

Agradeço às minhas amigas, Micaelly e Angélica, por toda amizade, hospitalidade, discussões filosóficas e nosso companheirismo. Agradeço à minha amiga de infância Nayara, que mesmo distante sempre foi muito presente.

Agradeço à minha amiga Isis, por todo cuidado de irmã, seus conselhos e parceria me faz muito bem. Obrigada pela nossa bela amizade.

Agradeço a Karin e Elias, meus parceiros e amigos de laboratório e vida.

Meus sinceros agradecimentos ao meu Orientador Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas, Chefe do Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental

(LEMTE), pelo acolhimento do mestrado ao doutorado. Obrigada pela oportunidade para o trabalho, paciência, assim como todos os ensinamentos compartilhados. Agradeço também todas as portas abertas desde a minha vinda do Mato Grosso à Recife.

Agradeço a Dra. Anna Jéssica, co-orientadora, fiel escudeira, amiga, grande “host” em Recife, no laboratório e na vida. E, estendo meus agradecimentos as companheiras e amigas do LEMTE, Lígia, Bianca, Dafanny Alanne, Kamilla, Carine e Ruanny.

Agradeço ao meu co-orientador Dr. Marcelo Nazário, e a sua esposa Dra. Rita, por todos os ensinamentos concedidos desde o mestrado até o doutorado, além das conversas e amizade.

Agradeço também aos colegas do grupo que tiveram suas pesquisas relacionadas a minha, Elyda, Filipe e Talita e que também foram base para o desenvolvimento do grupo.

Agradeço a Prof. Dra. Cristiane Moutinho, Chefe do Laboratório de Análises Imunológicas e Antitumorais (LAIA), por todos os ensinamentos que vão desde o cotidiano em um biotério, aulas de imunologia, produção de artigos, e tudo isso com muito carinho e competência, serei eternamente grata. E, estendo meus agradecimentos a todos da sua equipe, que sempre de forma cordial e generosa me ensinaram muito, em especial a Dayane, Bárbara, Geo e Ricardo que fizeram toda diferença na realização dos meus experimentos.

Agradeço ao Dr. Christian Reis, pelo apoio para o uso do Laboratório de Microbiologia e do Biotério do Instituto Pesquisa Aggeu Magalhães, Fiocruz.

Agradeço ao Dr. Aldo Venuti, Istituto Nazionale Tumori Regina Elena em Roma, pelo apoio científico em diversas pesquisas do nosso grupo de pesquisa.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco (PPGG/UFPE), a Manassés pela atenção e profissionalismo, assim como todos os professores do departamento.

Agradeço aos órgãos de fomento, FACEPE e CAPES/CNPq que contribuíram com o suporte financeiro deste doutorado e pesquisa. Agradeço pelo acolhimento do povo Pernambucano e de todo o Nordeste.

“Se escondermos esse novo mundo da ciência que estamos criando (ou tentando criar), isso vai provocar problemas maiores. Temos que levar essas descobertas e possibilidades para as pessoas que vão vivenciá-las”

(Siddhartha Mukherjee).

Resumo

O câncer do colo do útero tem como o principal agente etiológico o Papilomavírus Humano (HPV), envolvido em lesões benignas cutâneas e de mucosas. Alguns HPVs apresentam potencial carcinogênico e as lesões associadas podem evoluir para o câncer. Atualmente estão disponíveis três vacinas profiláticas aprovadas e comercializadas, e embora contemplem diversos tipos virais, não são capazes de tratar tumores existentes ou que possam vir a se desenvolver em pacientes já infectados. O presente projeto buscou desenvolver estratégia terapêutica para o câncer do colo do útero baseado em vacina de DNA contendo epítomos da oncoproteína E5 do HPV16. Os epítomos de E5 adicionados à estratégia são capazes de induzir a resposta imune celular com perfil de células T citotóxicas. E5 é expressa nas fases iniciais da infecção, tornando-a atrativa para terapias vacinais que visam às fases iniciais da transformação tumoral. Para tal, avaliamos *in vivo* a expressão dos respectivos antígenos e *in vitro* a partir de esplenócitos dos camundongos imunizados. A resposta imune avaliada em camundongos previamente desafiados com células tumorais C3, mostrou ativação do perfil de células adaptativa e de citocinas. O volume tumoral também foi avaliado e apresentou os menores valores nos grupos vacinados (pVAXE5m). O estresse oxidativo e os níveis toxicológicos investigados demonstraram em modelo animal a capacidade da vacina proposta em ativar células T citotóxicas e citocinas Th1, Th2 e Th17 em níveis de secreção equilibrados.

Palavras-chave: Imunoterapia; câncer do colo do útero; vacina de DNA; oncoproteína E5; HPV 16.

Abstract

The main etiological agent of cervical cancer is the Human Papillomavirus (HPV), involved in benign skin and mucosal lesions. Some HPVs have carcinogenic potential and the associated lesions can progress to cancer. Three approved and marketed prophylactic vaccines are currently available, and although they include several viral types, they are not capable of treating existing tumors or those that may develop in already infected patients. The present project sought to develop a therapeutic strategy for cervical cancer based on a DNA vaccine containing epitopes of the HPV16 oncoprotein E5. The E5 epitopes added to the strategy are capable of inducing a cellular immune response with a profile of cytotoxic T cells. E5 is expressed in the early stages of infection, making it attractive for vaccine therapies that target the early stages of tumor transformation. To this end, we evaluated in vivo the expression of the respective antigens and in vitro from splenocytes from immunized mice. The immune response evaluated in mice previously challenged with C3 tumor cells, showed activation of the adaptive cell profile and cytokines. Tumor volume was also evaluated and showed the lowest values in the vaccinated groups (pVAXE5m). The oxidative stress and the investigated toxicological levels demonstrated in an animal model the ability of the proposed vaccine to activate cytotoxic T cells and Th1, Th2 and Th17 cytokines at balanced levels of secretion.

Keywords: Immunotherapy; cervical cancer; DNA vaccine; E5 oncoprotein; HPV 16.

Lista de Ilustrações

Figura	Revisão da Literatura	Página
1	Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer.....	22
2	Representação do genoma circular do HPV e VLP.....	23
3	Ciclo do vírus HPV.....	26
4	Mecanismo de processamento e apresentação de uma vacina de DNA via MHC-I.....	43
5	Esquema do cronograma de imunização.....	47
6	Esquema e digestão da construção pVAXE5m.....	52
7	A célula C3.....	53
8	Etapas do desafio tumoral e eletroporação.....	54
9	Crescimento tumoral.....	55
10	Expressão dos marcadores das células linfocitárias <i>in vivo</i>	56
11	Secreção de citocinas <i>in vivo</i>	57
12	Ativação celular através da investigação do estresse oxidativo...	61
13	Expressão dos marcadores das células linfocitárias <i>in vitro</i>	63
14	Secreção de citocinas <i>in vitro</i>	63

Lista de Tabelas

Tabela		Página
1	Epítomos utilizados na construção vacinal pVAXE5m.....	45
2	Parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue periféricos de animais experimentais.....	59

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

Item	Definição
APCs	Células apresentadoras de antígeno
E6AP	<i>E6-associated protein</i>
EGF	Fator de Crescimento Epidermal
EP	Eletroporação
HPV	Papilomavírus Humano
hrHPV	HPVs de alto risco
HSPG	Proteoglicanas de heparan sulfato
ID	Intradermal
IM	Intramuscular
IFN-γ	Interferon gama
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-17	Interleucina 17
IEDB	<i>Immune Epitope Database</i>
LCR	<i>Long control region</i>

MAPK	Proteína quinase mitógeno-ativada
MEC	Matriz extracelular
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MMP	Metaloprotease de matriz
ORF	<i>Open Read Frame</i>
PVs	Papilomavírus
PCR	Reação em cadeia de polimerase
pRB	Proteína do retinoblastoma
qPCR	Reação em cadeia de polimerase quantitativa
RE	Reticulo endoplasmático
TAP	Transportador associado ao processamento de antígeno
TCR	Receptores de células T
VLP	Partícula semelhante ao vírus (<i>virus-like particle</i>)

Sumário

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 A história do câncer.....	17
2.2 O Câncer do colo do útero e o HPV.....	19
2.3 A epidemiologia do câncer do colo do útero.....	20
2.4 Biologia do HPV.....	22
2.4.1 Organização genômica do papilomavírus.....	22
2.4.2 A replicação do papilomavírus.....	24
2.5 Carcinogênese do câncer do colo do útero.....	26
2.6 Atividades oncogênicas de E5 do HPV.....	28
2.7 Resposta imune ao HPV.....	30
2.8 Resposta imunológica ao câncer cervical.....	32
2.8.1 O papel das citocinas do perfil Th1.....	32
2.8.2 O papel das citocinas perfil Th2 e Th17.....	34
2.8.3 Imunidade Inata.....	36
2.8.4 Imunidade celular adaptativa.....	39
2.9 Vacina de DNA e eletroporação.....	41
3 OBJETIVOS.....	44
3.1 Objetivo geral.....	44
3.2 Objetivos específicos.....	44
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	45
4.1 Construção da vacina de DNA.....	45

4.2 Desafio tumoral e Imunização.....	46
4.3 Isolamento e cultura de células do baço.....	48
4.4 Investigação do estresse oxidativo celular <i>in vitro</i>	48
4.5 Citocinas do sangue periférico e <i>in vitro</i>	49
4.6 Imunofenotipagem das células do sangue periférico e <i>in vitro</i>	49
4.7 Análises hematológicas dos animais experimentais.....	50
4.8 Análise estatística	51
5 RESULTADOS.....	52
5.1 Construção das vacinas de DNA.....	52
5.2 Desafio tumoral	53
5.3 Efeito antitumoral	55
5.4 Perfil imunológico dos animais experimentais <i>in vivo</i>	56
5.5 Parâmetros hematológicos dos animais experimentais.....	58
5.6 Investigação <i>in vitro</i> do estresse oxidativo	60
5.7 Resposta imune celular e de citocinas <i>in vitro</i>	61
6 DISCUSSÃO.....	64
7 CONCLUSÕES.....	74
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
APÊNDICE A	94
APÊNDICE B	95
APÊNDICE C	96
APÊNDICE C	97
ANEXO A	98

1 INTRODUÇÃO

O câncer do colo do útero é considerado um grave problema de saúde pública e apresenta forte crescimento em seu número de casos por ano, com 70% dos casos diagnosticados encontrados em regiões menos desenvolvidas do mundo, como o Brasil. O presente projeto coaduna com a Portaria (Nº 874, de 16 de Maio de 2013) do Ministério da Saúde do Brasil, que institui a Política Nacional para a Prevenção e Controle do Câncer e visa promover ações de prevenção, detecção precoce, tratamento oportuno e cuidados paliativos. Tendo como principal agente etiológico do câncer do colo do útero o Papilomavírus Humano (HPV), atualmente estão disponíveis apenas três vacinas profiláticas baseadas em partículas semelhantes ao vírus. Portanto, é evidente a necessidade de abordagens profiláticas e terapêuticas, haja vista que as atuais vacinas não fornecem tratamento capaz de combater lesões já estabelecidas, e não contemplam os diversos tipos de HPVs de alto risco oncogênico.

Trabalhos recentes vêm explorando o potencial da oncoproteína E5 do HPV e assinalaram atividade antitumoral em lesões pré-malignas, e torna este alvo terapêutico objeto de estudo em ascendência. Assim, a proposta vacinal representada por oncogenes têm funções terapêutica para estágios precoces do câncer cervical, e pode elicitar resposta imune celular capaz de impedir a progressão maligna desses tumores.

Nesse contexto, vacinas de DNA têm emergido como estratégia para imunoterapia contra o câncer, e apresentam características como estabilidade, segurança e reprodutibilidade. O presente trabalho busca explorar o uso de epítopos da oncoproteína E5 do HPV16 organizados entre epítopos auxiliares

da entrega de antígenos intracelulares via MHC I. Dessa forma, nossa abordagem para o tratamento das lesões e tumores do colo do útero induzido pelo HPV16 também visa eficácia antitumoral aliada a baixo custo de produção.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A história do câncer

O câncer está presente na história da humanidade desde a Pré-história e a Antiguidade, com a datação mais antiga descoberta em *Hominidae* que viveu há 1,7 milhões de anos (Chene *et al.*, 2016). Trata-se do osteoma osteóide benigno, descrito em hominídeo *Australopithecus sediba*, do sexo masculino, e representa o tumor mais antigo que se tem registro até o presente momento (Randolph-Quinney *et al.*, 2016). Além desse achado, Dr. Augustus Bozzi Granville (1783-1872), famoso obstetra ítalo-londrino (Sakula, 1983), publicou em 1825 “*An Essay on Egyptian Mummies; With Observations on the Art of Embalming among the Ancient Egyptians*” na revista inglesa Royal Society. O artigo apresenta o primeiro diagnóstico oncoginecológico realizado em mulher, identificado como tumor ovariano maligno, que mais tarde, após reavaliação histológica foi reclassificado como cistadenoma ovariano benigno (Nun & Tapp, 2000). Além do exemplar citado anteriormente, outras 39 neoplasias foram identificadas em múmias do Egito antigo, o que pode sugerir o câncer como uma doença mais comum do que o esperado nesses povos (Veiga, 2009).

Na Inglaterra, a prevalência do câncer entre britânicos antes da industrialização (entre os séculos 6 a 16), foi observada a partir de 143 esqueletos, e aponta a estimativa de 9 a 14% da presença do câncer na antiga população, ainda inferior a prevalência moderna do câncer no final de vida dos britânicos, com valores entre 40 e 50% (Mitchell *et al.*, 2021). Embora haja limitações para a identificação dos tipos de cânceres mais comuns em tempos

remotos, o avanço da tecnologia diagnóstica tem fomentado novas descobertas relacionadas ao câncer e o homem moderno (Chene *et al.*, 2016).

Atualmente, a teoria do acúmulo de mutações é aceita como a principal forma de origem do câncer (Ewald, 2018). Entretanto, muitas pesquisas foram necessárias para o estabelecimento etiológico do câncer, como a realizada pelo médico e pesquisador alemão Dr. Karl Heinrich Bauer (1890-1978).

Bauer observou e documentou em sua monografia o desenvolvimento do câncer frente a agentes químicos e energias radiantes, e pode ter sido um dos primeiros a propor a teoria da mutação como fator carcinogênico (Bauer, 1943). Além dessa contribuição, nos primórdios da área da oncologia, Bauer publicou em 1949, o livro *Das Krebsproblem*, considerado um marco na pesquisa sobre o câncer na Alemanha.

Outra referência nos estudos de cancerologia, Dr. Leonell C. Strong (1894-1982), biólogo e geneticista estadunidense, é conhecido pelo desenvolvimento de diversas linhagens de camundongos consanguíneos (Strong, 1976). Entre tais, está presente a linhagem endogâmica C₃H, na qual, camundongos fêmeas originam espontaneamente carcinoma de mama. Dessa forma, fornecendo meios para ascensão dos patamares da investigação tumoral (Strong, 1935; Strong, 1942). Ambos produziram trabalhos importantes em suas áreas, pertinentes a genética, etiologia, prevenção e tratamento do câncer, e embora tenham sido indicados ao prêmio Nobel, não obtiveram o título (Hansson *et al.*, 2021).

2.2 O Câncer do colo do útero e o HPV

No ano de 1983, Harald Zur Hausen e colaboradores publicaram “*A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions*”. Neste estudo, o DNA do recém denominado HPV16 foi utilizado como sonda, na qual 61,1% das amostras de biópsias de câncer cervical de pacientes alemãs foram hibridizadas fortemente. Neste mesmo estudo, o Brasil apresentou 34,8% de hibridização (Durst *et al.*, 1983; Zur Hausen, 2009). No ano seguinte, foi publicada a descoberta de um novo tipo de papilomavírus, o HPV18, também encontrado em biópsias tumorais e linhagens de células derivadas do câncer cervical (Boshart *et al.*, 1984). Dessa forma, a partir dos anos 70, o HPV foi associado e estabelecido como provável fator etiológico no desenvolvimento do câncer do colo do útero (Jenkins, 2020).

Atualmente são descritos mais de 200 tipos de HPVs, e estão presentes nessa classificação os tipos 16 e 18 como HPVhr (Chen *et al.*, 2018). Os HPVs do tipo 16 e 18 são reconhecidos como os principais agentes virais responsáveis por cerca de 70% de todos os tumores e lesões pré-cânceres no colo do útero. Em Sundström e Dillner (2020), o HPV16 foi detectado em 85,3% das amostras do câncer cervical invasivo. Devido ao fato de ser comumente detectado em lesões de alto grau, o genótipo de HPV16 é considerado de alto risco, e responsável por mais de 80% dos casos de câncer cervical em todo mundo (Bravo *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011; Crosbie *et al.*, 2013; WHO, 2019).

A infecção por HPV ocorre usualmente pelas relações sexuais, e na maior parte dos organismos é resolvida ou controlada pelo sistema imune em até 24 meses, e pode levar anos, ou décadas, para a manifestação clínica. Entretanto,

uma pequena parcela da população portadora da infecção persistente avança para as formas mais graves da doença (Bodily & Laimins, 2011; Sanjosé *et al.*, 2018).

Nas últimas décadas, o entendimento sobre a biologia molecular envolvida no processo da carcinogênese aumentou, e com isso o aprofundamento da ciência sobre as interações biológicas necessárias para o desdobramento tumoral, como a atuação dos oncogenes virais na modulação das células do hospedeiro e interferências exercidas nas vias supressoras tumorais. A evolução no campo da epidemiologia, das tecnologias aplicadas às áreas da citologia e diagnósticos moleculares, permitiu que há mais de 30 anos, a infecção por HPVhr fosse admitida como causa etiológica do câncer do colo do útero. Em consequência de suas contribuições nessas descobertas, o Dr. Harald Zur Hausen recebeu o prêmio Nobel em fisiologia ou medicina no ano de 2008 (Zur Hausen, 2002; Bosch *et al.*, 2002; Castellsagué, 2008; Zur Hausen, 2019).

2.3 A epidemiologia do câncer do colo do útero

Dados da Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization - WHO*) revelam que 9.6 milhões de pessoas faleceram de câncer no ano de 2018. Desse total, 3.3% foram devidos ao câncer do colo do útero, que está entre os principais tipos de câncer diagnosticados no mundo e ocupa o quarto lugar no ranking de prevalência entre as mulheres, com 310000 mortes em 2018 (WHO, 2019). Nas Américas, esse câncer é a segunda principal causa de morte em mulheres (PAHO, 2018). Além disso, o câncer do colo do útero ocupou a segunda causa de morte devido ao câncer no mundo no ano de 2018, para mulheres com

idade entre 15 a 44 anos (ICO, 2019). Estimativas apontam incidência de 16.590 casos, equivalente a 7.4% de cânceres em mulheres no Brasil para cada ano do triênio 2020-2022 (INCA, 2020) (**Figura 1**). Hoje, está em curso o projeto “*A Global Strategy for elimination of Cervical Cancer*” proposto em 2018 pelo diretor geral da WHO, que visa à aceleração da eliminação do câncer do colo do útero até o ano de 2030 (Canfell, 2019). Além disso, a Portaria (Nº 874, de 16 de Maio de 2013) do Ministério da Saúde do Brasil, institui a Política Nacional para a Prevenção e Controle do Câncer e visa promover ações de prevenção, detecção precoce, tratamento oportuno e cuidados paliativos.

Atualmente, para a proteção contra a infecção pelo HPV, estão disponíveis três vacinas profiláticas aprovadas para uso humano, a bivalente Cervarix® (HPVs 16 e 18) da fabricante GlaxoSmithKline Biologicals e a quadrivalente Gardasil® (HPVs 6, 11, 16 e 18) produzida pela Merck Sharp & Dohme (Cheng *et al.*, 2018). As duas vacinas possuem registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), e foram aprovadas para comercialização no Brasil, indicadas à meninas e mulheres de 9 a 45 anos e meninos e homens de 9 a 26 anos (ANVISA, 2015). No ano de 2017, a mais recente vacina foi registrada, a nonavalente Gardasil9® (HPVs 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58) com adição dos tipos 31, 33, 45, 52 e 58 do HPV (ANVISA, 2017; Joura *et al.*, 2015). As três vacinas atuam na prevenção contra infecções persistentes e lesões pré-malignas ano-genitais, que englobam o colo de útero, vulva, vagina e ânus. Entretanto, somente as vacinas que contemplam os tipos virais 6 e 11 são comprovadamente capazes de prevenir contra as verrugas genitais (Guevara *et al.*, 2019). Ademais, nenhuma das vacinas são

capazes de tratar ou eliminar qualquer infecção preexistente (Hildesheim *et al.*, 2007).

Figura 1: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer. O esquema aponta a incidência estimada em porcentagem e os números de casos para os principais tipos de câncer e a sua distribuição por sexo previsto para o ano de 2020 no Brasil. (Fonte: INCA, 2020).

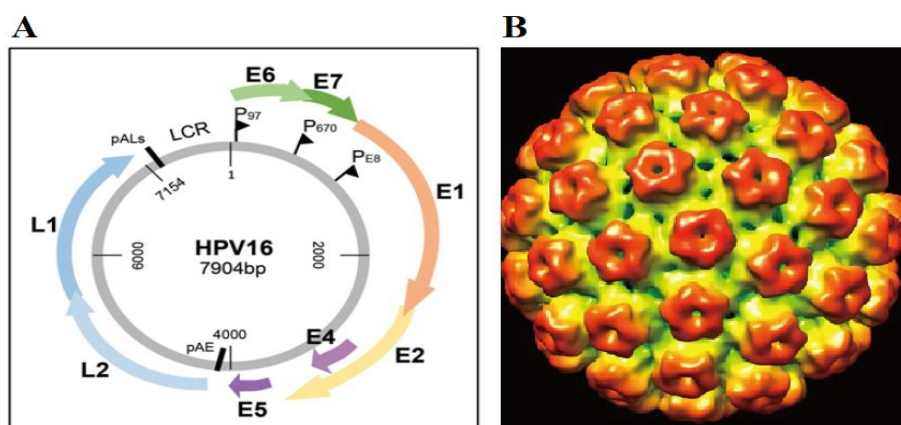
Localização Primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%			Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%			Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema nervoso central	5.220	2,3%

2.4 Biologia do HPV

2.4.1 Organização genômica do papilomavírus

O HPV pertence à família *Papillomaviridae*, o seu material genético é formado por DNA em dupla fita, que se apresenta na forma episossomal de 8 Kb, de estrutura viral não envelopada, em conformação icosaédrica, com diâmetro aproximado em 50-55 nm (Estêvão *et al.*, 2019). O genoma do HPV está segmentado em três regiões: a região de expressão precoce (E ou *early*) codifica as proteínas (E1, E2, E4, E5, E6, E7, E8) com funções no tecido epitelial infectado; a região de expressão tardia (L ou *late*) codifica proteínas L1 e L2, que formarão o capsídeo viral; e a região reguladora (LCR ou *long control region*) responsável pela replicação e transcrição do genoma viral (Graham, 2017).

Figura 2: Representação do genoma circular do HPV e VLP. **A)** O genoma do HPV 16 contém organização similar para os diferentes tipos de genomas virais. Genes tardios (L), Genes precoces (E), Região regulatória (LCR), Regiões promotoras (P97, P670, PE8), Regiões de poliadenilação (pAE-pALs), ORFs (*Open read frames* ou quadros abertos de leitura) em arcos coloridos. **B)** Imagem de Microscopia eletrônica criogênica (CryoEM) de uma partícula semelhante ao vírus (*virus-like particle* ou VLP) do HPV16 (adaptado de Zhang *et al.*, 2016; Graham, 2017).



A proteína L1 é a principal formadora do capsídeo viral e seus pentâmeros estão organizados em 72 capsômeros (Wang *et al.*, 2020). A associação desses capsômeros ocasiona as chamadas partículas semelhantes a vírus (*virus-like particles* ou VLPs), e atualmente são utilizadas nas estratégias vacinais profiláticas disponíveis no Brasil (Zhang *et al.*, 2016; Guevara *et al.*, 2019) (**Figura 2**). A proteína L2, embora pouco imunogênica, contém epítomos conservados entre os diversos HPVs de alto risco. A porção N-terminal está voltada para a camada externa ao capsídeo enquanto a porção C-terminal encontra-se ligada ao genoma viral, exercendo funções de ancoragem na etapa de infecção (Boxus *et al.*, 2016).

2.4.2 A replicação do papilomavírus

Os papilomavírus (PVs) possuem tropismo celular, e, para a manutenção da replicação do seu material genômico, assim como a liberação dos vírions, o ciclo de infecção viral evoluiu de maneira interligada aos processos de diferenciação natural dos queratinócitos, que também é realizado de forma assintomática (Doorbar, 2016). A proteína L1 do HPV atua no primeiro passo da infecção, na interação vírus e célula hospedeira, uma vez que sua porção superficial interfere no estabelecimento da infecção (Mistry *et al.*, 2008).

A entrada do vírus e o seu estabelecimento na camada basal do epitélio cervical ocorrem por meio do reconhecimento da proteína L1 ao receptor celular de proteoglicanas de heparan sulfato (*Heparan sulfate proteoglycans* ou HSPG) presente na matriz extracelular (MEC). Após a etapa da ligação ao receptor, o material genético será encaminhado ao núcleo celular e durante esse processo os vírions terão o capsídeo viral desmontado, a partir do chamado escape endossomal (Horvath *et al.*, 2010).

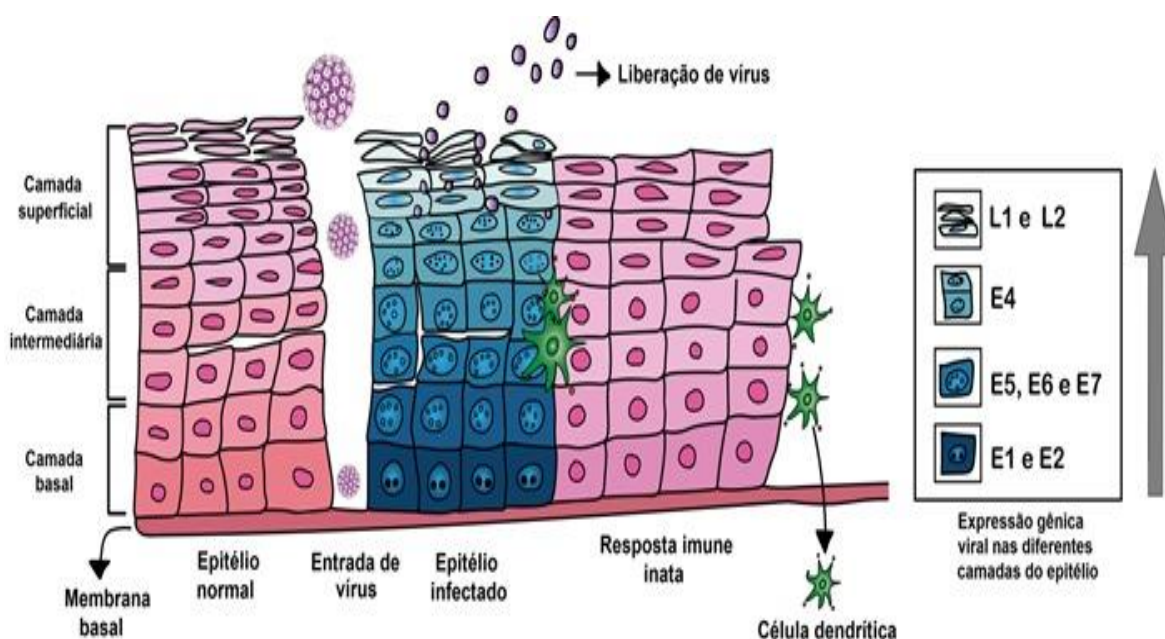
No primeiro momento, as proteínas E1 e E2 são expressas para a manutenção do DNA viral, e baixos números de cópias epissomais serão replicados, onde cada célula infectada produzirá entre 50-100 cópias genômicas epissomais (Tsakogiannis *et al.*, 2015). A proteína E2 atua como fator de transcrição e permite que E1 reconheça a sequência LCR viral, E1 por sua vez, desempenha ação da enzima helicase, permitindo o acesso à maquinaria de replicação viral (Chojnacki & Melendy, 2018). Os promotores para expressão das proteínas E6 e E7 são ativados conforme ocorre diferenciação dos queratinócitos basais, e tornam a fase inicial da infecção mais propícia, uma vez que ambas as

proteínas interferem no ciclo celular normal e induzem ao disparo da atividade da proteína viral E2 (Moody, 2017). Embora tenham sido consideradas evolutivamente proteínas acessórias, as proteínas E4, E5, E6 e E7, desempenham papéis importantes no ciclo dos HPVs (McBride, 2017).

A oncoproteína E5 irá agir de forma sinérgica com as oncoproteínas E6 e E7, promovendo a progressão da malignização celular. Por interferir no tráfego intracelular de peptídeos, através da mudança no pH de organelas na qual se encontram ligadas, E5 permite o escape do sistema imune, além de sinalizar o crescimento celular e estimular a proteína MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) que atua no ciclo celular (Graham, 2017; Cordeiro *et al.*, 2018).

Após a diferenciação do epitélio, a expressão gênica de L1, na maior parte dos HPVs procede à liberação da proteína estrutural L2, e seguirá para a montagem dos capsídeos virais e liberação dos vírions, realizada nas camadas superficiais do epitélio, tornando o ciclo viral produtivo (Cerqueira & Schiller, 2016; Moody, 2017) (**Figura 3**).

Figura 3 - Ciclo do vírus HPV. Representação da diferenciação dos queratinócitos infectados pelo HPV e liberação dos vírions. (Adaptado de Cordeiro *et al.*, 2018).



2.5 Carcinogênese do câncer do colo do útero

Durante a infecção crônica, há a produção dos vírions do HPV (Doorbar *et al.*, 2016). Diferentemente, a infecção persistente associada aos HPVs de alto risco (*high-risk HPV* ou HPV_{hr}) poderá evoluir para um perfil de malignização celular quando presente mutações ao genoma do hospedeiro, sem a liberação das partículas virais infectantes (Schiffman *et al.*, 2016). A integração do genoma viral ao cromossomo do hospedeiro é observada em tumores HPV-positivos. O rompimento da janela de leitura (*open reading frames* ou ORFs) dos genes E1 e E2 acentua a expressão das oncoproteínas E6 e E7 e compromete a replicação do vírus (Tsakogiannis *et al.*, 2015).

A função carcinogênica provocada por HPVhr é correspondente à expressão dos oncogenes E5, E6 e E7 que conferem às células crescimento descontrolado, inibição da apoptose e imortalidade, condições essenciais para a transformação maligna das células e progressão da carcinogênese (Zur Hausen, 1996; Boulet *et al.*, 2007). Os oncogenes E6 e E7 são integrados ao DNA do hospedeiro, o mRNA e suas respectivas proteínas, são altamente expressas em células tumorais diagnosticadas HPVs positivas (Fan & Shen, 2018; Hoppe-Seyler *et al.*, 2018; Derby *et al.*, 2020).

A interferência no controle celular via oncoproteína E6, ocorre devido a sua interação com proteínas do sistema ubiquitina ligase (E6AP), juntas, irão ligar-se ao supressor tumoral p53, levando a degradação proteolítica do supressor e, por fim, desencadeando alterações no ciclo celular (Hoppe-Seyler *et al.*, 2018). Entretanto, toda regulação precisamente envolvida na montagem, ainda não está totalmente esclarecida. Li e colaboradores (2019) averiguaram que a degradação da proteína p53 acontece após a ubiquitinação da oncoproteína E6, e essa última somente seria marcada após chegada da proteína p53 ao complexo, mostrando que separadamente E6 e E6AP seriam incapazes de se ligarem ao supressor apoptótico.

Outra aliada no processo celular oncogênico é a oncoproteína E7, reguladora negativa da proteína do retinoblastoma (pRb), conhecida por promover a degradação proteossomal de pRb e causar o rompimento do ciclo celular normal (Giarrè *et al.*, 2001). A proliferação celular que E7 exerce em células tumorais HPV-positivo é possível através da degradação da pRb, que age como repressor da transcrição do fator de transcrição E2F na fase G1 (Litwin *et al.*,

2017). Uma vez livre do seu supressor pRb, E2F estará ativo e auxiliará na síntese dos genes envolvidos na progressão celular descontrolada (Wu *et al.*, 1993; Oh *et al.*, 2010a).

2.6 Atividades oncogênicas de E5 do HPV

A oncoproteína E5 atua nas fases iniciais da transformação dos queratinócitos e pode auxiliar no processo da malignização das lesões cervicais (Liao *et al.*, 2013; Paolini *et al.*, 2017). De tamanho pequeno, seus 83 aminoácidos apresentam interações de caráter hidrofóbico elevado. Por esta constituição, sua detecção é dificultada, por vezes realizada via técnica de reação em cadeia de polimerase quantitativa (qPCR) (Venuti *et al.*, 2011). A proteína E5 super expressa, encontrada nas células infectadas dos queratinócitos, localiza-se na região transmembranar do retículo endoplasmático (RE) ligada a partir da sua região C-terminal, implicando em alvos moduladores das bombas de prótons, e consequentemente, interferindo no pH homeostático da célula (Disbrow *et al.*, 2005).

Estudos prévios determinaram a interação da proteína E5 com a subunidade 16 kDa da H⁺-ATPase vacuolar, importante enzima responsável pela acidificação dos compartimentos internos de organelas (Rodríguez *et al.*, 2000; Briggs *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2004). Em menores níveis de produção proteica, E5 também pode ser detectada no aparato de Golgi, endossomos primários e RE (Venuti *et al.*, 2011). Recentemente, a atividade viroporina tem sido atribuída à E5, na qual muitos patógenos virais sintetizam proteínas que atuam no canal

iônico, e conduzem um pH mais propício para replicação viral (Müller *et al.*, 2015; Nieto-Torres *et al.*, 2015).

Esses dados sugerem que um dos efeitos da expressão do oncogene E5 nas células seja a regulação negativa da resposta imunológica via complexo principal de histocompatibilidade (*major histocompatibility complex* ou MHC) do tipo I. A alcalinização das organelas promovida por E5 alteraria a sinalização e o processamento intracelular suprimindo a apresentação de antígenos via MHC I (Schapiro *et al.*, 2000; Ashrafi *et al.*, 2005).

Além disso, o oncogene E5 do papilomavírus bovino (BPV) é capaz de se ligar ao receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (*platelet-derived growth factor β receptor* ou PDGF β -R), enquanto o oncogene E5 do HPV16 interfere no metabolismo do fator de crescimento epidermal (*epidermal growth factor* ou EGF), aumentando e prolongando a sua ativação, o que contribui para a progressão neoplásica celular (DiMaio & Mattoon, 2001; Campo *et al.*, 2010).

Importantemente, a expressão de E5 do HPV desencadeará a inibição da apoptose, passo importante para imortalização das células tumorais (Kim *et al.*, 2010; DiMaio & Petti, 2013). Em Oh *et al.* (2010b) observou-se que a proteína E5 do HPV16 é capaz de modular negativamente a apoptose induzida por peróxido de hidrogênio, isso ocorre devido ao estímulo exercido por E5 para ubiquitinação e degradação de proteínas envolvidas na via pro-apoptótica Bax. Por essas características, nos últimos anos, a oncoproteína E5 tem se destacado como alvo terapêutico.

2.7 Resposta imune ao HPV

A resposta imune inata representa a primeira barreira a ser ultrapassada pelo vírus. Na linha de frente da defesa imunológica, participam as células dendríticas, interferons (IFN), citocinas, além dos neutrófilos, macrófagos e células NK (*natural killer*). Como ocorre na maior parte das infecções por vírus de DNA, os HPVs possuem elementos genéticos que alteram a resposta inata, e podem levar ao bloqueio ou inibição da produção de interferons, citocinas ou a sinalização de receptores celulares (Mariani & Venuti, 2011).

Após adentrar a célula do hospedeiro, o HPV produz e libera os capsídeos infectantes, devido a habilidade dos queratinócitos infectados em escapar à imunovigilância realizada por células do sistema imune. O ciclo viral curto, próprio dos queratinócitos que se diferenciam rapidamente, favorece a resistência. Ainda, o ciclo lisogênico do HPV impede o processo inflamatório gerador da resposta imunológica (Westrich *et al.*, 2017).

Em um panorama favorável ao organismo hospedeiro, uma vez iniciada a replicação do vírus, o DNA viral do HPV16 ativará a sinalização celular por meio da proteína nuclear ausente em melanoma 2 (AIM2), caspase-1, interleucinas (IL-1 β), IFN- γ e proteína induzível 16 (IFI16). Todas essas moléculas são sensíveis a presença de DNA exógeno dentro da célula, e contribuem para o processo natural de resolução da infecção viral. Esse perfil de ativação é comumente encontrado em lesões e queratinócitos infectados por HPV16 (Mariani & Venuti, 2011; Reinholz *et al.*, 2013; Westrich *et al.*, 2017).

Por outro lado, a manutenção das formas episomais e replicações do genoma do HPV, sob o comando dos genes E1 e E2, permite a expressão

estratégica dos genes E5, E6 e E7. Nessas condições, os baixos índices da expressão gênica dos oncogenes dribla vias importantes e responsáveis pela ativação da resposta inata. As características mitigadoras dos HPVs de alto risco, como o tipo 16 e 18, são também necessárias para a evolução, persistência viral e condução à tumorigênese (Lo Cigno *et al.*, 2020).

Ainda no início do contato entre o vírus e o seu hospedeiro, a cascata de sinalização envolvendo o IFN, o receptor da superfície celular Janus quinase (JAK), e posteriormente, as proteínas transdutoras de sinal e ativadoras de transcrição (STAT 1 e 2) irão promover o controle da infecção viral a partir da resposta inata. Todavia, a supressão da via JAK ocorre pela expressão do oncogene E6, capaz de inibir moléculas sinalizadoras de IFN α e β , como as proteínas STAT 1 e 2, importantes ativadoras da via de sinalização de fosforilação. As modificações de E6 incluem o bloqueio da expressão de genes ativados por indução dos IFNs, indubitavelmente, as cascatas ligadas à resposta inata são alvos iniciais das oncoproteínas do HPV (Hong *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2020).

O HPV16 regula negativamente a expressão dos genes da via NF-kB e favorece o estabelecimento da infecção viral. A regulação positiva dos genes responsivos à via NF-kB causa o quadro de inflamação crônica, propício para o desenvolvimento das neoplasias como o câncer cervical (Nees *et al.*, 2001; Tilborghs *et al.*, 2017). Em estudo de Silva e colaboradores (2020), há evidências da oncoproteína E5 do HPV31 atuando na hiperativação da via NF-kB, diferindo da ação supressora dos oncogenes E6 e E7 sobre a via.

A expressão do gene E7 também interfere na regulação negativa do fator regulador de interferon (*Interferon regulatory factor* ou IRF). Além disso, a produção da oncoproteína E5 nas fases iniciais da infecção também auxilia o escape ao sistema imune do hospedeiro, por meio da inibição da produção das proteínas do MHC I, importante sinalizador na superfície das células infectadas (Um *et al.*, 2002).

Assim, a expressão das proteínas do HPV16, tanto na diferenciação de queratinócitos quanto nas fases da progressão tumoral, também são processos ligados diretamente a resistência e função imunológica do hospedeiro que, por sua vez, poderão refletir no surgimento ou não da doença (Lo Cigno *et al.*, 2020).

2.8 Resposta imunológica ao câncer cervical

2.8.1 O papel das citocinas do perfil Th1

As citocinas são parte importante na regulação do sistema imunológico. O sinal fornecido por essas moléculas distingue a resposta imunológica quanto ao nível e duração da ativação necessária, e atua como moduladora das células efetoras sobre as células-alvo (Silk & Margolin, 2019).

A avaliação da expressão e o balanço entre as citocinas do perfil Th1 e Th2 para a depuração do HPV ainda está sobre investigação, visto o papel pleiotrópico das citocinas no hospedeiro (Xu, 2014). As citocinas IFN- γ , IL-2 e o TNF- α são secretadas por células T auxiliares do tipo 1 (Th1) (Romagnani, 1999).

A IL-2 é primariamente produzida por células T CD4⁺, células NK e células dendríticas primadas por antígenos. A IL-2 possui ação ativadora e proliferativa, além de promover à ação antitumoral das células T CD8⁺ (Rosenberg, 2014).

Essa interleucina é a mais utilizada em estudos clínicos, justamente por seu papel em induzir a maturação e a diferenciação das células T imaturas para as suas formas efetoras, auxiliares, *natural killer* ou reguladoras. O seu potencial levou ao desenvolvimento de imunoterapias baseadas na expansão de células T induzidas por IL-2 e usadas para o tratamento de pacientes com melanoma (Behbahani *et al.*, 2007; Silk & Margolin, 2019).

Por outro lado, as células tumorais não possuem expressão natural dos receptores IL-2, o que torna essencial o seu estímulo pelos componentes da vigilância imune. Em camundongos, administração da IL-2 por via intraperitoneal após a inoculação das células T modificadas, tendo como alvo o antígeno tumoral E7 do HPV16, mostrou eficácia na remissão de tumores da linhagem 4050 e CaSki, o que aponta a IL-2 como importante fator imunoterápico (Jin *et al.*, 2018).

O fator de necrose tumoral (*Tumour necrosis factor* ou TNF) é uma importante citocina inflamatória, que pode ser induzida por infecção através dos receptores celulares TLR (*Toll-like receptors*) e via NF-kB. Um dos seus principais papéis é recrutar os macrófagos e linfócitos T ativados para os locais de danos ou infecção, resultando em apoptose (Balkwill, 2009). O uso local em tecidos tumorais deve-se ao seu papel em fragilizar a membrana do endotélio e as junções célula-célula, permitindo o melhor desempenho dos quimioterápicos, com morte seletiva das células endoteliais angiogênicas, o que levará a remissão tumoral. Na clínica, sua administração é realizada via perfusão isolada de membro (ILP) com taxas de resgate de membros em até 80% dos casos (Lejeune *et al.*, 2006).

O TNF possui papel pleiotrópico e, ainda hoje, busca-se delimitar o seu papel, uma vez que a regulação irregular à nível postranscricional ou de ligação ao receptor poderá inibir a resposta imune adequada (Salomon *et al.*, 2018). Além disso, polimorfismos na região promotora do gene $TFN-\alpha$ já foram associados à maior susceptibilidade ao câncer cervical por infecção do HPV16 (Deshpande *et al.*, 2005). Futuras abordagens para elicitação a nível sistêmico do TNF para imunoterapia contra o câncer incluem a produção de níveis adequados do TNF para ativação celular, combinado à ação permeabilizadora endotelial angiogênica, e administração de drogas que também visam à limpeza tumoral (Montfort *et al.*, 2019).

2.8.2 O papel das citocinas perfil Th2 e Th17

As citocinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 são liberadas por células T auxiliares do tipo 2 (Th2) (Romagnani., 1999; Da Costa *et al.*, 2019). A hipótese clássica da teoria da homeostase imunológica explana que deve haver equilíbrio biológico entre a secreção dos perfis Th1 e Th2, visto que ambos se regulam mutuamente (Kasakura, 1998; Kidd, 2003; Hariri *et al.*, 2005).

O ambiente tumoral comumente identificado nos casos de câncer cervical uterino (CCU) é baseado na expressão das citocinas Th2. A liberação aumentada das citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10 pode suprimir a resposta imune contra o câncer (Sharma *et al.*, 2009; Bedoya *et al.*, 2014). A IL-10 é uma citocina produzida principalmente por células B, células NK, monócitos, macrófagos, células dendríticas, e também células T. Esta citocina atua como reguladora da via Th1 e conseqüentemente, na resposta pró-inflamatória, podendo interferir no

controle antitumor baseado em células (Wei *et al.*, 2019). Enquanto isso, a citocina IL-4, pleiotrópica, produzida principalmente por macrófagos e linfócitos T, é também identificada como fator de crescimento de células B (*B-cell grow fator* ou BCGF) e tem sido estudada devido ao seu papel ainda não bem estabelecido no câncer (Puri & Siegel, 1993). A IL-4 tem sido relatada com atuação dupla, com efeitos antitumorais, enquanto o seu aumento no sangue periférico também foi associado ao maior risco de tumores de mama, próstata, cólon e pulmão (Lathers & Young, 2004).

A citocina IL-6 também possui caráter pleiotrópico e possui papel crítico no desenvolvimento de ambientes inflamatórios. Esta citocina poderá ser expressa e ativar resposta contra infecções, porém o seu aumento e persistência resultam em processos que favorecem o surgimento do câncer (Schmidt-Arras & Rose-John, 2016). As células tumorais possuem habilidade de sobreviver em ambientes altamente inflamatórios, o que confere a IL-6 potencial em ativar a proliferação e malignidade dessas células por meio da ativação da via STAT3. Além disso, o aumento da IL-6 no sangue de pacientes acometidos do câncer representa um prognóstico ruim (Wei *et al.*, 2003; Kumari *et al.*, 2016). Entretanto, a ativação do seu caráter Th2 é devido a sua capacidade em induzir células B e o equilíbrio das respostas reguladoras entre células T (Rose-John, 2018). Também de caráter pleiotrópico, seu envolvimento na modulação anticâncer ou pró câncer ainda está em discussão (Liu *et al.*, 2014).

Alguns trabalhos têm reportado aumento significativo da IL-10 e IL-17 em pacientes portadores de CCU, e mostra aumento desproporcional do perfil Th17 e do Th2, relacionados ao avanço da gravidade das lesões (Zhang *et al.*, 2011; Lin

et al., 2019). Recentemente, a interleucina 17, derivada da célula T CD4⁺ auxiliar perfil Th17, tem sido estudada quanto ao seu papel em relação ao câncer (Chang, 2019). No entanto, um estudo associou significativamente IL-17 a maiores taxas de sobrevida em 85 pacientes portadoras do câncer no ovário e ascite com intervalo de confiança de 95%.

O perfil de citocinas relacionados à infecção com o HPV auxilia o entendimento sobre o mecanismo envolto na resistência e resolução tumoral. No entanto, ainda existe muita dificuldade em relacionar as diferentes abordagens locais e periféricas da resposta imunológica, em humanos e animais, *in vivo* e *in vitro* (Scott *et al.*, 2013).

2.8.3 Imunidade Inata

A inflamação conduzida por agentes externos e internos, infecções virais e mutações genéticas, respectivamente, consistem em possíveis causas da progressão do câncer. Porém, as células tumorais secretam um conjunto de biomoléculas, como citocinas e quimiocinas, espécies reativas de oxigênio (ROS) além dos mediadores associados à morte celular (TNF- α), interferons e interleucinas. Essas biomoléculas recrutam células como leucócitos, neutrófilos, macrófagos, linfócitos, mastócitos e células dendríticas, e após a ativação necessária, são capazes de migrar e atuarem sobre o tumor (Hemmat & Baghi, 2019).

O sistema imunológico tem habilidade para reconhecer antígenos associados a tumores (*Tumor-associated antigens* ou TAA) endógenos ou provenientes do vírus. O perfil do reconhecimento anti-TAA é usado para

modulação da resposta imune a partir do uso de citocinas e vacinas no tratamento de tumores, uma vez que naturalmente, nem sempre a célula induzirá à regressão tumoral (Brigati *et al.*, 2002).

Nos infiltrados tumorais, é comum a presença dos macrófagos associados a tumor (*Tumor-associated macrophages* ou TAMs). Esses macrófagos são recrutados em sua maioria pela proteína MCP-1 (*Monocyte chemoattractant protein-1*), quimiocina recrutadora de monócitos e macrófagos. A expressão diferenciada desses marcadores entre os tecidos de lesões cervicais é relatada em lesões NIC III, na qual a detecção da proteína MCP-1 é nula, assim como a presença dos macrófagos não foi identificada. No entanto, em tecidos adjacentes aos carcinomas cervicais há alta expressão da MCP-1 e acúmulo dos macrófagos infiltrantes (Kleine-Lowinski *et al.*, 1999).

A dualidade exercida por TAM ocorre devido a habilidade dessas células em produzir as citocinas inflamatórias IL-6 e TNF- α , promotoras do perfil celular citotóxico, e, em também induzir imunossupressão e formação de fatores angiogênicos essenciais à progressão tumoral. Os TAMs imaturos não são eficazes contra tumores, mas tornam-se citotóxicos após indução com INF ou IL-2 (Brigati *et al.*, 2002).

As citocinas IL-6, IL-10 e TNF- α dosadas a partir da secreção cervical de amostras HPV-positivas, lesões intraepiteliais escamosas de baixo-grau (LSIL ou *Low-grade squamous intraepithelial lesions*) e lesões intraepiteliais escamosas de alto-grau (HSIL ou *High-grade squamous intraepithelial*) apresentaram valores elevados quando comparados ao colo do útero normal. O aumento da IL-10 foi associado ao maior risco relativo para o desenvolvimento das LSIL, enquanto a

super expressão da TNF- α em mulheres com 40 anos ou mais, associou-se ao maior risco relativo para HSIL (Azar *et al.*, 2004).

Enquanto isso, as citocinas IL-2, IFN e IL-4 identificadas em tecidos cervicais monoinfectados com HPV procedentes de biópsia apresentaram expressão elevada quando confrontadas à tecidos co-infectados com HIV ou controles negativos e, diferentemente, a baixa expressão da IL-10 foi identificada em todas as situações (Behbahani *et al.*, 2007). Por outro lado, a IL-10 foi detectada com maior expressão em amostras do plasma de pacientes portadoras da neoplasia intraepitelial cervical grau III ou carcinomas, comparadas à indivíduos saudáveis (Bais *et al.*, 2005).

A secreção aumentada das interleucinas 17 e 10 também foi significativamente maior em amostras do sangue das pacientes portadoras de CCU confrontadas com portadoras da neoplasia intraepitelial do colo uterino (Zhang *et al.*, 2011). Outro dado curioso aponta que a IL-17 apresenta secreção significativamente maior em amostras de tumores frescos obtidas de pacientes com câncer cervical invasivo e portadores de HPV 16 e 18 comparadas à mulheres infectadas por outros tipos de HPV (Vidal *et al.*, 2015).

Recentemente, Lin e colaboradores (2019) reportaram que a secreção do perfil Th2 e Th17 é regulada positivamente ao passo que o perfil Th1 é regulado negativamente em amostras de CCU comparado ao grupo controle saudável. Em outro estudo, pacientes portadoras de CCU apresentaram queda na secreção das citocinas circulantes do perfil Th1 conforme evolução do estágio da lesão, enquanto o perfil Th2 exibiu aumento em estágios mais avançados (Lin *et al.*, 2020).

O desequilíbrio entre a secreção dos perfis das citocinas Th1, Th2 e Th17 tem sido notado e aponta a maior expressão das citocinas Th2 e a baixa regulação do perfil Th1 como fatores chaves para o desenvolvimento do câncer cervical (De Grujji *et al.*, 1999; Azar *et al.*, 2004; Bais *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2020; Bonin-Jacob *et al.*, 2021).

2.8.4 Imunidade celular adaptativa

O sistema imune adaptativo está subdividido em duas classes de respostas: a primeira resposta é mediada por anticorpos e a segunda por células, gerados a partir das células B e T, respectivamente (Alberts *et al.*, 2002). No timo, ao se tornarem maduras, essas células passam a expressar proteínas de superfície celular CD4⁺ e CD8⁺ (Litwin *et al.*, 2020).

Uma das principais formas de eliminação das células tumorais é baseada na resposta de células T citotóxicas. Os linfócitos T CD8⁺ ativados são encontrados nos tecidos linfoides e sangue, e além de combaterem a infecção e a reinfecção causada por vírus ou outros patógenos intracelulares, podem migrar para a lesão tumoral e promover apoptose (Gerritsen & Pandit, 2016).

A entrega desses antígenos tumorais aos linfócitos T imaturos ocorre principalmente a partir do contato com as células apresentadoras de antígenos via MHC I. Embora células tumorais tenham a capacidade de evadir ao sistema imune, os antígenos tumorais adequados são capazes de reconhecer, promover estímulos e diferenciar os linfócitos T imaturos para sua forma efetora citotóxica CD8⁺, além de designar os linfócitos T de memória (Zhang & Bevan, 2011; Maimela *et al.*, 2019). Diferentemente, as células T do tipo NK, com marcadores

de superfície celular CD16⁺, não necessitam do reconhecimento prévio à antígenos para ativação do perfil citotóxico e desempenham papel antitumoral naturalmente (Abel *et al.*, 2018).

Em estudo de Maskey e colaboradores (2019), o epitélio do colo do útero normal apresentou níveis de linfócitos T infiltrantes tumorais (LIT ou *infiltrating T-lymphocyte*) do tipo T CD8⁺ significativamente mais elevados, e a diminuição foi observada ao longo da progressão da gravidade da lesão. Enquanto no estroma, os índices de CD8⁺ não oscilaram entre lesões mais graves ou tecido normal. Em outro trabalho, os níveis de T CD4⁺ e T CD8⁺ foram maiores em tecidos normais quando comparados a lesões cervicais e o câncer (Litwin *et al.*, 2020). Além disso, a ocorrência das metástases é significativamente menor em pacientes que possuem LIT CD8⁺ (Ohno *et al.*, 2020). A administração de células T CD8⁺ reativas para os epítomos de E6 e E7 do HPV, após realização da quimioterapia, resultou em completa regressão durante 22 meses, com níveis de T CD8⁺ observados no sangue de pacientes até um mês após o tratamento (Stevanović *et al.*, 2015).

Por outro lado, a expressão prolongada e desregular do receptor de superfície celular PD-1 pode culminar em células T ativadas e funcionais, porém com baixa resposta efetiva, denominado estado anérgico, e pode comprometer tanto os linfócitos T CD4⁺ quanto T CD8⁺ (Schwartz, 2003; Otter *et al.*, 2019).

2.9 Vacina de DNA e eletroporação

Com o avanço tecnológico, novas abordagens terapêuticas têm emergido, e possibilitaram que há 30 anos, a primeira vacina de DNA fosse relatada por Wolff e colaboradores (1990). Desde então, vacinas de DNA são utilizadas para expressão de antígenos e modulação da resposta imune (Tang *et al.*, 1992).

Os principais mecanismos para inoculação de antígenos baseado em vacina de DNA são por: via intramuscular (IM) ou a via intradérmica (ID), e sendo entregues aos miócitos e queratinócitos, ou então às próprias células apresentadoras de antígenos (APCs) especializadas, como células dendríticas, podendo ter o auxílio de ferramentas, como a injeção intramuscular com ou sem eletroporação *in vivo* (Cordeiro *et al.*, 2018).

Para efetiva entrega da vacina de DNA ao núcleo da célula, as barreiras extra e intracelulares precisam ser ultrapassadas, e o método físico comumente utilizado é denominado por eletroporação (EP) (Lambricht *et al.*, 2016). A eletroporação permite o aumento de antígenos expressos intracelularmente (Monie *et al.*, 2009). Os pulsos elétricos aplicados permeabilizam a estrutura da membrana plasmática, e facilitam a passagem da molécula de DNA para o interior da célula através dos poros hidrofílicos criados na membrana (Wagner *et al.*, 2004).

Adentrando o núcleo celular, o plasmídeo vacinal contendo a informação antigênica usurpará a maquinaria de transcrição e de tradução da célula. A proteína gerada passará pelas etapas do processamento proteico que ocorrerá no proteossomo do citoplasma, gerando os epítomos imunogênicos de interesse. Os mesmos epítomos seguirão via transportador TAP ao RE, lá, as proteínas

chaperonas conduzem os peptídeos para ligação ao MHC, formando o complexo MHC/peptídeo. Os peptídeos serão apresentados na superfície celular através das vesículas do complexo de Golgi, e somente então disponíveis para o reconhecimento via receptores de células T (TCR) dos linfócitos (**Figura 4**).

No caso das vacinas de DNA, os antígenos serão entregues via MHC classe I e II, permitindo que ambas as respostas T CD8 e CD4, respectivamente, gerem a resposta imune humoral (apresentação cruzada) e celular. Para os tumores cervicais, é imprescindível a ativação da resposta imune celular na promoção do efeito terapêutico da vacina (Dunham, 2002; Cordeiro *et al.*, 2018).

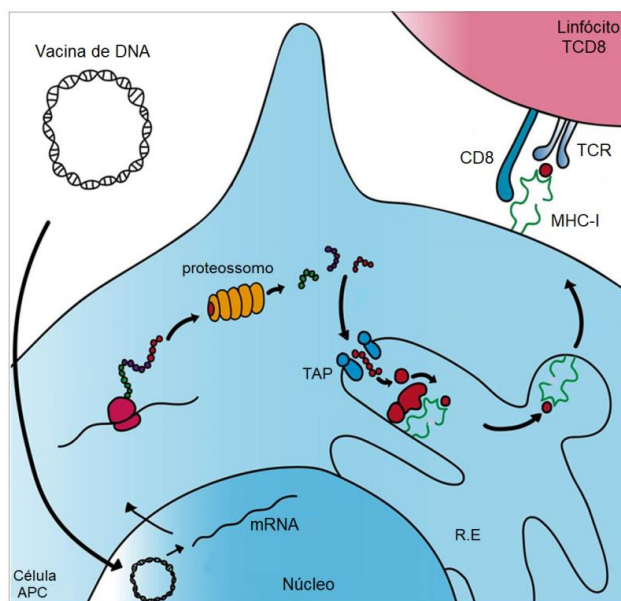
No presente contexto insere-se a necessidade do estabelecimento de novas abordagens vacinais, capazes de impedir a progressão de lesões pré-cancerosas, ou até mesmo a regressão de tumores existentes (Yang *et al.*, 2017).

As atuais vacinas profiláticas licenciadas são baseadas na resposta imune gerada após o reconhecimento das proteínas estruturais do capsídeo, e que culminam na produção de anticorpos neutralizantes. Diferentemente, as estratégias vacinais contra tumores induzidos por HPV e que vislumbram aplicação na imunoterapia do câncer empregam as oncoproteínas E5, E6 e E7 e geram respostas de células T citotóxicas. Ainda, vacinas de DNA aparecem cada vez mais como uma alternativa segura e de fácil fabricação, assinalando grande potencial nessa combinação (Cheng *et al.*, 2018).

A mais recente vacina terapêutica em fase II dos testes clínicos (VGX-3100) utiliza a abordagem das vacinas de DNA. Os seus peptídeos sintéticos são baseados nos oncogenes E6 e E7 dos HPVs 16 e 18, que apresentaram eficácia

em mulheres portadoras do câncer do colo do útero nos estágios NIC 2/3 (Trimble *et al.*, 2015).

Figura 4 - Mecanismo de processamento e apresentação de uma vacina de DNA via MHC-I. Após entrada na célula APC o plasmídeo seguirá até a apresentação via MHC I, onde reconhece o receptor de linfócitos TCD8, esse encontro poderá induzir a secreção de citocinas, ativação de células T por maturação levando a expansão clonal e células de memória contra o antígeno tumoral (adaptado de Cordeiro *et al.*, 2018).



3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento molecular de uma vacina de DNA terapêutica baseada em multiepítomos da oncoproteína E5 e a sua aplicação para o controle ou regressão de tumores induzidos pelo HPV16.

3.2 Objetivos específicos

1. Construir o plasmídeo pVAXE5m contendo epítomos da proteína E5 do HPV16 para expressão em células de mamíferos como proposta vacinal.
2. Avaliar a resposta imune induzida pela construção vacinal pVAXE5m em camundongos C57BL/6 via injeção intramuscular seguida por eletroporação *in vivo*.
3. Avaliar o perfil tóxico-hematológico a partir do sangue de camundongos imunizados com a construção vacinal pVAXE5m e desafiados com células tumorais C3.
4. Avaliar ação antitumoral desenvolvida em camundongos imunizados com a construção vacinal pVAXE5m e desafiados com células tumorais C3.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Construção da vacina de DNA

A sequência de nucleotídeos denominada E5m (374pb) foi sintetizada e clonada em vetor pUC19 pela empresa GenScript, com códon-otimização para expressão em *Mus musculus*. Os três epítopos contidos em E5m são referentes à oncoproteína E5 do HPV16 (GenBank ID: 1489077) (Tabela 1). Os epítopos imunogênicos para os linfócitos T citotóxicos e ligantes do MHC I alelo H-2-Db foram preditos pelas ferramentas presentes no IEDB (*Immune Epitope Database*) e citados por Kumar e colaboradores (2015). A construção pVAXE5m é constituída pelos epítopos duplicados e interpostos por dois segmentos ligantes, sendo o primeiro o motivo de ligação HEYGAEALERAG, sítio de clivagem para o sistema de degradação lisossomal e proteossomal dos eucariotos (Dolenc *et al.*, 1998). O segundo motivo ligante AAY, após a sua clivagem, gera em sua porção C-terminal o sítio apropriado para ligação ao transportador TAP, importante para apresentação de epítopos, aprimorando a resposta celular (Bergmann *et al.*, 1996; Uebel *et al.*, 1997; Nezafat *et al.*, 2014).

Tabela 1. Epítopos utilizados na construção vacinal pVAXE5m.

Peptídeo ¹	Sequência	Alvo MHC-I	Alvo Celular
E5 ₅₅₋₉₆	FCVLLCVCLLIRPL	Alelo H-2-Db	Linfócito T CD8
E5 ₁₇₈₋₂₁₅	FIVYIVFVYIPLF	Alelo H-2-Db	Linfócito T CD8
E5 ₁₀₀₋₁₄₁	LSVSTYTSLLLV	Alelo H-2-Db	Linfócito T CD8

¹ Epítopos de E5 preditos pela ferramenta IEDB e citados em Kumar *et al.* (2015).

A sequência E5m foi excisada do vetor pUC19 por digestão dupla com as enzimas *Bam*HI e *Eco*RI. A subclonagem foi realizada em vetor de expressão pVAX1 (Invitrogen) também por meio de digestão enzimática, utilizando os mesmos sítios de corte. A reação de ligação foi realizada pela ação da enzima T4 ligase, e posteriormente, a construção plasmidial pVAXE5m foi utilizada para transformação de bactéria *Escherichia coli* DH5α quimiocompetente por método de choque térmico. A escolha dos clones e a confirmação da subclonagem da construção pVAXE5m foi realizada por digestão enzimática e sequenciamento. A construção pVAXE5CP contendo o gene E5 do HPV16 fusionado ao gene CP (*coat protein*) do PotatoVirus X foi aproveitada de estudos anteriores (Paolini *et al.*, 2017) e cedida pelo Dr. Aldo Venuti (Instituto Regina Elena, Roma, Itália). Para a etapa de imunização, a extração dos plasmídeos vacinais livres de endotoxinas foi obtida a partir do kit de Maxiprep *Endotoxin-free*, de acordo com orientações do fabricante (Invitrogen).

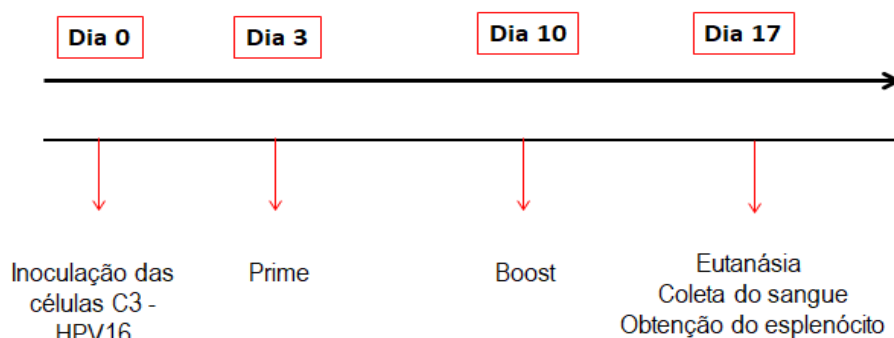
4.2 Desafio tumoral e Imunização

Camundongos fêmeas C57BL/6 entre 6-8 semanas de vida, provenientes do biotério do Instituto Aggeu Magalhães (Recife, Brasil) foram divididos em 4 grupos experimentais, 5 animais por grupo. Todos os animais foram imunizados por via subcutânea com 5×10^6 da célula tumoral C3 (contendo genoma do HPV16). Todas as células C3 foram previamente cultivadas em meio RPMI com 10% de soro fetal bovino de acordo com o protocolo de Cordeiro *et al.* (2015). Os quatro grupos foram nomeados NaCl (animais imunizados com solução salina 0,9%), C3 (animais não imunizados e somente inoculados com célula C3), E5CP

(animais imunizados com plasmídeo pVAXE5CP) e E5m (animais imunizados com plasmídeo pVAXE5m) (**Figura 5**).

Antes do procedimento de imunização, os animais foram anestesiados com solução de cloridrato de xilazina (10 mg/Kg) e cetamina (115 mg/Kg). 50µg dos plasmídeos vacinais foram ressuspensos em 50µl de solução salina e injetados por via intramuscular, na região *tibialis* esquerda, seguido de eletroporação *in vivo* (2 pulsos de 100V por 30ms) (BTX830 Harvard Apparatus) segundo protocolo modificado de Cordeiro et al. (2018). As imunizações ocorreram duas vezes, *Prime* e *Boost* homólogos, com intervalo de 7 dias para cada dose, utilizando 50µg dos plasmídeos por dose. O grupo C3 não foi submetido a imunização ou eletroporação. O crescimento dos tumores foi aferido com auxílio de caliper digital e o volume tumoral estimado de acordo com a fórmula ($\text{largura}^2 \times \text{comprimento} \times 0.52$) (Cordeiro et al., 2018). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o guia estabelecido pelo comitê de ética para uso de animais aprovado pelo Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ-PE) (CEUA Protocolo Nº 99/2016).

Figura 5 - Esquema do cronograma de imunização. Os camundongos C57black foram inoculados com células C3-HPV16 e receberam o *Prime* e *boost* homólogos das vacinas de DNA (pVAXE5m), (pVAXE5CP) e (0,9 % solução salina) administrados por via intramuscular (i.m) seguida de eletroporação (EP). O grupo C3 somente foi inoculado com células, sem eletroporação.



4.3 Isolamento e cultura de célula do baço

Após a eutanásia dos animais, o *pool* de células do baço referente aos grupos de animais foi devidamente isolado e cultivado de acordo com da Cruz Filho et al. (2019). Anteriormente, os camundongos foram anestesiados com cloridrato de xilazina (10 mg/Kg) e cetamina (115 mg/Kg) e eutanasiados por meio de deslocamento cervical. Os esplenócitos foram depositados em tubos contendo o meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) e separados por grupo experimental. Para o isolamento das células mononucleares foi utilizado o Ficoll-Paque PLUS 1.077 g/mL (GE Healthcare) e a suspensão celular distribuída em placas de 48 poços, 10^6 células/poço. Os cultivos celulares foram mantidos à 37°C com 5% de CO₂ e estimuladas por 24h e 48h com o peptídeo LSVSTYTSLLLVL proveniente da oncoproteína E5 do HPV16 (sintetizados pela GenOne Biotechnologies).

4.4 Investigação do estresse oxidativo celular *in vitro*

Para a investigação do estresse oxidativo celular, os esplenócitos foram estimulados com o peptídeo LSVSTYTSLLLVL, cultivados em placas de 24 poços, por 24 horas em meio RPMI 1640 e incubados à 37°C com 5% de CO₂. Foram investigadas as espécies reativas de oxigênio citosólicas (ROScito) através do marcador Dihidroetídio (DHE) e mitocondriais (ROSmito) através do marcador MitoSox (ambos da ThermoFisher Scientific). Além disso, também foram investigadas as mudanças no potencial da membrana da mitocôndria ($\Delta\Psi_m$) (marcador MitoStatus, BD Biosciencies) e na liberação de cálcio citosólico (Ca²⁺cito) através do marcador Fluo-3AM (ThermoFisher Scientific). Todas as aquisições foram realizadas em Citômetro de Fluxo FACS Calibur (BD

Biosciences) em 10.000 eventos e as análises foram obtidas através do programa Flowing 2.01 (Turku Centre for Biotechnology).

4.5 Citocinas do sangue periférico e *in vitro*

As citocinas IL-2, IL-4, TNF- α , IL-10 e IL-17 das células esplênicas estimuladas e cultivadas nos tempos de 24h e 48h foram determinadas. O sangue obtido dos grupos de animais também foi analisado quanto ao mesmo perfil de secreção das células do baço, ambos, de acordo com o fabricante (Kit CBA Mouse Th1/Th2/Th17, BD Biosciences). Todas as aquisições foram realizadas em Citômetro de Fluxo FACS Calibur e as análises foram obtidas através do programa Flowing 2.01.

4.6 Imunofenotipagem das células do sangue periférico e *in vitro*

Para a detecção da resposta de linfócitos T induzidos pelas vacinas, a imunofenotipagem das células circulantes do sangue e isoladas do baço para as culturas foi avaliada. As células foram centrifugadas, lavadas com PBS (suplementado com BSA 0,5% e azida 0,1%) e incubadas com os anticorpos utilizados para a marcação das células de camundongos anti-CD4-FITC, anti-CD8-PE e anti-CD16/32-FITC, segundo protocolo do fabricante (BD Biosciences). Todas as aquisições foram realizadas em Citômetro de Fluxo FACS Calibur em 10.000 eventos e as análises foram obtidas através do programa Flowing 2.01.

4.7 Análises hematológicas dos animais experimentais

Todos os camundongos foram previamente anestesiados para o momento da eutanásia e para coleta do material sanguíneo por meio da punção cardíaca. As amostras foram depositadas em tubos contendo o anticoagulante *EDTA K₂* (Hemstab), separados de acordo com os seus respectivos grupos, e em seguida centrifugados a 3600 rpm por 10 minutos para separação do plasma.

Para a análise hematológica, as contagens globais de hemácias, leucócitos, plaquetas, determinação do hematócrito e da concentração de hemoglobina foram realizadas. O cálculo dos índices hematimétricos, referentes ao volume corpuscular médio e concentração de hemoglobina corpuscular média foram possíveis a partir dos dados obtidos para hemácias, hematócrito e hemoglobina.

O hemograma foi obtido através da contagem em câmara de Neubauer e contagem diferencial em lâminas coradas pelo método Panótico Rápido. Enquanto o número de plaquetas foi determinado por método de Fonio e a hemoglobina mensurada por método colorimétrico, por espectrofotometria. A determinação dos níveis de glicose, ureia e creatinina foram obtidos através do ensaio enzimático colorimétrico de ponto final.

Para a detecção da fosfatase alcalina, foi utilizado o teste cinético colorimétrico Roy modificado, e a detecção das transaminases hepáticas realizada a partir do teste Reitman Frankel.

4.8 Análise estatística

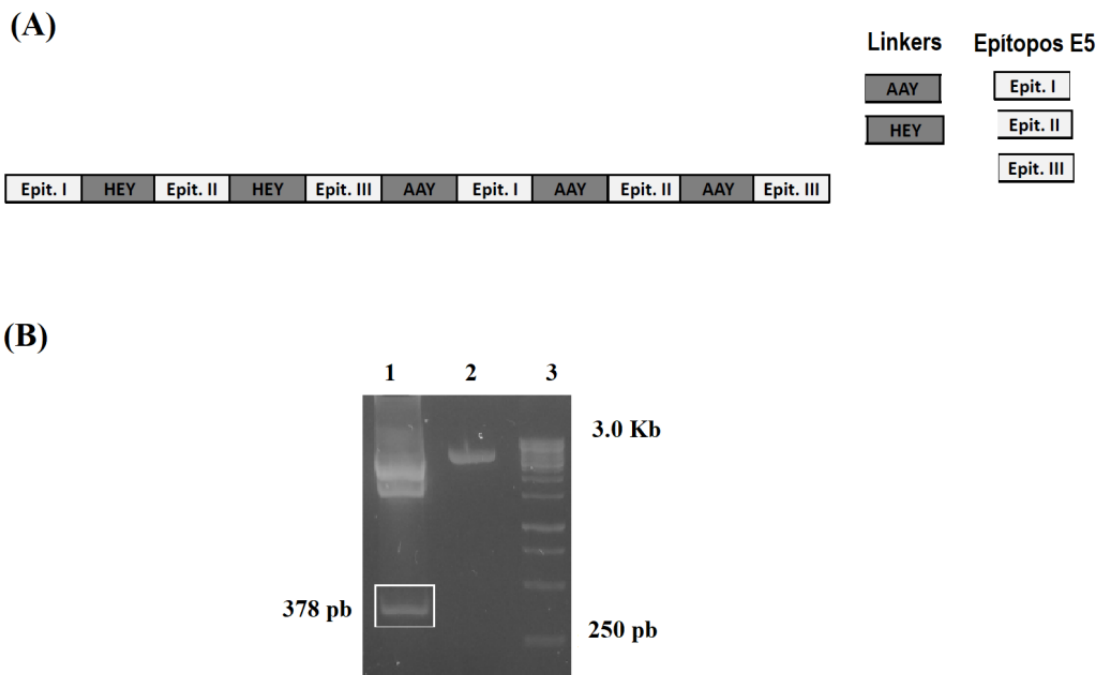
Os dados foram apresentados com os desvios padrão ($\pm$ SD). O teste de análise da variância (ANOVA) múltiplas comparações foi aplicado para avaliar diferenças estatísticas entre os grupos. Os valores de $*p < 0,0001$ e $**p < 0.0005$ foram considerados estatisticamente significantes para todas as análises, exceto a análise do estresse oxidativo, na qual os valores $*p \leq 0.0001$; $**p \leq 0.002$; $***p \leq 0.04$ foram considerados estatisticamente significantes. Todos os gráficos e as análises estatísticas foram gerados com auxílio do programa *GraphPadPrism* versão 7.04.

5 RESULTADOS

5.1 Construção das vacinas de DNA

O gene sintético E5 multiepítotos (E5m) foram produzidos e clonados em vetor pUC19 (**Figura 6A**). Após a transformação e liberação dos insertos contidos no vetor pUC19, a etapa de subclonagem foi realizada. A sequência E5m liberada por digestão com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Eco*RI foi purificada e, em seguida, ligada ao vetor de expressão pVAX1. A confirmação da subclonagem adequada dos genes sintéticos ao vetor pVAX1 foi realizada por digestão enzimática (**Figura 6B**) e sequenciamento.

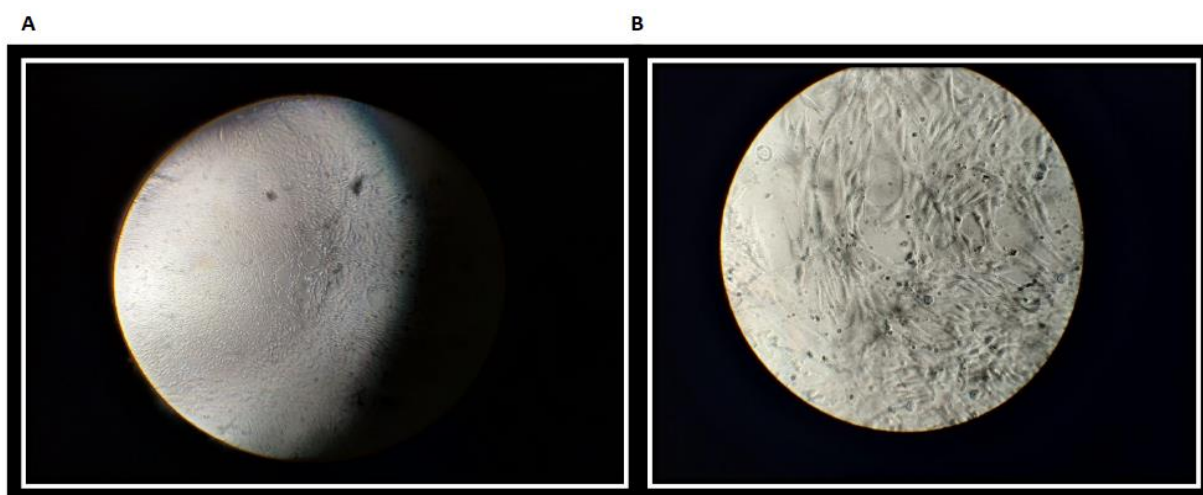
Figura 6 - Esquema e digestão da construção pVAXE5m. **A)** Esquema mostra a disposição dos epítotos e *linkers* contidos na construção vacinal de trabalho. **B)** **1.** Gel evidenciando a digestão do DNA plasmidial extraído da construção pVAXE5m (enzimas *Bam*HI e *Eco*RI). **2.** Gel evidenciando a digestão do DNA plasmidial extraído da construção pVAXE5m (apenas a enzima *Bam*HI). **3.** M. Marcador de corrida de 1Kb - (ThermoScientific). Eletroforese em gel de agarose 1%, em TAE 1X. Voltagem 100V por 30 minutos.



5.2 Desafio tumoral

Nós investigamos a atividade antitumoral das vacinas de DNA em camundongos desafiados com células da linhagem tumoral C3 (**Figura 7A e B**). As células foram cultivadas e quantificadas quando em confluência aproximada de 70% em câmara de Neubauer, para uma concentração final de 5×10^5 por animal.

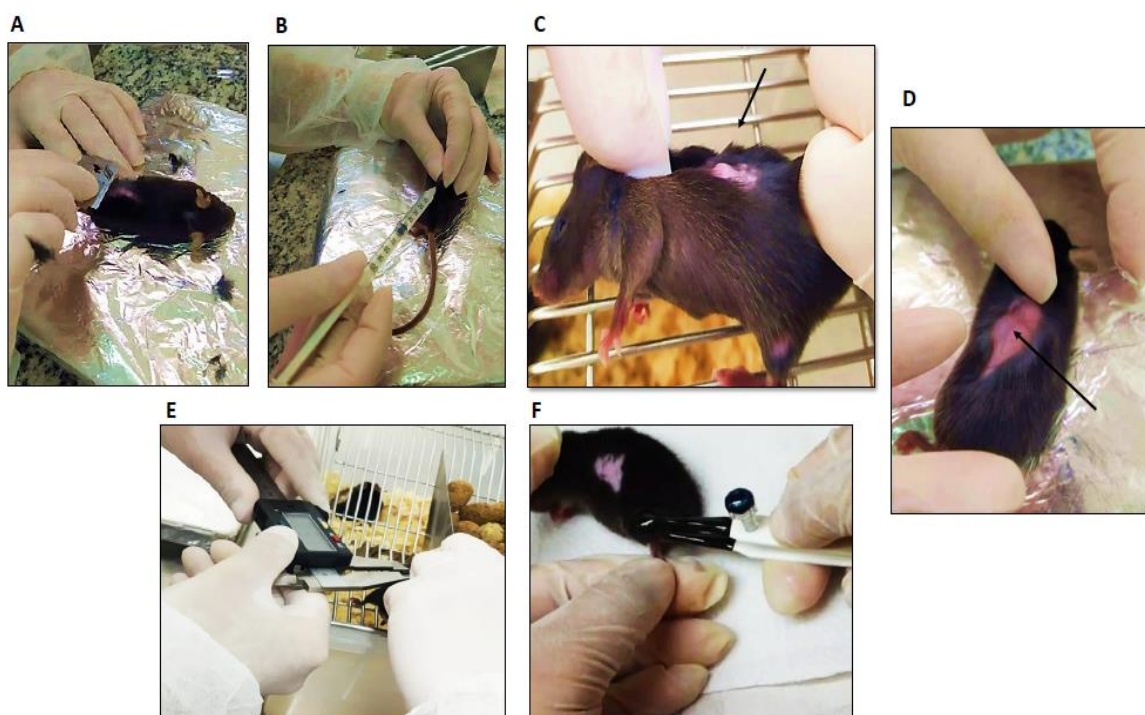
Figura 7 - A célula C3. Células embrionárias de camundongos C57black contendo o genoma do HPV16) cultivadas em meio RPMI com 10% de soro fetal bovino utilizadas no desafio tumoral. Visualização em microscópio invertido. **A.** Célula C3 aderida e visualizada por aproximação de 4X. **B.** Célula C3 aderida e visualizada por aproximação de 20X.



Após a tricotomia realizada em todos os camundongos, esses foram inoculados com as células na região dorsal. O acompanhamento dos animais realizado nos 17 dias experimentais, e as medidas tumorais foram anotadas 4 vezes durante todo este período. 3 dias após o desafio, os grupos apresentaram crescimento tumoral insignificante, e a evolução do tamanho desses tumores entre os grupos foi acompanhada.

No terceiro e sétimo dia após o desafio, a eletroporação foi efetivada logo após o *prime* e o *boost* vacinal homólogo (**Figura 8A-F**).

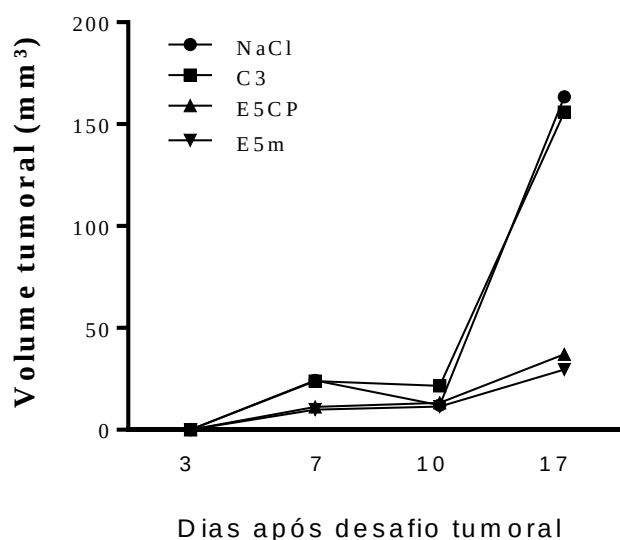
Figura 8 - Etapas do desafio tumoral e eletroporação. **A.** Tricotomia. **B.** Inoculação das células C3 por via subcutânea. **C.** Tumor identificado 7 dias após desafio tumoral **D.** Tumor identificado 10 dias após desafio tumoral. **E.** Caliper digital utilizado para aferir o tamanho dos tumores. **F.** Pinça utilizada para eletroporação na perna esquerda pós vacinação.



5.3 Efeito antitumoral

Os resultados demonstraram que o crescimento tumoral dos animais dos grupos NaCl e C3 foram maiores especialmente após o 10º dia do ensaio (**Figura 9**). Diferentemente, animais tratados com as vacinas E5m e E5CP foram capazes de atrasar o crescimento do volume tumoral entre o 10º e o 17º dias, com diferença significativa de E5m sobre os demais grupos. Assim como a vacina pVAXE5CP, os animais vacinados com pVAXE5m mostraram efetivo controle tumoral frente à NaCl e C3, confirmando dados anteriores do grupo, e apontando um futuro promissor para vacinas anti-tumor específicas para a resposta E5.

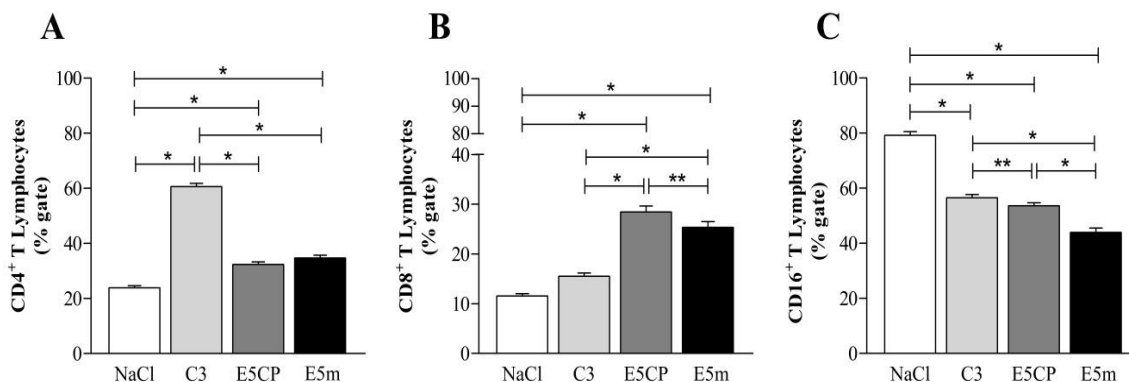
Figura 9 - Crescimento tumoral. Todos os quatro grupos de fêmeas de camundongos C57BL/6 foram inoculados com células C3-HPV16 para avaliação antitumoral específica das vacinas E5. São eles: *NaCl* - animais imunizados com 0,9% de solução salina; *C3* - controle não imunizado; *E5CP* - imunizado com vacina pVAXE5CP; *E5m* - imunizado com vacina pVAXE5m. As vacinas foram previamente diluídas em solução salina antes da inoculação. A imunização ocorreu por via intramuscular seguida de eletroporação *in vivo*, com exceção ao grupo C3 que não foi imunizado e nem eletroporado.



5.4 Perfil imunológico dos animais experimentais *in vivo*

O sangue periférico dos camundongos foi recuperado para avaliar o perfil imunológico provocado pelo tumor e pelas vacinas. O grupo C3 induziu um aumento dos linfócitos T CD4⁺ e CD16⁺, mas houve diminuição dos linfócitos T CD8⁺ (**Figura 10A-C**). Já o grupo NaCl somente mostrou alto nível de estímulo para linfócitos T CD16⁺ (**Figura 10C**). Os animais imunizados com as construções vacinais mostraram comportamento similar entre eles e, diferentemente ao grupo C3, induziram baixa contagem de linfócitos T CD4⁺ e alta contagem de linfócitos T CD8⁺ (**Figura 10A e B**).

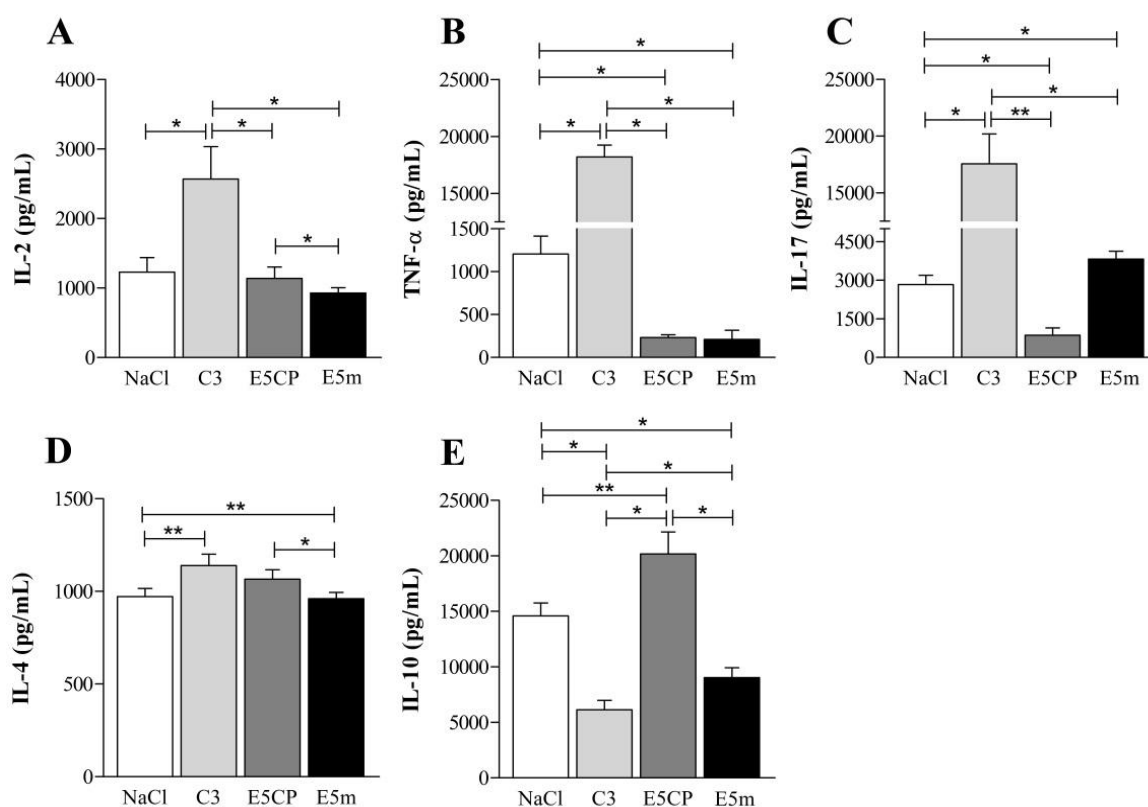
Figura 10 - Expressão dos marcadores das células linfocitárias *in vivo*. Concentração dos linfócitos T CD4⁺ (**A**), T CD8⁺ (**B**) e T CD16⁺ (**C**) provenientes do sangue periférico de animais NaCl, C3, E5CP e E5m após 17 dias do desafio tumoral da linhagem C3. * $p \leq <0,0001$; ** $p \leq 0.0005$.



O resultado das citocinas circulantes no sangue mostrou que animais do grupo C3 tiveram aumento das citocinas IL-2, IL-4, IL-17 e TNF- α , e diminuição das citocinas IL-10 (**Figura 11A-E**). O grupo NaCl mostrou aumento das citocinas IL-10, IL-17 e TNF- α , e IL-4 em relação aos vacinados E5m. O grupo E5CP induziu alta produção de citocinas IL-10 e IL-4, e menor de citocinas IL-17 e TNF- α .

Embora tenha havido baixa produção de IL-2 proveniente de E5CP, essa foi significativamente superior a E5m. De outro modo, o grupo E5m induziu altos níveis de IL-10 em relação a animais C3, além de produção de IL-17 moderada frente aos grupos E5CP e NaCl, e menor das citocinas IL-2, IL-4 e TNF- α . Embora a investigação do sangue periférico seja importante, outros interferentes sanguíneos advindos do organismo animal podem interferir nos parâmetros imunológicos.

Figura 11 - Secreção de citocinas *in vivo*. Concentração das citocinas circulantes IL-2 (A), TNF- α (B), IL-17 (C), IL-4 (D) e IL-10 (E) provenientes do sangue periférico de animais NaCl, C3, E5CP e E5m após 17 dias do desafio tumoral da linhagem C3. * $p \leq 0,0001$; ** $p \leq 0,0005$.



5.5 Parâmetros hematológicos dos animais experimentais

O perfil hematológico dos procedimentos experimentais adotados e das estratégias vacinais foi avaliado a partir do sangue obtido, individualmente, coletado via punção cardíaca dos animais estudados. Os testes hematológicos para hemoglobina e hematócrito apresentaram valor dentro do desvio padrão referencial, enquanto MCV, MCHC e leucócitos mostraram valores próximos aos valores de referência (Tabela 2). Todavia, os leucócitos do grupo C3 mostraram-se mais elevados entre os grupos. Por outro lado, a análise dos neutrófilos, linfócitos e monócitos apresentou resultados alterados comparados ao valor referencial, com menores valores observados em relação aos monócitos, onde somente C3 apresentou valor dentro do desvio padrão. Além disso, os níveis observados no hemograma para as plaquetas mostraram-se inferiores ao referencial, especialmente para os animais do grupo E5m.

Entretanto, na maior parte dos parâmetros analisados, os resultados obtidos entre os grupos de animais mostraram-se pouco distintos. Os parâmetros bioquímicos foram determinados e desvios maiores para uréia, aspartato aminotransferase e fosfatase alcalina, e menores para glicose e creatinina foram notados em relação ao valor de referência (Tabela 2).

Tabela 2: Parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue periféricos de animais experimentais

Testes hematológico	NaCl	C3	E5CP	E5m	Valores de referência
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	5.09 ± 0.45	5.4 ± 0.08	5.48 ± 0.31	4.86 ± 0.41	9.42 ± 0.245
Hemoglobina (g/dL)	15.18 ± 1.47	16.65 ± 0.49	16.55 ± 1.11	14.42 ± 1.25	13.4 ± 1.0
Hematócrito (%)	45.8 ± 4.55	50 ± 1.41	49.75 ± 3.40	44 ± 4.64	45.9 ± 1.59
(MCV) (U^3)	92.54 ± 3.03	94.35 ± 1.41	93.82 ± 2.59	91.04 ± 3.39	48.9 ± 1.23
(MCHC) (%)	33.24 ± 0.19	33.4 ± 0.14	33.27 ± 0.21	33.12 ± 0.13	29.3 ± 35.9
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	8.8 ± 0.69	9.15 ± 0.21	8.77 ± 0.4	8.06 ± 0.93	6.9 ± 1.6
Neutrófilos (%)	42.8 ± 3.7	43.5 ± 6.36	48 ± 5.1	44.6 ± 1.82	23.4 ± 0.6
Linfócitos (%)	54 ± 2.92	46 ± 1.41	49.25 ± 4.57	52.6 ± 1.95	87 ± 4.7
Eosinófilos (%)	1.2 ± 0.45	1.5 ± 0.71	1 ± 0.0	1.6 ± 0.55	2 ± 2
Monócitos (%)	2 ± 1.0	4 ± 2.83	1.75 ± 0.96	1.2 ± 0.45	5 ± 2
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	419.2 ± 38.69	457.5 ± 4.94	432.7 ± 28.18	371 ± 62.87	985 ± 140
Testes Bioquímicos					
Glicose	74.48 ± 5.67	75.45 ± 3.75	81.85 ± 11.83	77.6 ± 4.92	185 ± 4
Ureia (mg/dL)	67.4 ± 3.51	63.15 ± 4.31	64.35 ± 3.48	63.6 ± 2.53	31 ± 2.5
Creatinina (mg/dL)	0.42 ± 0.02	0.55 ± 0.06	0.63 ± 0.08	0.46 ± 0.07	0.8 ± 0.3
Aspartato Aminotransferase (AST) (UI/L)	144 ± 2.21	126.7 ± 8.06	134.7 ± 12.11	138.8 ± 17.37	91 ± 33
Fosfatase Alcalina (UI/L)	169.2 ± 2.38	176.55 ± 0.78	167.05 ± 1.95	179.4 ± 18.25	120 ± 17

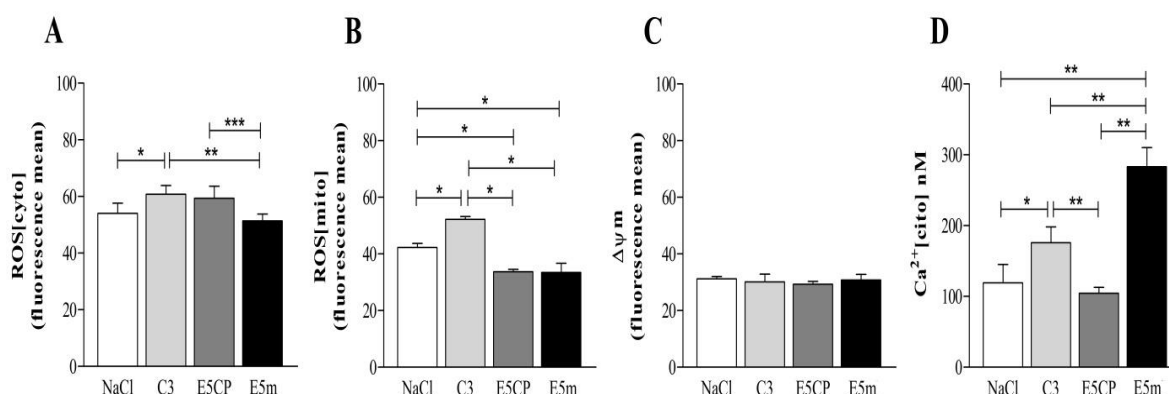
Fonte: Schnell et al., (2002); Barrios et al., (2009) e Santos et al., (2016).

5.6 Investigação *in vitro* do estresse oxidativo

Os ensaios *in vitro* foram realizados para avaliação do perfil de ativação e resposta imunológica de células T perante as vacinas propostas. Assim, as células primadas no organismo a partir das vacinas administradas puderam ser analisadas. Para tanto, o baço dos animais de cada grupo foi removido e os esplenócitos isolados e estimulados *in vitro* por 24 e 48 horas com o peptídeo E5 (LSVSTYTSLLLVL). Nesse contexto, a ativação celular, investigada por indução de estresse oxidativo nos esplenócitos, foi avaliada através de quatro sinais celulares diferentes e complementares. O grupo C3 promoveu um aumento nas espécies reativas de oxigênio (ROS) citosólicas e mitocondriais e, na liberação de alta quantidade de cálcio no citosol (**Figura 12A-D**). Interessantemente, os grupos contendo os animais imunizados com as construções vacinais não aumentaram os níveis de estresse oxidativo, enquanto o grupo E5m apenas induziu a liberação de cálcio em valores mais altos (**Figura 12D**). O potencial da membrana mitocondrial não foi alterado em nenhum grupo experimental.

Figura 12 - Ativação celular através da investigação do estresse oxidativo. Esplenócitos foram cultivados com o peptídeo de E5-HPV16 (LSVSTYTSLLILLVL) por 24 horas. A) Parâmetros sobre espécies reativas de oxigênio citosólicas (ROScyto), B) Parâmetros sobre espécies reativas de oxigênio mitocondrial (ROSmito), C) Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) e D) Liberação de cálcio no citosol (Ca^{2+} cito). Barras verticais representam as médias de 5 animais por grupo.

* $p \leq 0.0001$; ** $p \leq 0.002$; *** $p \leq 0.04$.



5.7 Resposta imune celular e de citocinas *in vitro*

Os resultados sobre a contagem de linfócitos T em culturas de esplenócitos mostraram que o grupo C3 apresentou ativação de linfócitos T $CD4^+$ em 24 e 48 horas, com maior produção de $CD8^+$ em 24 horas (**Figura 13A-C**). Os níveis de T $CD8^+$ gerados pelo grupo E5m foram superiores ao grupo C3 em 48 horas (**Figura 13B**), além de apresentarem aumento na contagem dos linfócitos T $CD4^+$ em 24 horas. As vacinas E5CP e E5m ativaram semelhantemente as respostas de linfócitos T $CD8^+$ e $CD16^+$ em 24 horas. Contudo, o grupo E5CP obteve destaque na produção de linfócitos T $CD4^+$ em 48 horas.

O grupo NaCl mostrou um aumento na contagem de $CD16^+$ em 24 horas e queda em seus níveis após 48 horas. As vacinas E5CP e E5m ativaram semelhantemente as respostas de linfócitos T $CD8^+$ e $CD16^+$ em 24 horas. Nota-

se também que, em dados gerais, as respostas T CD4⁺ e CD8⁺ foram aumentadas para o grupo E5m após 48 horas de ensaio. É importante ressaltar que, as estratégias vacinais adotadas promoveram, em sua maioria, um padrão próximo aos estímulos imunológicos originados pelos animais do grupo C3.

Os dados sobre a produção de citocinas no sobrenadante das culturas mostrou um perfil polifuncional Th1 e Th2 promovido pelas vacinas E5m e E5CP (**Figura 14A-F**). A vacina E5m induziu a secreção de citocinas IL-2, TNF- α e IL-17 em 24 horas (**Figura 14A, B e D**, respectivamente), e apresentou aumento significativo em seus níveis após 48 horas de ensaio. Importaneamente, dados da cultura E5m em 48 horas de incubação mostraram uma evidente indução da citocina TNF- α . Ainda, altos níveis de IL-4 foram induzidos pela vacina E5m em 48 horas e IL-10 em 24 horas. Os grupos E5CP e E5m promoveram um perfil de secreção de citocinas parecido, contudo, E5m despontou significativamente na maior parte dos casos. Em dados gerais, as culturas de NaCl e C3 também mostraram aspectos semelhantes em relação a indução de todas as citocinas, exceto os níveis de IL-2, TNF- α e IL-17 produzidos que em 24 horas se mostraram opostos entre esses grupos.

Figura 13 - Expressão dos marcadores das células linfocitárias *in vitro*. Concentração dos linfócitos TCD4+ (A), T CD8+ (B) e T CD16+ (C) provenientes do esplenócito de animais NaCl, C3, E5CP e E5m após estímulo do peptídeo de E5-HPV16 (LSVSTYTSLLILLVL) em 24 e 48 horas. * $p \leq 0,0001$; ** $p \leq 0.0005$.

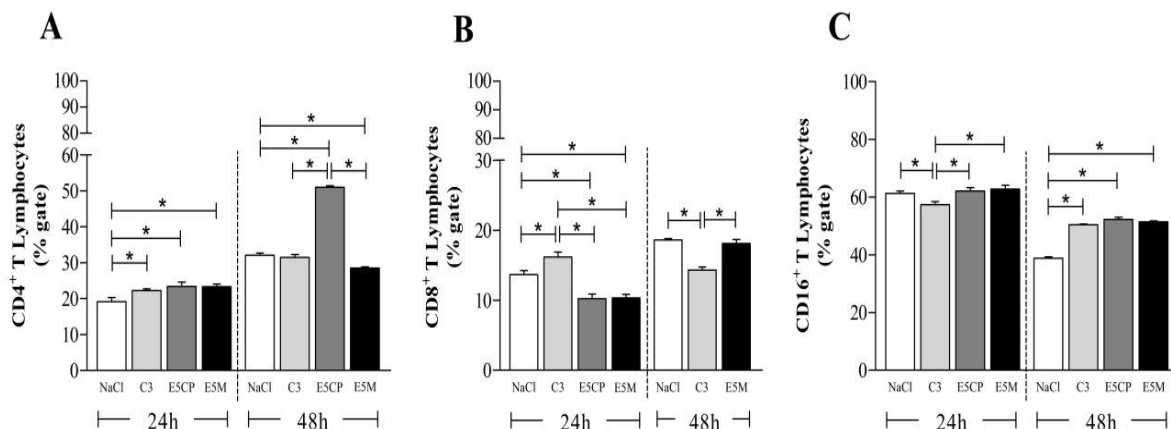
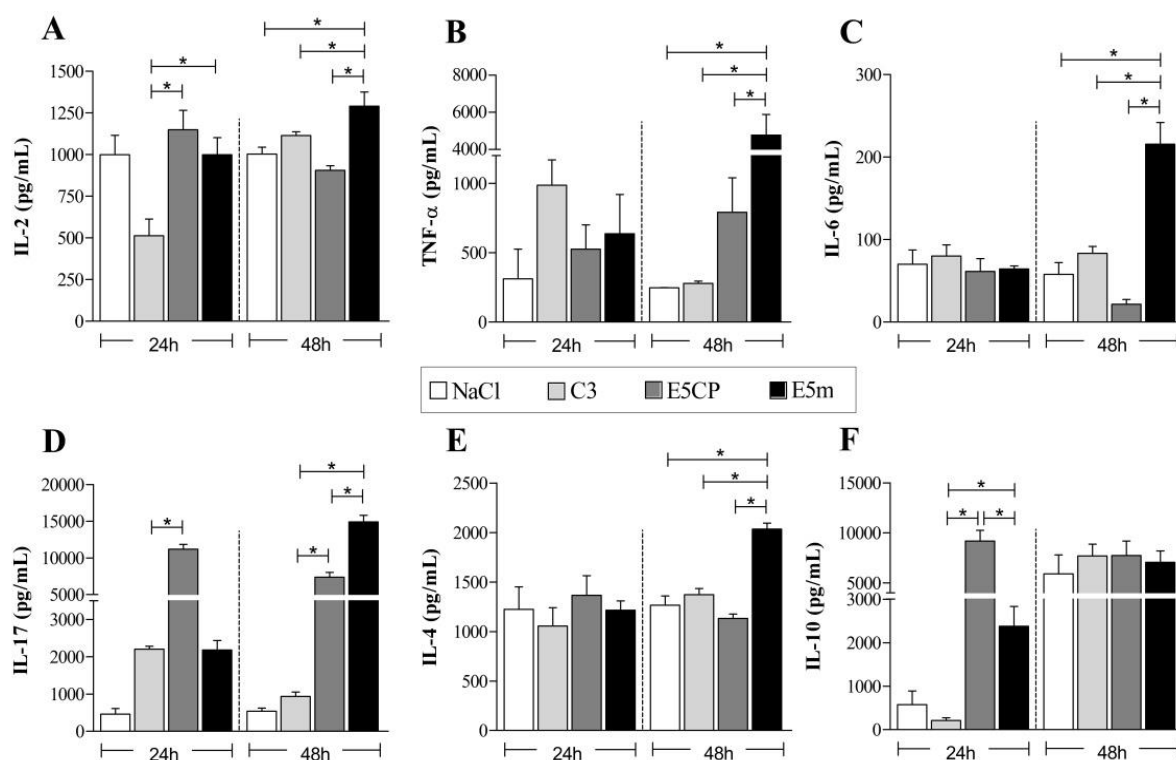


Figura 14 - Secreção de citocinas *in vitro*. Concentração das citocinas da cultura celular IL-2 (A), TNF- α (B), IL-17 (C), IL-4 (D) e IL-10 (E) provenientes do sangue periférico de animais NaCl, C3, E5CP e E5m após estímulo do peptídeo de E5-HPV16 (LSVSTYTSLLILLVL) em 24 e 48 horas. * $p \leq 0,0001$; ** $p \leq 0.0005$.



6 DISCUSSÃO

Recentemente, abordagens vacinais baseadas no gene E5 do HPV16 têm demonstrado resultados positivos no controle de tumores em modelos pré-clínicos (Liao *et al.*, 2013; Cordeiro *et al.*, 2015; Paolini *et al.*, 2017). Em trabalhos anteriores, nosso grupo de pesquisa mostrou que a imunização de animais com epítomos provenientes de sítios identificados como imunogênicos da oncoproteína E5 de HPV16 foi capaz de adiar a progressão ou reduzir tumores (Cordeiro *et al.*, 2015; Paolini *et al.*, 2017).

No presente estudo, desenvolvemos e testamos uma vacina de DNA (pVAXE5m) empregando uma combinação de epítomos imunogênicos da proteína E5 arranjados entre sequências ligadoras (Bergmann *et al.*, 1996, Dolenc *et al.*, 1998; Nezafat *et al.*, 2014) que aumentam o reconhecimento intracelular e melhoram a entrega dos peptídeos antigênicos. As regiões imunogênicas contidas no oncogene E5 propõem interação com moléculas do MHC I (alvo alélico H-2-D^b) e linfócitos T CD8⁺. Essas regiões foram testadas, e confirmam dados da predição de Kumar e colaboradores (2015). Ainda, avaliamos a competência de três epítomos, e nossos resultados estão de acordo com o Liao *et al.* (2013) quanto ao potencial imunodominante e antitumoral da região sobreposta (LSVSTYTSLLLV₁₀₀₋₁₄₁) da proteína E5. Para o nosso conhecimento, é a primeira vez que os outros dois epítomos de E5 são avaliados como antígenos-específicos em análises *in vivo* e *in vitro* participando dos arranjos de entrega para fins vacinais.

Para mimetizar o curso normal de infecção, o modelo pré-clínico de camundongos da linhagem C57BL/6 foi escolhido devido ao seu perfil de uniformidade genética e então avaliado após desafio tumoral com linhagem C3 (Song & Hwang, 2017; Kanodia *et al.*, 2008). Os resultados mostraram que o volume tumoral induzido foi menor em animais imunizados com a vacina pVAXE5m (Figura 3) e maior nos grupos NaCl e C3, e confirmaram dados que E5 pode prover epítomos antitumorais específicos importantes na ativação de células T citotóxicas (Liao *et al.*, 2013; Cordeiro *et al.*, 2015).

Os resultados sobre a regressão tumoral, e a ligeira expressão superior dos linfócitos T CD8⁺ comparado aos níveis de T CD4⁺ no grupo E5CP, a partir de linfócitos circulantes no sangue, estão de acordo com o visto previamente (Paolini *et al.*, 2017). Em nossos resultados, houve expressão levemente superior de células T CD4⁺ do grupo E5m em relação ao grupo E5CP, embora sem significância. Porém, os níveis de T CD8⁺ e T CD16⁺ foram significativamente maiores para E5CP.

A porcentagem de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ saudáveis em mulheres varia entre 40.2% e 31.3%, respectivamente (Uppal *et al.*, 2003). Em nossos resultados, os níveis de T CD4⁺ e T CD8⁺ no sangue e *in vitro* estão de acordo com dados observados em Das *et al.* (2018), no qual a porcentagem de células identificadas em sangue de pacientes em estágios avançados da doença oscilou entre 25% e 17%, respectivamente. No entanto, o mesmo estudo também aponta que os menores níveis de linfócitos são encontrados em tecidos tumorais.

Trabalhos prévios têm relatado o papel estratégico da resposta T CD4⁺ na indução da resposta T CD8⁺ antitumoral, capaz de promover diferenciação efetora e a formação de células T de memória antivirais (Stanley, 2006; Munk-Madsen *et al.*, 2018). Interessantemente, o mesmo perfil celular é identificado nas subpopulações de linfócitos T infiltradores de tumor em regressão e, sinaliza um bom prognóstico (Patel & Chiplunkar, 2009). Nosso estudo, a partir do sangue coletado de animais, mostrou que a administração da vacina pVAXE5m ativou células T CD4⁺ e CD8⁺ em níveis significativamente maiores do que o grupo controle NaCl (**Figura 10A e B**), sugerindo atividade desse conjunto de linfócitos T na remissão dos tumores vista nos animais vacinados em comparação com o grupo controle.

De outra maneira, o grupo C3 foi capaz de ativar significativamente células T CD4⁺ e CD16⁺ (**Figura 10A e C**), contudo, assim como no grupo NaCl, ambos apresentaram maior volume tumoral entre os grupos (**Figura 9**). Este resultado foi possível, visto que o acúmulo de linfócitos T anérgicos e imunossupressores já foi descrito e pode ser identificado em sangue de pacientes e em infiltrados tumorais (Schwartz, 2002; Maimela *et al.*, 2019; Maskey *et al.*, 2019; Ohno *et al.*, 2020). Além disso, a super expressão de células NK pode levar a competição por citocinas e espaço e ativar vias imunossupressoras de células reguladoras (Bachanova & Miller, 2014). Outra implicação comumente encontrada em ambientes tumorais HPV-positivos é a baixa apresentação de antígenos tumorais via MHC I culminando na menor atuação dos linfócitos T citotóxicos (CTL) (Song *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2019).

A secreção das citocinas circulantes no sangue teve perfil polifuncional Th1, Th2 e Th17, com os níveis mais elevados obtidos pelos grupos C3, NaCl e E5CP, semelhante ao visto em pacientes portadores de lesões de alto grau (Pita-Lopez *et al.*, 2014). Em nossos resultados, os níveis de citocinas Th1 e Th2 circulantes foram superiores aos obtidos por Namvar *et al.* (2020), onde animais vacinados com os epítomos E5 e E7 (HPV16,18, 31 e 45), administrados isoladamente ou não, apresentaram proteção superior de E7 sobre E5.

De outro modo, a maior produção da IL-2 nos grupos C3 e NaCl (**Figura 11A**) pode ser uma evidência da competição por IL-2 entre as células tumorais e os linfócitos T. A alta demanda por citocinas IL-2, direcionadas a proliferação descontrolada de células tumorais, leva a uma maior produção, porém, não atingindo o fator de crescimento e ativação dos linfócitos T (Rangel-Corona *et al.*, 2010) e implica na interferência do crescimento dos tumores na indução das citocinas nos grupos. Em contexto geral, o desequilíbrio e a super expressão das citocinas Th1, Th2 e Th17 no sangue está associado ao desenvolvimento e formas graves do câncer cervical, com modulação negativa e desfavorável aos grupos C3 e NaCl. No entanto, os níveis de secreção mais baixos no sangue, para o mesmo conjunto de citocinas pode ter modulado favoravelmente a resposta antitumoral observada no grupo E5m (Zhang *et al.*, 2011; Kumari *et al.*, 2016).

Embora a maioria dos testes hematológicos e bioquímicos tenha apresentado resultados semelhantes para os grupos (Tabela 2), algumas peculiaridades foram notadas. Os parâmetros renais de ureia e creatinina foram inferiores aos valores referenciais de animais saudáveis observados em Schnell

et al. (2002). Estudos já relataram que pacientes portadores do câncer cervical podem desenvolver complicações renais, além de mostrarem alterações nos níveis de ureia e creatinina (Souza *et al.*, 2016; Maguire *et al.*, 2020). Os dados hepáticos foram analisados pelos testes da fosfatase alcalina (ALP) e aspartatoaminotransferase (AST) com superioridade identificada frente aos valores de referência. Para Hung e colaboradores (2017), o acréscimo nos níveis de ALP esteve associado a tumores avançados e baixas taxas de sobrevivência em pacientes com câncer colorretal. Da mesma maneira, níveis séricos elevados da (AST) em pacientes portadores de tumores sólidos foram associados a um desfecho ruim (Wu *et al.*, 2019).

A análise hematológica realizada nesse estudo observou o perfil inflamatório sistêmico, e mostrou valores superiores para os neutrófilos e leucócitos em todos os grupos quando comparados ao valor de referência, enquanto E5m mostrou o menor valor de plaquetas entre todos os grupos. Além disso, valores médios de hemoglobina, hematócrito, leucócitos e MCHC se mantiveram próximo da normalidade (Schnell *et al.*, 2002) entre os grupos estudados, com exceção da média superior observada em MCV. Esses dados mostram a provável influência das células tumorais C3 nessas análises e não necessariamente o uso das vacinas de DNA ou eletroporação.

O nível do estresse oxidativo induzido também foi investigado. Embora todos os grupos tenham respondido ao estímulo *in vitro*, os resultados mostraram maior promoção do estresse no grupo C3, com produção significativa para espécies reativas de oxigênio (ROS) citosólicas e mitocondriais (**Figura 12A e B**). Resultados semelhantes foram observados em Liu et al. (2018) nos quais

linhagens de células HPV16/18 positivo induziram translocação da proteína nuclear lactato desidrogenase (LDHA) de forma dependente ao acúmulo de ROS, e possivelmente re-direcionando e facilitando a proliferação celular tumoral por glicólise através do efeito Warburg (Zhu *et al.*, 2018). A elevada taxa de liberação de Ca^{2+} intracelular em animais do grupo C3 (**Figura 12D**) está de acordo com estudos prévios (Rinnerthaler *et al.*, 2014; Ramírez *et al.*, 2018) e propõem que as oncoproteínas presentes nas células infectadas por HPV provocam um desbalanço do Ca^{2+} intracelular dependente do ATP, levando a proliferação das células tumorais.

Possivelmente, o conjunto de oncogenes expressos nas células C3 possa ter influenciado no tráfego celular culminando na liberação de Ca^{2+} , principalmente, E5, uma vez que a mesma se encontra ligada estrategicamente às membranas de organelas citoplasmáticas (Ashrafi *et al.*, 2006; Freitas *et al.*, 2017). Interessantemente, animais imunizados com E5m não apresentaram níveis significativos de ROS, mas alta liberação do Ca^{2+} cito (**Figura 12D**). Em nossos resultados, a elevada detecção de Ca^{2+} cito em E5m pode ser resultado da secreção de quimiocinas e co-estimuladores com ativação positiva dos linfócitos T citotóxico T CD8^+ , CD16^+ e CD4^+ , contribuindo para regressão tumoral (Feske *et al.*, 2007).

O experimento *in vitro* com células esplênicas mimetizou um segundo encontro desses animais frente ao re-estímulo peptídico de E5 de HPV16. Nesse ensaio, demonstramos que as vacinas E5m e E5CP ativaram linfócitos T CD4^+ , CD8^+ (dado ausente para 48 horas em E5CP) e CD16^+ (**Figura 13A-C**). Certamente, esse conjunto celular foi o responsável pela vigilância imune e

promoção dos efeitos antitumorais HPV-específicos observados nesses grupos, e aponta eficiência na ligação, entrega e reconhecimento dos antígenos vacinais E5-HPV16 necessários para o estímulo de resposta imunológica (Liu *et al.*, 2000; Cordeiro, *et al.*, 2015; Van den Bergh *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2015).

Em particular, nosso candidato vacinal pVAXE5m permitiu a ativação de linfócitos T CD8⁺ de forma gradativa e significativa em 48 horas (**Figura 13B**), sugerindo relação do efeito antitumoral a expressão dos linfócitos T CD8⁺ após terem sido primados por antígenos E5-HPV16. Os dados também confirmaram que epítomos imunogênicos do E5 do HPV podem burlar o bloqueio das vias do MHC I e também induzir resposta de linfócitos T CD8⁺ e células T de memória específicas contra o HPV. Bem como, ativar linfócitos T CD4⁺ e T CD16⁺ como visto nos grupos E5m e E5CP (Liu *et al.*, 2007; Liao *et al.*, 2013; Paolini *et al.*, 2017).

Assim como visto no sangue circulante, as taxas da expressão dos linfócitos T CD4⁺ *in vitro* foram mais elevadas para o grupo E5CP, e estáveis para T CD8⁺ nos grupos E5m e E5CP, com dosagens parecidas em resposta ao estímulo por peptídeo E5 do HPV16, também observado em Paolini *et al.* (2017). Esses dados são importantes, visto que linfócitos T CD4⁺ são mais efetivos diante do estímulo primário imunogênico que propicie interações estáveis entre o receptor de linfócitos T (TCR) e a molécula co-estimulatória CD28, resultando na maior taxa de expansão clonal e origem de células T de memória re-estimuladas (Wells *et al.*, 2000). Grande parte dos estudos sobre vacinas terapêuticas têm como alvo principal as oncoproteínas E6 e E7. Esses antígenos específicos do

HPV revelam eficiência na ativação da resposta imune de células estimuladas pelo perfil Th1 de citocinas (de Oliveira et al., 2015; Yang et al., 2017).

O primeiro estudo clínico de fase II com vacinas terapêuticas é baseado em antígenos E6 e E7, e obteve eficácia significativa sobre os placebos, com resposta significativa também para células T CD8⁺ e produção de citocinas Th1 em pacientes com neoplasias NIC II/III (Trimble et al., 2015).

A maior parte dos trabalhos sobre E5 identifica os linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺ na resolução tumoral, como nas estratégias baseadas em adenovírus recombinante expressando E5 de HPV16 (Liu et al., 2000), vacinas de DNA (Cordeiro et al., 2015; Paolini et al., 2017), vacina de peptídeos (Liao et al., 2013) e vacina de DNA com oncoproteínas do HPV16 fusionadas (E5/E6/E7) (Diniz & Ferreira, 2011). Estratégias vacinais baseadas em E5 ainda são raras, e juntos esses dados ratificam o potencial imunogênico do alvo E5 como gerador de resposta celular.

Embora a marcação de citocinas intracelulares não tenha sido realizada, é provável que o mesmo conjunto de linfócitos T provenientes dos esplenócitos de animais do grupo E5m tenha modulado a produção significativa das citocinas IL-2 e TNF- α (**Figura 14A e B**), com sucesso na dosagem das citocinas do perfil Th1, Th2 e Th17. Ativação Th1 é importante, uma vez que estudos apontam o perfil Th1 de citocinas na promoção da chamada resposta imune mediada por células, moduladora do controle da infecção viral e resposta citotóxica contra o tumor (Bagarazzi et al., 2012). Além disso, o balanço entre essas citocinas parece estágio-associado com a gravidade das lesões e determina os caminhos da resposta imune celular no hospedeiro (Lin et al., 2020).

Em um contexto geral, nossos resultados para os grupos NaCl e C3 mostraram ativação do perfil Th1 superior a encontrada por Grønevik et al. (2005), a partir da combinação entre EP e inoculação de DNA, ou EP e inoculação de solução soro salina. Porém, a ativação ocorreu em doses inferiores às do grupo E5m e E5CP. Provavelmente, a presença dos tumores e a eletroporação pode estar ligada ao painel de ativação linfocitária assim como a modulação de citocinas nos grupos NaCl e C3. Nossa vacina pVAXE5m induziu citocinas pró-inflamatórias do perfil Th1 em níveis maiores aos demais grupos, e significativamente superior a vacina pVAXE5CP em 48 horas (**Figura 14B**), muito provavelmente, estas citocinas tiveram implicação no desfecho da remissão tumoral.

Em outro dado importante, as taxas de linfócitos T CD16⁺ do tipo NK foram detectadas no sangue e *in vitro* em níveis estáveis após estímulo antígeno-específico de E5 do HPV16, e confirma a correta entrega dos peptídeos via células especializadas em apoptose de células tumorais (Bachanova & Miller, 2014; Barbarin et al., 2017; Abel, 2018). Além disso, a detecção de alta concentração de TNF- α (**Figura 14B**) diante do estímulo do esplenócito pode estar relacionado aos níveis significativos de linfócitos T CD16⁺ no grupo E5m (**Figura 13C**) (Renoux et al., 2011).

A secreção *in vitro* das interleucinas IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17, perfis Th2 e Th17, respectivamente, mostraram aumento significativo nos grupos E5m e E5CP. Esses dados diferem do observado no plasma de pacientes com lesões cervicais de baixo grau (CIN I), onde a secreção das mesmas citocinas apresentou níveis inferiores e parecidos entre si (Pita-Lopez et al., 2014). Na

maior parte dos estudos sobre a dosagem de citocinas em pacientes portadores de tumores, fica evidente que o desbalanço entre os perfis Th1, Th2 e Th17 é prejudicial ao desfecho clínico (Romagnani, 1999; Xu *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2020). Ademais, vacinas imuterpêuticas necessitam sinalizar, via receptores T, a ativação das citocinas pró-inflamatórias do perfil Th1 como forma de indução da resposta celular de caráter citotóxico (Aoshi *et al.*, 2011; Otter *et al.*, 2019).

Para nosso conhecimento, o presente trabalho foi o primeiro a analisar desde parâmetros hematológicos e bioquímicos, estresse oxidativo celular, até o panorama imunológico da secreção de importantes mediadores químicos como as citocinas. Todos esses dados avaliaram a candidata vacinal pVAXE5m baseada em epítomos imunogênicos específicos contra o câncer cervical induzido por HPV16. Neste trabalho, mostramos que animais tratados com a vacina pVAXE5m apresentaram os menores tumores frente aos demais grupos investigados.

A ativação de linfócitos T citotóxicos CD8⁺, CD16⁺ e CD8⁺ foi detectado conjuntamente à secreção do perfil de citocinas Th1, em equilíbrio com o perfil Th2 e Th17, e baixos índices de estresse oxidativo e danos toxicológicos. Esses dados contribuem para o melhor entendimento e caracterização da resposta a antígenos específicos do câncer cervical, e colabora para o aprimoramento das estratégias vacinais contra tumores induzidos por HPV16. Porém, mais estudos na área, abrangendo a resposta imunológica necessitam ser realizado tendo como antígeno alvo a oncoproteínas E5.

7 CONCLUSÕES

O desenvolvimento de uma estratégia imunológica para uso associado a outras abordagens de tratamento ou não, é de extrema importância e muito aguardada. Os resultados aqui apresentados contribuem com informação, e demonstram que o uso de vacinas de DNA baseada em epítomos da oncoproteína E5 é capaz de elicitar a resposta de linfócitos T citotóxicos.

Essa mesma construção também se mostrou eficiente em secretar citocinas do perfil Th1, essencial para ativação, maturação, expansão clonal e formação de linfócitos de memória contra tumores HPV16 positivos. A proposta de vacina de DNA pVAXE5m, testada frente animais desafiados com células tumorais C3 mimetizadoras do câncer humano induzido por HPV16 obteve resultados favoráveis quando comparados ao da oncoproteína selvagem E5 do HPV 16.

No entanto, esses são resultados prévios em modelo pré-clínico, e mais estudos são necessários para avaliação do perfil imunológico. Por exemplo, a avaliação da ativação ou supressão da via inflamatória via NF-kB, de modo a corroborar e ampliar o entendimento sobre os resultados aqui apresentados. Ademais, a vacina pVAXE5m poderá ser estudada em novas formas de abordagens, visando melhorias na entrega e manutenção dos efeitos favoráveis observados nas vacinas terapêuticas como imunoterapia para o câncer cervical.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abel AM, Yang C, Thakar MS and Malarkannan S (2018) Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. *Front Immunol* 9:1869.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science; 2002.
- Ashrafi GH, Haghshenas MR, Marchetti B, O'Brien PM and Campo MS (2005) E5 protein of human papillomavirus type 16 selectively downregulates surface HLA class I. *Int J Cancer* 113(2):276-83.
- Ashrafi GH, Brown DR, Fife KH and Campo MS (2006) Down-regulation of MHC class I is a property common to Papillomavirus E5 proteins. *Virus Res* 120(1-2):208-211.
- ANVISA, AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. (2015). Nota Técnica n.º 125/2015 SUMED/SUCOM/ANVISA.
- Aoshi T, Koyama S, Kobiyama K, Akira S and Ishii KJ (2011) Innate and adaptive immune responses to viral infection and vaccination. *Curr Opin Virol* 1(4):226-32.
- Azar KK, Tani M, Yasuda H, Sakai A, Inoue M and Sasagawa T (2004) Increased secretion patterns of interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha in cervical squamous intraepithelial lesions. *Hum Pathol* 35(11):1376-84
- Bachanova V and Miller JS (2014) NK cells in therapy of cancer. *Crit Rev Oncog* 19(1-2):133-141.
- Bagarazzi ML, Yan J, Morrow MP, Shen X, Parker RL, Lee JC, Giffear M, Pankhong P, Khan AS, Broderick KE, Knott C, Lin F, Boyer JD, Draghia-Akli R, White CJ, Kim JJ, Weiner DB and Sardesai NY (2012) Immunotherapy Against HPV16/18 Generates Potent TH1 and Cytotoxic Cellular Immune Responses. *Sci Transl Med* 4(155):155ra138.
- Bais AG, Beckmann I, Lindemans J, Ewing PC, Meijer CJ, Snijders PJ and Helmerhorst TJ (2005) A shift to a peripheral Th2-type cytokine pattern during the carcinogenesis of cervical cancer becomes manifest in CIN III lesions. *J Clin Pathol* 58(10):1096-100.
- Balkwill F (2009) Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer* 9(5):361-71.

- Barbarin A, Cayssials E, Jacomet F, Nunez NG, Basbous S, Lefèvre L, Abdallah M, Piccirilli N, Morin B, Lavoue V, Catros V, Piaggio E, Herbelin A and Gombert JM (2017) Phenotype of NK-Like CD8(+) T Cells with Innate Features in Humans and Their Relevance in Cancer Diseases. *Front Immunol* 27;8:316.
- Barrios M, Rodríguez-Acosta A, Gil A, Salazar AM, Taylor P, Sánchez EE, Arocha-Piñango CL and Guerrero B (2009) Comparative hemostatic parameters in BALB/c, C57BL/6 and C3H/He mice. *Thromb Res* 124(3):338-343.
- Barros MR Jr, Melo CML, Barros MLCMGR, Lima RCP, Freitas AC and Venuti A (2018) Activities of stromal and immune cells in HPV-related cancers. *J Exp Clin Cancer Res* 37(1):137.
- Bedoya AM, Tate DJ, Baena A, Córdoba CM, Borrero M, Pareja R, Rojas F, Patterson JR, Herrero R, Zea AH and Sanchez GI (2014) Immunosuppression in cervical cancer with special reference to arginase activity. *Gynecol Oncol* 135(1):74-80.
- Behbahani H, Walther-Jallow L, Klareskog E, Baum L, French AL, Patterson BK, Garcia P, Spetz AL, Landay A and Andersson J (2007) Proinflammatory and type 1 cytokine expression in cervical mucosa during HIV-1 and human papillomavirus infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 45(1):9-19.
- Bergmann CC, Yao Q, Ho CK and Buckwold SL (1996) Flanking residues alter antigenicity and immunogenicity of multi-unit CTL epitopes. *J Immunol* 157:3242-3249.
- Bodily J and Laimins LA (2011) Persistence of human papillomavirus infection: keys to malignant progression. *Trends Microbiol* 19(1):33-9.
- Bonin-Jacob CM, Almeida-Lugo LZ, Puga MAM, Machado AP, Padovani CTJ, Noceti MC, Ferreira AMT, Fernandes CEDS, Resende JCP, Bovo AC and Tozetti IA (2021) IL-6 and IL-10 in the serum and exfoliated cervical cells of patients infected with high-risk human papillomavirus. *PLoS One* 16(3):e0248639.

- Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJLM and Shah KV (2002) The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 55:244–265.
- Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W and zur Hausen H (1984) A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *The EMBO Journal* 3(5):1151-1157.
- Boulet G, Horvath C, Broeck DV, Sahebali S and Bogers J (2007) Human papillomavirus: E6 and E7 oncogenes. *Int J Bioch Cell Bio* 39:2006–11.
- Boxus M, Fochesato M, Miseur A, Mertens E, Dendouga N, Brendle S, Balogh KK, Christensen ND and Giannini SL (2016) Broad Cross-Protection Is Induced in Preclinical Models by a Human Papillomavirus Vaccine Composed of L1/L2 Chimeric Virus-Like Particles. *J Virol* 90(14):6314-25.
- Bravo IG, de Sanjosé S and Gottschling M (2010) The clinical importance of understanding the evolution of papillomaviruses. *Trends Microbiol* 18(10):432-8.
- Brigati C, Noonan DM, Albini A and Benelli R (2002) Tumors and inflammatory infiltrates: friends or foes? *Clin Exp Metastasis* 19(3):247-58.
- Briggs MW, Adam JL and McCance DJ (2001) The human papillomavirus type 16 E5 protein alters vacuolar H(+)-ATPase function and stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Virology* 280(2):169-75.
- Canfell K (2019) Towards the global elimination of cervical cancer. *Papillomavirus Res* 8:100170.
- Campo MS, Graham SV, Cortese MS, Ashrafi GH, Araibi EH, Dornan ES, Miners K, Nunes C and Man S (2010) HPV-16 E5 down-regulates expression of surface HLA class I and reduces recognition by CD8 T cells. *Virology* 407(1):137-42.
- Castellsagué X (2008) Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecol Oncol* 110:S4–S7.
- Cerqueira C and Schiller JT (2017) Papillomavirus assembly: An overview and perspectives. *Virus Res* 231:103-107.

- Chang SH (2019) T helper 17 (Th17) cells and interleukin-17 (IL-17) in cancer. *Arch Pharm Res* 42:549-559.
- Chen Z, Schiffman M, Herrero R, DeSalle R, Anastos K, Segondy M, Sahasrabuddhe VV, Gravitt PE, Hsing AW, Chan PKS and Burk RD (2018) Classification and evolution of human papillomavirus genome variants: Alpha-5 (HPV26, 51, 69, 82), Alpha-6 (HPV30, 53, 56, 66), Alpha-11 (HPV34, 73), Alpha-13 (HPV54) and Alpha-3 (HPV61). *Virology* 516:86-101.
- Chen R, Gong Y, Zou D, Wang L, Yuan L and Zhou Q (2019) Correlation Between Subsets of Tumor-Infiltrating Immune Cells and Risk Stratification in Patients With Cervical Cancer. *PeerJ* 7:e7804.
- Chene G, Lamblin G, Bail-Carval KL, Beaufils E, Chabert P, Gaucherand P, Mellier G and Coppenset Y (2016) Le(s) cancer(s) de Lucy: une origine préhistorique? *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*.
- Cheng MA, Farmer E, Huang C, Lin J, Hung C-H and Wu T-C (2018) Therapeutic DNA Vaccines for Human Papillomavirus and Associated Diseases. *Hum Gene Ther* 29(9):971-996.
- Chojnacki M and Melendy T (2018) The HPV E2 Transcriptional Transactivation Protein Stimulates Cellular DNA Polymerase Epsilon. *Viruses* 10(6):321.
- Cordeiro MN, Paolini F, Massa S, Curzio G, Illiano E, Silva AJD, Franconi R, Bissa M, De Giuli Morghen C, De Freitas AC and Venuti A (2015) Anti-tumor effects of genetic vaccines against HPV major oncogenes. *Hum Vaccin Immunother* 11:45-52.
- 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* 18:365–76.
- Crosbie EJ, Einstein MH, Franceschi S and Kitchener HC (2013) Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 382(9895):889-99.
- Da Costa FAM, Gaester KEO, Duarte AJS and Casseb J (2019) The Th1-th2 profile in immune responses to Human papillomavirus (HPV) in vitro in men from the city of São Paulo, Brazil. *Braz J Sexually Transmitted Dis* 31(1):7-13.

- da Cruz Filho IJ, da Silva Barros BR, de Souza Aguiar LM, Navarro CDC, Ruas JS, de Lorena VMB, Rocha GJM, Vercesi AE, de Melo CML and Maior AMS (2019) Lignins isolated from Prickly pear cladodes of the species *Opuntia ficus-indica* (Linnaeus) Miller and *Opuntia cochenillifera* (Linnaeus) Miller induces mice splenocytes activation, proliferation and cytokines production. *Int J Biol Macromol* 123:1331-1339.
- Das CR, Tiwari D, Dongre A, Khan MA, Husain SA, Sarma A, Bose S and Bose PD (2018) Deregulated TNF-Alpha Levels Along with HPV Genotype 16 Infection Are Associated with Pathogenesis of Cervical Neoplasia in Northeast Indian Patients. *Viral Immunol* 31(4):282-291.
- De Gruijl TD, Bontkes HJ, Walboomers JM, Stukart MJ, Doekhie FS, Remmink AJ, Helmerhorst TJ, Verheijen RH, Duggan-Keen MF, Stern PL, Meijer CJ and Scheper RJ (1998) Differential T helper cell responses to human papillomavirus type 16 E7 related to viral clearance or persistence in patients with cervical neoplasia: a longitudinal study. *Cancer Res* 58(8):1700-1706.
- de Oliveira LM, Morale MG, Chaves AA, Cavalher AM, Lopes AS, Diniz Mde O, Schanoski AS, de Melo RL, Ferreira LC, de Oliveira ML, Demasi M and Ho PL (2015) Design, Immune Responses and Anti-Tumor Potential of an HPV16 E6E7 Multi-Epitope Vaccine. *PLoS One* 10(9):e0138686.
- Derbie A, Mekonnen D, Woldeamanuel Y, Van Ostade X and Abebe T (2020) HPV E6/E7 mRNA test for the detection of high grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN2+): a systematic review. *Infect Agent Cancer* 15:9.
- Deshpande A, Nolan JP, White PS, Valdez YE, Hunt WC, Peyton CL and Wheeler CM (2005) TNF-alpha promoter polymorphisms and susceptibility to human papillomavirus 16-associated cervical cancer. *J Infect Dis* 191(6):969-76.
- DiMaio D and Mattoon D (2001) Mechanisms of cell transformation by papillomavirus E5 proteins. *Oncogene* 20:7866-73.
- DiMaio D and Petti LM (2013) The E5 proteins. *Virology* 445(1-2):99-114.
- Diniz MO and Ferreira LCS (2011) Enhanced anti-tumor effect of a gene gun-delivered DNA vaccine encoding the human papillomavirus type 16 oncoproteins genetically fused to the herpes simplex virus glycoprotein D. *Braz J Med Biol Res* 44(5):421-427.

- Disbrow GL, Hanover JA and Schlegel R (2005) Endoplasmic reticulum-localized human papillomavirus type 16 E5 protein alters endosomal pH but not trans-Golgi pH. *J Virol* 79(9):5839-46.
- Dolenc I, Seemüller E and Baumeister W (1998) Decelerated degradation of short peptides by the 20S proteasome. *FEBS Lett* 434:357-61.
- Doorbar J (2016) Model systems of human papillomavirus-associated disease. *J Pathol* 238(2):166-79.
- Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C and Murakami I (2016) Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Rev Med Virol* 25:2-23.
- Dunham, SP (2002) The application of nucleic acid vaccines in veterinary medicine. *Res Vet Sci* 73(1):9-16.
- Durst M, Gissmann L, Ikenberg Hans and Zur Hausen H (1983) A papillomavirus, DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:3812-3815.
- 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(2):153-162.
- Ewald PW (2018) Ancient cancers and infection-induced oncogenesis. *Int J Paleopathol* 21:178-185.
- Fan Y and Shen Z (2018) The clinical value of HPV E6/E7 and STAT3 mRNA detection in cervical cancer screening. *Pathol Res Pract* 214(5):767-775.
- Feske S (2007) Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nat Rev Immunol* 7(9):690-702.
- Freitas AC, Gurgel APAD, Chagas BS, Coimbra EC and Amaral CMM (2012) Susceptibility to cervical cancer: an overview. *Gynecol Oncol* 126(2):304-11.
- Freitas AC, Oliveira THA, Barros-Jr MR and Venuti A (2017) hrHPV E5 Oncoprotein: Immune Evasion and Related Immunotherapies. *J Exp Clin Cancer Res* 36(1):71.
- Gerritsen B and Pandit A (2016) The memory of a killer T cell: models of CD8(+) T cell differentiation. *Immunol Cell Biol* 94(3):236-41.

- Giarrè M, Caldeira S, Malanchi I, Ciccolini F, Leão MJ and Tommasino M (2001) Induction of pRb degradation by the human papillomavirus type 16 E7 protein is essential to efficiently overcome p16INK4a-imposed G1 cell cycle Arrest. *J Virol* 75(10):4705-12.
- Graham SV (2017) The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review. *Clin Sci (Lond)* 131(17):2201-2221.
- Grønevik E, Mathiesen I and Lømo T (2005) Early events of electroporation-mediated intramuscular DNA vaccination potentiate Th1-directed immune responses. *J Gene Med* 7(9):1246-1254.
- Guevara AM, Suarez E, Victoria A, Ngan HYS, Hirschberg AL, Fedrizzi E, Bautista O, Shields C, Joshi A and Luxembourg A (2019) Maternal transfer of anti HPV 6 and 11 antibodies upon immunization with the 9-valent HPV vaccine. *Hum Vaccin Immunother* 15(1):141-145.
- Hemmat N and Baghi HB (2019) Association of human papillomavirus infection and inflammation in cervical cancer. *Pathog Dis* 77(5):ftz048.
- Hildesheim A, Herrero R, Wacholder S, Rodriguez AC, Solomon D, Bratti MC, Schiller JT, Gonzalez P, Dubin G, Porras C, Jimenez SE, Lowy DR and Costa Rican HPV Vaccine Trial Group (2007) Effect of human papillomavirus 16/18 L1 viruslike particle vaccine among young women with preexisting infection: a randomized trial. *JAMA* 298(7):743-53.
- Hong S, Mehta KP and Laimins LA (2011) Suppression of STAT-1 expression by human papillomaviruses is necessary for differentiation-dependent genome amplification and plasmid maintenance. *J Virol* 85(18):9486-94.
- Hoppe-Seyler K, Bossler F, Braun JA, Herrmann AL and Hoppe-Seyler F (2018) The HPV E6/E7 Oncogenes: Key Factors for Viral Carcinogenesis and Therapeutic Targets. *Trends Microbiol* 26(2):158-168.
- Horvath CA, Boulet GA, Renoux VM, Delvenne PO and Bogers JP (2010) Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. *Virol J* 7:11.
- Hung HY, Chen JS, Chien-YuhYeh, Tang R, Hsieh PS, Wen-SyTasi, You YT, You JF and Chiang JM (2017) Preoperative alkaline phosphatase elevation was

- associated with poor survival in colorectal cancer patients. *Int J Colorectal Dis* 32:1775-8.
- INCA (2020) Estimativa Incidência de Câncer no Brasil - Biênio 2020-2022. Ministério da Saúde, Inst Nac do Câncer, Bras. ISBN 978-85-7318-389-4.
- Institut Català d'Oncologia, ICO (17 de junho de 2019). Human Papillomavirus and Related Diseases Report. <https://www.hpvcentre.net/statistics/reports/XWX.pdf>
- Jenkins D (2020) A Brief History of Cervical Cancer. In: Jenkins D and Bosch FX (eds) Human Papillomavirus - Proving and Using a Viral Cause for Cancer. 1st edition. Academic Press, pp 1-12.
- Jin BY, Campbell TE, Draper LM, Stevanović S, Weissbrich B, Yu Z, Restifo NP, Rosenberg SA, Trimble CL and Hinrichs CS (2018) Engineered T cells targeting E7 mediate regression of human papillomavirus cancers in a murine model. *JCI Insight* 3(8):e99488.
- Joura EA, Giuliano AR, Iversen O.-E, Bouchard C, Mao C, Mehlsen J, Moreira ED Jr, Ngan Y, Petersen LK, Lazcano-Ponce E, Pitisuttithum P, Restrepo JA, Stuart G, Woelber L, Yang YC, Cuzick J, Garland SM, Huh W, Kjaer SK, Bautista OM, Chan, ISF, Chen, J, Gesser R, Moeller E, Ritter M, Vuocolo S and Luxembourg A (2015) 9-Valent HPV Vaccine against Infection and Intraepithelial Neoplasia in Women. *N Engl J Med* 372:711-23.
- Kanodia S, Da Silva DM and Kast WM (2008) Recent Advances in Strategies for Immunotherapy of Human Papillomavirus-Induced Lesions. *Int J Cancer* 122:247-259.
- Kasakura S (1998) A role for T-helper type 1 and type 2 cytokines in the pathogenesis of various human diseases. *Rinsho Byori* 46(9):915-21.
- Kidd P (2003) Th1/Th2 Balance: The Hypothesis, its Limitations, and Implications for Health and Disease. *Altern Med Rev* 8(3):223-246.
- Kim MK, Kim HS, Kim SH, Oh JM, Han JY, Lim JM, Juhnn YS and Song YS (2010) Human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein as a new target for cervical cancer treatment. *Biochem Pharmacol* 80(12):1930-5.
- Kleine-Lowinski K, Gillitzer R, Kühne-Heid R and Rösl F (1999) Monocyte-chemo-attractant-protein-1 (MCP-1)-gene expression in cervical intra-epithelial

- neoplasias and cervical carcinomas. *Int J Cancer* 82(1):6-11.
- Kumar A, Yadav IS, Hussain S, Das BC and Bharadwaj M (2015) Identification of Immunotherapeutic Epitope of E5 Protein of Human papillomavirus-16: An in Silico Approach. *Biologicals* 43:344-8.
- Kumari N, Dwarakanath BS, Das A and Bhatt AN (2016) Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance. *Tumour Biol* 37(9):11553-11572.
- 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.
- Lathers DMR and Young MRI (2004) Increased aberrance of cytokine expression in plasma of patients with more advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cytokine* 25:220-228.
- Lee I, Skinner MA, Guo HB, Sujana A and Pierce M (2004) Expression of the vacuolar H⁺-ATPase 16-kDa subunit results in the Triton X-100-insoluble aggregation of beta1 integrin and reduction of its cell surface expression. *J Biol Chem* 279(51):53007-14.
- Lejeune FJ, Li  nard D, Matter M and R  egg C (2006) Efficiency of recombinant human TNF in human cancer therapy. *Cancer Immun* 6:6.
- Li N, Franceschi S, Howell-Jones R, Snijders PJF and Clifford GM (2011) Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: variation by geographical region, histological type and year of publication. *Int J Cancer* 128(4):927-35.
- Li S, Hong X, Wei Z, Xie M, Li W, Liu G, Guo H, Yang J, Wei W and Zhang S (2019) Ubiquitination of the HPV Oncoprotein E6 Is Critical for E6/E6AP-Mediated p53 Degradation. *Front Microbiol* 10:2483.
- Liao S-J, Deng D-R, Zeng D, Zhang L, Hu X-J, Zhang W-N, Li L, Jiang X-F, Wang C-Y, Zhou J-F, Wang S-X, Zhang H-W and Ma D (2013) HPV16 E5 Peptide Vaccine in Treatment of Cervical Cancer In Vitro and In Vivo. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci* 33(5):735-42.

- Lin W, Niu Z, Zhang H, Kong Y, Wang Z, Yang X and Yuan F (2019) Imbalance of Th1/Th2 and Th17/Treg during the development of uterine cervical cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 12(9):3604-3612.
- Lin W, Zhang HL, Niu ZY, Wang Z, Kong Y, Yang XS and Yuan F (2020) The disease stage-associated imbalance of Th1/Th2 and Th17/Treg in uterine cervical cancer patients and their recovery with the reduction of tumor burden. *BMC Womens Health* 20(1):126.
- Litwin TR, Clarke MA, Dean M and Wentzensen N (2017) Somatic Host Cell Alterations in HPV Carcinogenesis. *Viruses* 9(8):206.
- Litwin TR, Irvin SR, Chornock RL, Sahasrabudhe VV, Stanley M and Wentzensen N (2021) Infiltrating T-cell markers in cervical carcinogenesis: a systematic review and meta-analysis. *Br J Cancer* 124(4):831-841.
- Liu DW, Tsao YP, Kung JT, Ding YA, Sytwu HK, Xiao X and Chen SL (2000) Recombinant Adeno-Associated Virus Expressing Human Papillomavirus Type 16 E7 Peptide DNA Fused with Heat Shock Protein DNA as a Potential Vaccine for Cervical Cancer. *J Virol* 74(6):2888-2894.
- Liu DW, Yang YC, Lin HF, Lin MF, Cheng YW, Chu CC, Tsao YP and Chen SL (2007) Cytotoxic T-Lymphocyte Responses to Human Papillomavirus Type 16 E5 and E7 Proteins and HLA-A*0201-Restricted T-Cell Peptides in Cervical Cancer Patients. *J Virol* 81(6):2869-2879.
- Liu X, Jin H, Zhang G, Lin X, Chen C, Sun J, Zhang Y, Zhang Q and Yu J (2014) Intratumor IL-17-positive mast cells are the major source of the IL-17 that is predictive of survival in gastric cancer patients. *PLoS One* 9(9):e106834.
- Liu Y, Guo J-Z, Liu Y, Wang K, Ding W, Wang H, Liu X, Zhou S, Lu X-C, Yang H-B, Xu C, Gao W, Zhou L, Wang Y-P, Hu W, Wei Y, Huang C and Lei Q-Y (2018) Nuclear lactate dehydrogenase A senses ROS to produce α -hydroxybutyrate for HPV-induced cervical tumor growth. *Nat Commun* 9(1):4429.
- Lo Cigno I, Calati F, Albertini S and Gariglio M (2020) Subversion of Host Innate Immunity by Human Papillomavirus Oncoproteins. *Pathogens* 9(4):292.

- Maguire PJ, Sobota A, Mulholland D, Ryan JM and Gleeson N (2020) Incidence, management, and sequelae of ureteric obstruction in women with cervical cancer. *Support Care Cancer* 28:725-730.
- Maimela NR, Liu S and Zhang Y (2019) Fates of CD8⁺ T cells in Tumor Microenvironment. *Comput Struct Biotechnol J* 17:1-13.
- Mariani L and Venuti A (2010) HPV vaccine: an overview of immune response, clinical protection, and new approaches for the future. *J Transl Med* 8:105.
- Maskey N, Thapa N, Maharjan M, Shrestha G, Maharjan N, Cai H and Liu S (2019) Infiltrating CD4 and CD8 lymphocytes in HPV infected uterine cervical milieu. *Cancer Manag Res* 11:7647-7655.
- McBride AA (2017) Mechanisms and strategies of papillomavirus replication. *Biol Chem* 398(8):919-927.
- Mistry N, Wibom C and Evander M (2008) Cutaneous and mucosal human papillomaviruses differ in net surface charge, potential impact on tropism. *Viol J* 5:118.
- Mitchell PD, Dittmar JM, Mulder B, Inskip S, Littlewood A, Cessford C and Robb JE (2021) The prevalence of cancer in Britain before industrialization. *Cancer*. doi: 10.1002/cncr.33615.
- Monie A. (2009). Therapeutic HPV DNA vaccines. *Expert Rev Vaccines*. Author manuscript; available in PMC. doi:10.1586/erv.09.76.
- Montfort A, Colacios C, Levade T, Andrieu-Abadie N, Meyer N and Ségui B (2019) The TNF Paradox in Cancer Progression and Immunotherapy. *Front Immunol* 10:1818.
- Moody C (2017) Mechanisms by which HPV Induces a Replication Competent Environment in Differentiating Keratinocytes. *Viruses* 9(9):261.
- Müller M, Prescott EL, Wasson CW and Macdonald A (2015) Human papillomavirus E5 oncoprotein: function and potential target for antiviral therapeutics. *Future Virol* 10(1):27-39.
- Munk-Madsen MZ, Toft L, Kube T, Richter R, Ostergaard L, Søgaaard OS, Tolstrup M and Kaufmann AM (2018) Cellular Immunogenicity of Human Papillomavirus Vaccines Cervarix and Gardasil in Adults with HIV Infection. *Hum Vaccin Immunother* 14(4):909-16.

- Namvar A, Panahi HA, Agi E and Bolhassani A (2020) Development of HPV16,18,31,45 E5 and E7 peptides-based vaccines predicted by immunoinformatics tools. *Biotechnol Lett* 42(3):403-418.
- Nees M, Geoghegan JM, Hyman T, Frank S, Miller L and Woodworth CD (2001) Papillomavirus type 16 oncogenes downregulate expression of interferon-responsive genes and upregulate proliferation-associated and NF-kappaB-responsive genes in cervical keratinocytes. *J Virol* 75(9):4283-96.
- 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.
- Nieto-Torres JL, Verdiá-Báguena C, Castaño-Rodríguez C, Aguilera VM and Enjuanes L (2015) Relevance of Viroporin Ion Channel Activity on Viral Replication and Pathogenesis. *Viruses* 7(7):3552-73.
- Nunn JF and Tapp E (2000) Tropical diseases in ancient Egypt. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94(2):147-53.
- Oh KJ, Kalinina A and Bagchi S (2010a) Destabilization of Rb by human papillomavirus E7 is cell cycle dependent: E2-25K is involved in the proteolysis. *Virology* 396(1):118-24.
- Oh JM, Kim SH, Cho EA, Song YS, Kim WH and Juhnn YS (2010b) Human papillomavirus type 16 E5 protein inhibits hydrogen-peroxide-induced apoptosis by stimulating ubiquitin-proteasome-mediated degradation of Bax in human cervical cancer cells. *Carcinogenesis* 31(3):402-10.
- Ohno A, Iwata T, Katoh Y, Taniguchi S, Tanaka K, Nishio H, Nakamura M, Morisada T, Chen G, Saito M, Yaguchi T, Kawakami Y and Aoki D (2020) Tumor-infiltrating lymphocytes predict survival outcomes in patients with cervical cancer treated with concurrent chemoradiotherapy. *Gynecol Oncol* 159(2):329-334.
- Otter SJ, Chatterjee J, Stewart AJ and Michael A (2019) The Role of Biomarkers for the Prediction of Response to Checkpoint Immunotherapy and the Rationale for the Use of Checkpoint Immunotherapy in Cervical Cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 31(12):834-843.

- Pan American Health Organization, PAHO. (2018). Plan of Action for Cervical Cancer Prevention and Control 2018-2030. https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/38574/PAHONMH18051_spa.pdf?sequence=2&isAllowed=y
- 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 Vaccin Immunother* 13(2):291-297.
- Patel S and Chiplunkar S (2009) Host Immune Responses to Cervical Cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol* 21:54-59.
- Pita-Lopez ML, Ortiz-Lazareno PC, Navarro-Meza M, Santoyo-Telles F and Peralta-Zaragoza O (2014) CD28-, CD45RAnull/dim and Natural Killer-like CD8+ T cells are increased in peripheral blood of women with low-grade cervical lesions. *Cancer Cell Int* 14:97.
- Puri RK and Siegel JP (1993) Interleukin-4 and Cancer Therapy. *Cancer Invest* 11(4):473-486.
- Ramírez A, Vera E, Gamboa-Dominguez A, Lambert P, Gariglio P and Camacho J (2018) Calcium-activated potassium channels as potential early markers of human cervical cancer. *Oncol Lett* 15:7249-54.
- Randolph-Quinney PS, Williams SA, Steyn M, Meyer MR, Smilg JS, Churchill SE, Odes EJ, Augustine T, Tafforeau P and Berge LR (2016) Osteogenic tumour in *Australopithecus sediba*: Earliest hominin evidence for neoplastic disease. *S Afr J Sci*. 112:1-7.
- Rangel-Corona R, Corona-Ortega T, Soto-Cruz I, López-Labra A, Pablo-Arcos T, Torres-Guarneros CF and Weiss-Steider B (2010) Evidence That Cervical Cancer Cells Secrete IL-2, Which Becomes an Autocrine Growth Factor. *Cytokine* 50(3):273-277.
- Reinholz M, Kawakami Y, Salzer S, Kreuter A, Dombrowski Y, Koglin S, Kresse S, Ruzicka T and Schaubert J (2013) HPV16 activates the AIM2 inflammasome in keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 305:723-732.
- Renoux VM, Bisig B, Langers I, Dortu E, Clémenceau B, Thiry M, Deroanne C, Colige A, Boniver J, Delvenne P and Jacobs N (2011) Human

- Papillomavirus entry into NK cells requires CD16 expression and triggers cytotoxic activity and cytokine secretion. *Eur J Immunol* 41:3240-3252.
- Rinnerthaler M, Streubel MK, Bischof J and Richter K (2015) Skin aging, gene expression and calcium. *Exp Gerontol* 68:59-65.
- Rodríguez MI, Finbow ME and Alonso A (2000) Binding of human papillomavirus 16 E5 to the 16 kDa subunit c (proteolipid) of the vacuolar H⁺-ATPase can be dissociated from the E5-mediated epidermal growth factor receptor overactivation. *Oncogene* 19:3727-32.
- Romagnani S (1999) Th1/Th2 cells. *Inflamm Bowel Dis* 5(4):285-94.
- Rose-John S (2018) Interleukin-6 Family Cytokines. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 10(2):a028415.
- Rosenberg SA (2014) IL-2: The First Effective Immunotherapy for Human Cancer. *J Immunol* 192:5451-5458.
- Sakula A (1983) Augustus Bozzi Granville (1783-1872): London physician-accoucheur and Italian patriot. *J R Soc Med* 76(10):876-82.
- Salomon BL, Leclerc M, Tosello J, Ronin E, Piaggio E and Cohen JL (2018) Tumor Necrosis Factor alpha and Regulatory T Cells in Oncoimmunology. *Front Immunol* 9:444.
- Sanjosé S, Brotons M and Pavón MA (2018) The natural history of human papillomavirus infection. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 47:2-13.
- Santos EW, Oliveira DC, Hastreiter A, Silva GB, Beltran JSO, Tsujita M, Crisma AR, Neves SMP, Fock RA and Borelli P (2016) Hematological and biochemical reference values for C57BL/6, Swiss Webster and BALB/c mice. *Braz J Vet Res Anim Sci* 53(2):138-45.
- Schapiro F, Sparkowski J, Adduci A, Supryniewicz F, Schlegel R and Grinstein S (2000) Golgi alkalization by the papillomavirus E5 oncoprotein. *J Cell Biol* 148(2):305-15.
- Schiffman M, Doorbar J, Wentzensen N, de Sanjosé S, Fakhry C, Monk BJ, Stanley MA and Franceschi S (2016) Carcinogenic human papillomavirus infection. *Nat Rev Dis Primers* 2:16086.
- Schmidt-Arras D and Rose-John S (2016) IL-6 pathway in the liver: From physiopathology to therapy. *J Hepatol* 64(6):1403-15.

- Schnell MA, Hardy C, Hawley M, Propert KJ and Wilson JM (2002) Effect of Blood Collection Technique in Mice on Clinical Pathology Parameters. *Hum Gene Ther* 13:155-162.
- Schwartz RH (2003) T Cell anergy. *Annu Rev Immunol* 21:305-34.
- Scott ME, Shvetsov YB, Thompson PJ, Hernandez BY, Zhu X, Wilkens LR, Killeen J, Vo DD, Moscicki AB and Goodman MT (2013) Cervical cytokines and clearance of incident human papillomavirus infection: Hawaii HPV cohort study. *Int J Cancer* 133(5):1187-96.
- Sharma A, Rajappa M, Satyam A and Sharma M (2009) Cytokines (TH1 and TH2) in patients with advanced cervical cancer undergoing neoadjuvant chemoradiation: correlation with treatment response. *Int J Gynecol Cancer* 19(7):1269-75.
- Silk AW and Margolin K (2019) Cytokine Therapy. *Hematol Oncol Clin North Am* 33(2):261-274.
- Silva RCO, da Silva Júnior AHP, Gurgel APAD, Barros Junior MR, Santos DL, de Lima RCP, Batista MVA, Pena LJ, Chagas BS and Freitas AC (2020) Structural and functional impacts of E5 genetic variants of human papillomavirus type 31. *Virus Res* 290:198143.
- Song D, Li H, Li H and Dai J (2015) Effect of Human Papillomavirus infection on the immune system and its role in the course of cervical cancer. *Oncol Lett* 10(2):600-606.
- Song HK and Hwang DY (2017) Use of C57BL/6N Mice on the Variety of Immunological Researches. *Lab Anim Res* 33(2):119-23.
- Souza AC, Souza AN, Kirsztajn R and Kirsztajn GM (2016) Cervical cancer: Renal complications and survival after percutaneous nephrostomy. *Rev Assoc Med Bras* 62(3):255-261.
- Stanley M (2006) Immune Responses to Human Papilomavirus. *Vaccine* 24 Suppl 1:S16-22.
- Stevanović S, Draper LM, Langan MM, Campbell TE, Kwong ML, Wunderlich JR, Dudley ME, Yang JC, Sherry RM, Kammula US, Restifo NP, Rosenberg SA and Hinrichs CS (2015) Complete regression of metastatic cervical cancer

- after treatment with human papillomavirus-targeted tumor-infiltrating T cells. *J Clin Oncol* 33(14):1543-50.
- Strong LC (1935) The establishment of the C₃H inbred strain of Mice for the study of spontaneous Carcinoma of the mammary gland. *Genetics* 20:586.
- Strong LC (1942) The Origin of Some Inbred Mice.
- Strong LC (1976) A Baconian in Cancer Research: Autobiographical Essay. *Cancer Res* 36:3545-3553.
- Sundström K and Dillner J (2020) How Many Human Papillomavirus Types Do We Need to Screen For? *J Infect Dis* 223(9):1510-1511.
- Tang DC, DeVit M and Johnston SA (1992) Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 356:152–154.
- Tilborghs S, Corthouts J, Verhoeven Y, Arias D, Rolfo C, Trinh XB and van Dam PA (2017) The role of Nuclear Factor-kappa B signaling in human cervical cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 120:141-150.
- Trimble CL, Morrow MP, Kraynyak KA, Shen X, Dallas M, Yan J, Edwards L, Parker RL, Denny L, Giffear M, Brown AS, Marcozzi-Pierce K, Shah D, Slager AM, Sylvester AJ, Khan A, Broderick KE, Juba RJ, Herring TA, Boyer J, Lee J, Sardesai NY, Weiner DB and Bagarazzi ML (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(10008):2078-2088.
- Tsakogiannis D, Gortsilas P, Kyriakopoulou Z, Ruether IG, Dimitriou TG, Orfanoudakis G and Markoulatos P (2015) Sites of disruption within E1 and E2 genes of HPV16 and association with cervical dysplasia. *J Med Virol* 87(11):1973-80.
- 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 USA* 94:8976-81.
- Uppal SS, Verma S and Dhot OS (2003) Normal values of CD4 and CD8 lymphocyte subsets in healthy indian adults and the effects of sex, age, ethnicity, and smoking. *Cytometry B Clin Cytom* 52(1):32-36.

- Van den Bergh MJM, Guerti K, Willemen Y, Lion E, Cools N, Goossens H, Vorsters A, Van Tendeloo VFI, Anguille S, Van Damme P and Smits ELJM (2014) HPV vaccine stimulates cytotoxic activity of killer dendritic cells and natural killer cells against HPV-positive tumour cells. *J Cell Mol Med* 18(7):1372-1380.
- Veiga P (2009) *Health and Medicine in Ancient Egypt: Magic and Science*.
- Venuti A, Paolini F, Nasir L, Corteggio A, Roperto S, Campo MS and Borzacchiello G (2011) Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions. *Mol Cancer* 10:140.
- Vidal AC, Skaar D, Maguire R, Dodor S, Musselwhite LW, Bartlett JA, Oneko O, Obure J, Mlay P, Murphy SK and Hoyo C (2015) IL-10, IL-15, IL-17, and GM-CSF levels in cervical cancer tissue of Tanzanian women infected with HPV16/18 vs. non-HPV16/18 genotypes. *Infect Agent Cancer* 10:10.
- Wagner E, Kircheis R and Walker GF (2004) Targeted nucleic acid delivery into tumors: new avenues for cancer therapy. *Biomed Pharmacother* 58:152-161.
- Wang D, Liu X, Wei M, Qian C, Song S, Chen J, Wang Z, Xu Q, Yang Y, He M, Chi X, Huang S, Li T, Kong Z, Zheng Q, Yu H, Wang Y, Zhao Q, Zhang J, Xia N, Gu Y and Li S (2020) Rational design of a multi-valent human papillomavirus vaccine by capsomere-hybrid co-assembly of virus-like particles. *Nat Commun* 11(1):2841.
- Wei LH, Kuo ML, Chen CA, Chou CH, Lai KB, Lee CN and Hsieh CY (2003) Interleukin-6 promotes cervical tumor growth by VEGF-dependent angiogenesis via a STAT3 pathway. *Oncogene* 22(10):1517-27.
- Wei H, Li B, Sun A and Guo F (2019) Interleukin-10 Family Cytokines Immunobiology and Structure. *Adv Exp Med Biol* 1172:79-96.
- Wells AD, Walsh MC, Sankaran D and Turka LA (2000) Cell Effector Function and Anergy Avoidance are Quantitatively Linked to Cell Division. *J Immunol* 165:2432-2443.
- Westrich JA, Warren CJ, Pyeon D (2017) Evasion of host immune defenses by human papillomavirus. *Virus Res* 231:21-33.

- Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A and Felgner PL (1990) Direct Gene Transfer into Mouse Muscle in Vivo. *Science* 247(4949 Pt 1):1465-8.
- World Health Organization, WHO (16 de dezembro de 2019). Draft: Global strategy towards eliminating cervical cancer as a public health problem.
- Wu EW, Clemens KE, Heck DV and Münger K (1993) The human papillomavirus E7 oncoprotein and the cellular transcription factor E2F bind to separate sites on the retinoblastoma tumor suppressor protein. *J Virol* 67(4):2402-7.
- Wu J, Chen L, Wang Y, Tan W and Huang Z (2019) Prognostic value of aspartate transaminase to alanine transaminase (De Ritis) ratio in solid tumors: a pooled analysis of 9,400 patients. *Onco Targets Ther* 12:5201-5213.
- Wu S, Wu Y, Lu Y, Yue Y, Cui C, Yu M, Wang S, Liu M, Zhao Y and Sun Z (2020) STAT1 expression and HPV16 viral load predict cervical lesion progression. *Oncol Lett* 20(4):28.
- Xu H-M (2014) Th1 cytokine-based immunotherapy for cancer. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 13:482-494.
- Yang B, Yang A, Peng S, Pang X, Roden RBS, Wu T-C and Hung C-F (2015) Co-administration with DNA encoding papillomavirus capsid proteins enhances the antitumor effects generated by therapeutic HPV DNA vaccination. *Cell Biosci* 5:35.
- Yang A, Peng S, Farmer E, Zeng Q, Cheng MA, Pang X, Wu TC and Hung CF (2017) Enhancing antitumor immunogenicity of HPV16-E7 DNA vaccine by fusing DNA encoding E7-antigenic peptide to DNA encoding capsid protein L1 of Bovine papillomavirus. *Cell Biosci* 7:46.
- Zhang N and Bevan MJ (2011) CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity* 35(2):161-8.
- Zhang Y, Ma D, Zhang Y, Tian Y, Wang X, Qiao Y and Cui B (2011) The imbalance of Th17/Treg in patients with uterine cervical cancer. *Clin Chim Acta* 412(11-12):894-900.
- Zhang X, Li S, Modis Y, Li Z, Zhang J, Xia N and Zhao Q (2016) Functional assessment and structural basis of antibody binding to human papillomavirus capsid. *Rev Med Virol* 26(2):115-28.

- Zhu W, Ma L, Qian J, Xu J, Xu T, Pang L, Zhou H, Shu Y and Zhou J (2018) The Molecular Mechanism and Clinical Significance of LDHA in HER2-mediated Progression of Gastric Cancer. *Am J Transl Res* 10(7):2055-2067.
- ZurHausen H (1996) Papillomavirus infections - a major cause of human cancers. *BiochimBiophysActa* 1288(2):F55–78.
- ZurHausen H (2002) Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2:342-350.
- ZurHausen H (2009) Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology* 384(2):260-5.
- ZurHausen H (2019) Cancers in Humans: A Lifelong Search for Contributions of Infectious Agents, Autobiographic Notes. *Annu Rev Virol* 6(1):1-28.

APÊNDICE A: COLABORAÇÃO EM PUBLICAÇÃO DE ARTIGO DE REVISÃO.

EXPERT REVIEW OF ANTICANCER THERAPY, 2018
VOL. 18, NO. 4, 365-376
<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^a and Antonio Carlos De Freitas^a

^aLaboratório de Estudos Moleculares e Tópicos Experimentais – LBTE, 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

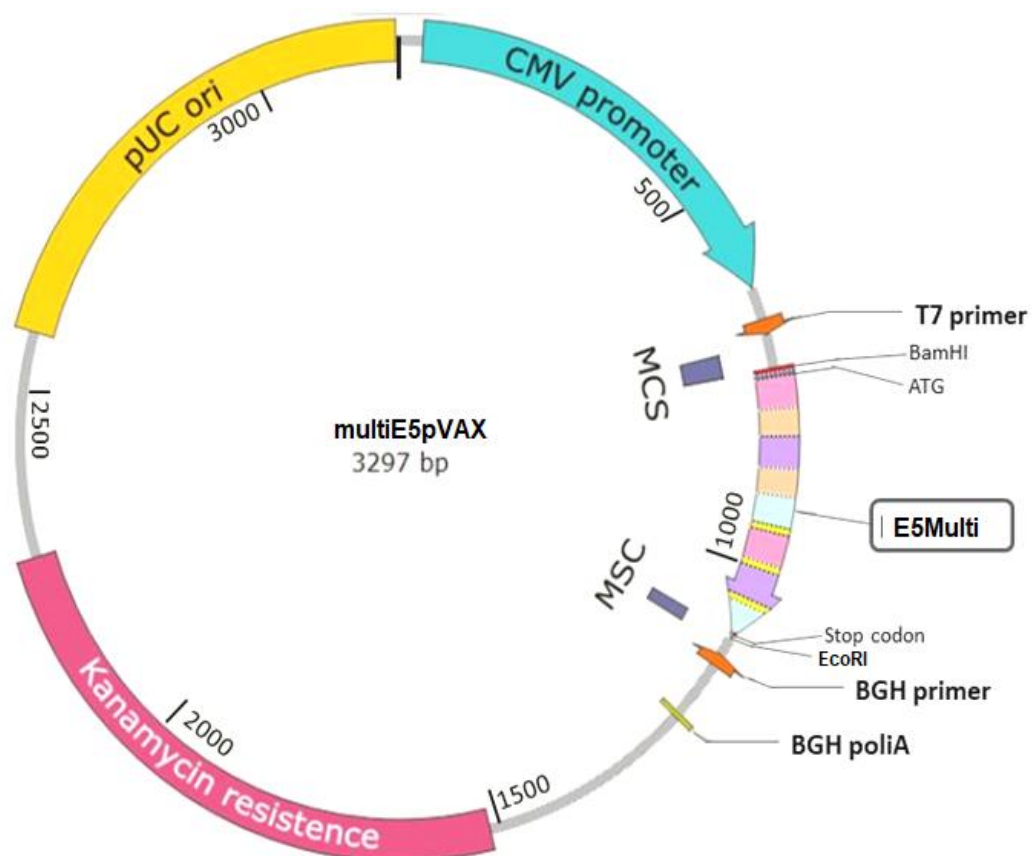
Spontaneous regression of tumors has been attributed to a reactivation of immune response mechanisms, which some of them are not necessarily specific against tumor cells. In fact, this regression can be elicited by the defensive reaction resulting from the presence of uncorrelated pathogens, such as 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

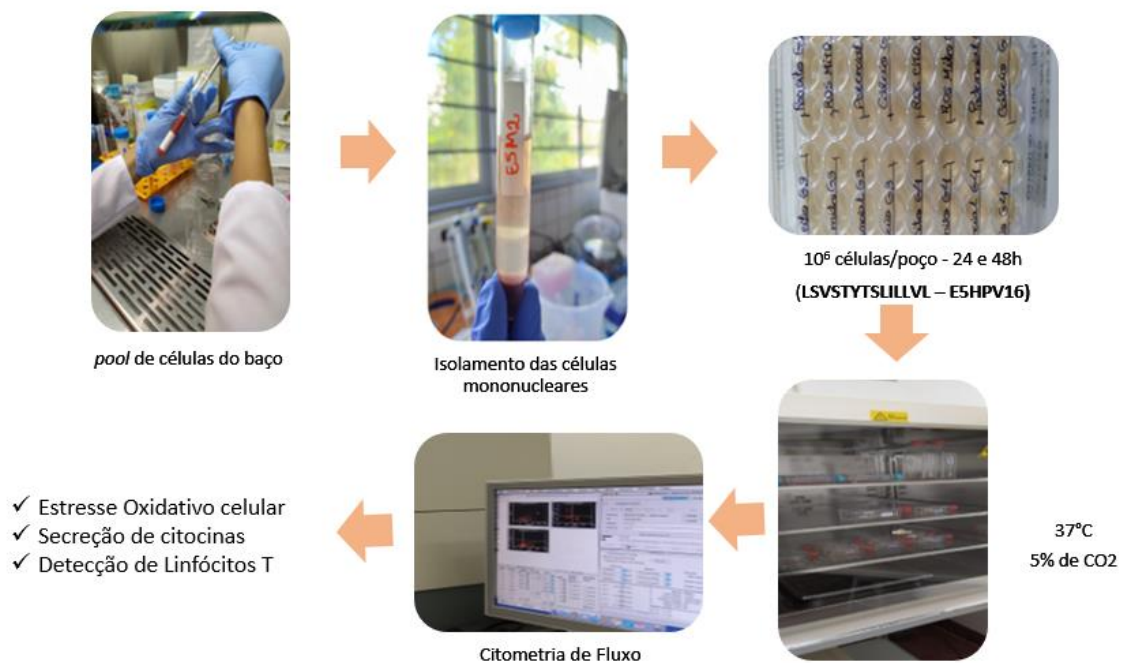
incidence [4], control measures against high-disseminated HPVs still require therapeutic alternatives. Therapeutic vaccines, such as DNA and RNA-based vaccines through genetic manipulation and synthetic long peptides, allowed to design immunostimulatory strategies against virus-infected and/or tumor 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 improve the standard therapy protocols in clinical practice. Surgery, radio- and chemotherapy have no satisfactory effect

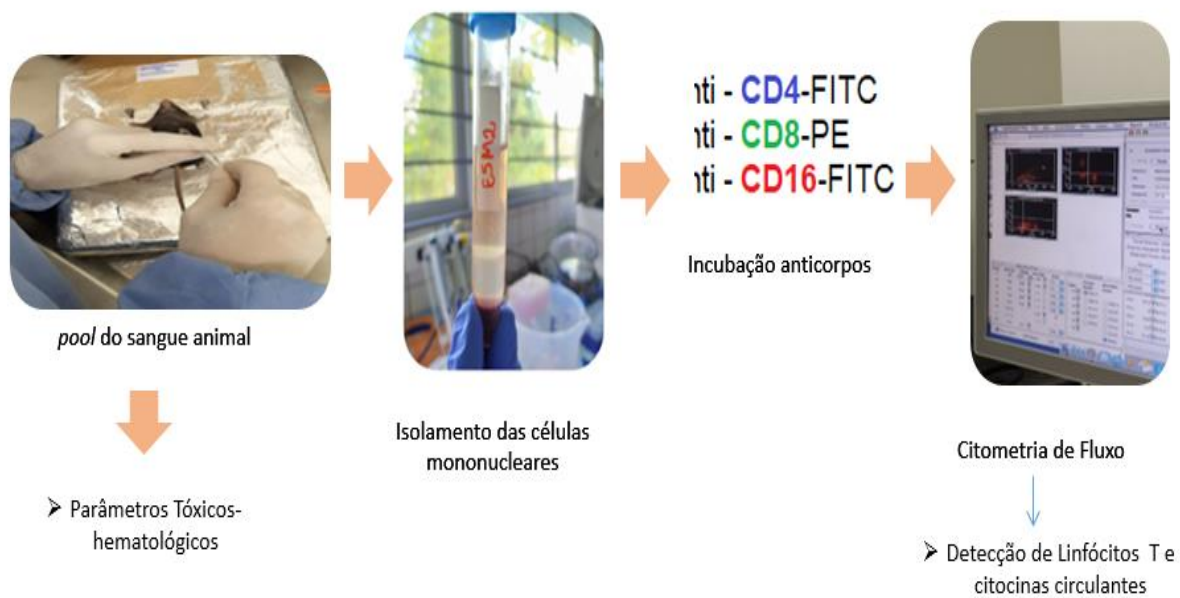
APÊNDICE B: MAPA VETOR VACINAL PVAXE5M.



APÊNDICE C: ISOLAMENTO E CULTURA DE CÉLULAS DO BAÇO.



APÊNDICE D: AVALIAÇÃO DO SANGUE PERIFÉRICO.



ANEXO A: TERMO ADITIVO DO CEUA 99/2016.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Aggeu Magalhães

Recife, 10/08/2019

À Coordenação da Comissão de Ética no Uso de Animais

Assunto: Solicitação de Termo Aditivo do Projeto CEUA nº 99/2016, Adequação do Método de indução de morte e Extração de Materiais Biológicos.

Vimos por meio deste, solicitar a Extensão do prazo de validade do CEUA nº 99/2016 intitulado "Desenvolvimento de estratégias vacinais contra papilomavírus de relevância humana e veterinária baseadas em antígenos recombinantes, vetor vacinal vivo e imunização genética", pelas razões discriminadas abaixo.

Devido a problemas técnicos inerentes a qualquer pesquisa científica e associado a um desembolso financeiro fragmentado e com atraso (o projeto foi prorrogado para novembro de 2020), não foi possível cumprir o cronograma inicialmente proposto para a utilização dos animais requeridos. Com isso, solicitamos a extensão do prazo de validade do referido CEUA pelo período de 12 meses para realização dos experimentos acordados no projeto original.

No projeto inicial, solicitamos o quantitativo de 50 animais (camundongos fêmeas C57BL/6) para o desenvolvimento do projeto. Deste número, 25 animais já foram pedidos para julho, no entanto, devido a um equívoco quanto ao sexo dos animais de fêmea por macho, o experimento teve que ser adiado para outubro. Os outros 25 animais serão devidamente agendados para utilização no 1º semestre de 2020.

Além disso, faz-se necessário a adequação do método de indução de morte onde as substâncias, dose e via serão: 115 mg/Kg do peso do camundongo de Cloridrato de cetamina 10% + 10mg/Kg do peso do camundongo de Cloridrato de xilazina 2%, via intramuscular. E a modificação do método de extração de materiais biológicos que passará a ser realizado via punção cardíaca, uma vez que, para prosseguir com o trabalho haverá a necessidade de grande quantidade do material sanguíneo.

Nestes termos, pede-se deferimento no intuito de garantir o cumprimento dos objetivos inicialmente propostos pelo projeto aprovado.

Atenciosamente,

Christian Robson de Souza Reis


Pesquisador Responsável CEUA nº 99/2016

Dr. Christian Robson de Souza Reis