



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

PEDRO VINICIUS SILVA NOVIS

**ESTRATÉGIAS DE TRATAMENTOS VACINAIS CONTRA
CÂNCERES HPV-RELACIONADOS:
ANCORAGEM DE ANTÍGENOS EM LEVEDURAS**

Recife
2024

PEDRO VINICIUS SILVA NOVIS

**ESTRATÉGIAS VACINAIS TERAPÊUTICAS CONTRA
CÂNCERES HPV-RELACIONADOS:
ANCORAGEM DE ANTÍGENOS EM LEVEDURAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Biomedicina da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Antônio Carlos de Freitas

Recife
2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Novis, Pedro Vinicius Silva.

Estratégias vacinais terapêuticas contra cânceres HPV-relacionados:
Ancoragem de antígenos em leveduras / Pedro Vinicius Silva Novis. - Recife,
2024.

45 p. : il., tab.

Orientador(a): Antônio Carlos de Freitas

Coorientador(a): Anna Jéssia Duarte Silva

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de
Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2024.

Inclui referências.

1. Imunoterapia. 2. Levedura. 3. IRES. 4. Vetor. 5. Antígenos. I. Freitas,
Antônio Carlos de. (Orientação). II. Silva, Anna Jéssia Duarte. (Coorientação). IV.
Título.

610 CDD (22.ed.)

PEDRO VINICIUS SILVA NOVIS

**ESTRATÉGIAS VACINAIS TERAPÊUTICAS CONTRA
CÂNCERES HPV-RELACIONADOS:
ANCORAGEM DE ANTÍGENOS EM LEVEDURAS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação
em Biomedicina da Universidade
Federal de Pernambuco, como
pré-requisito à obtenção do título de
Bacharel em Biomedicina.

Aprovada em: 03/04/2024

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos de Freitas
UFPE / Departamento de Genética

Profa. Dra. Fernanda Cristina Bezerra Leite
UFPE / Departamento de Biologia

Me. Benigno Cristofer Flores Espinoza
UFPE / Departamento de Genética

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Antônio Carlos de Freitas por ter me aceito no laboratório e por sempre me acompanhar e oferecer um ombro amigo e alguém com quem conversar e trocar ideias sobre as pesquisas e a vida.

A minha co-orientadora Anna Jéssica por ter sido uma luz de direção numa época de confusão minha quanto a o que fazer da faculdade e agradecer a ela por ser sempre tão paciente, atenciosa e uma ótima companhia para as loucuras do dia a dia e da minha cabeça.

Ao LEMTE por ser um ambiente tão confortável e acolhedor que reacendeu a minha vontade de participar de pesquisas.

Gostaria de agradecer a Beatriz Mendonça por ter sido minha irmã de laboratório, acompanhamos a jornada um do outro ao longo de todo o processo de mudanças e agitações das rotinas e sempre buscando apoio um no outro.

Agradeço aos meus pais por sempre me apoiarem e cuidarem, sempre me permitindo crescer, explorar e aprender sobre meu próprio caminho a ser seguido e a ajudarem na minha busca por independência.

Agradeço a Mey e Bella por serem meu amado trio de convivência ao longo da graduação, compartilhamos muitas experiências boas, ruins e esquisitas juntos. Também agradeço a Vênus, por serem meu porto seguro na transição do ensino médio para o ensino superior.

Queria pedir obrigado especialmente a mey, nosso diploma realmente deveria ser um diploma compartilhado pelo tanto que um carregou o outro ao longo da faculdade.

Gostaria de agradecer aos meus amigos, ao Coiso, eles são a família que eu escolhi, não estaria aqui se não fosse por vocês, se não fosse pelo amor e carinho que vocês sempre demonstraram por mim.

Em especial quero agradecer a Campelo, Thiago, João e Breno por serem pontos de leveza e diversão no meu dia a dia e ajudarem a aliviar o peso da existência.

Agradeço também ao Gio, Angelo, Nick, Rodrigo, Yang, Wes e Edu, minhas web-companhias pelas madrugadas da vida. Algum dia espero poder conhecer vocês pessoalmente.

I am a forest fire

And I am the fire and I am the forest

And I am a witness watching it

I stand in a valley watching it

(Mitski)

NOVIS, Pedro. **Estratégias vacinais terapêuticas contra cânceres HPV-relacionados**: Ancoragem de antígenos em leveduras. 2024. 35. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2024.

RESUMO

O Papilomavírus Humano (HPV) foi responsável por infectar aproximadamente 9 milhões de pessoas no Brasil em 2022, tendo correlação com o desenvolvimento de diversos cânceres e com destaque em especial o câncer cervical, uma das maiores causas de mortes femininas anualmente. Tendo em vista a parcela elevada da população que já está infectada pelo vírus e que sofre com sua sintomatologia se faz necessário a produção de vacinas terapêuticas as quais possuem o objetivo de controlar a progressão tumoral através da indução de respostas imunológicas contra o tumor ou até mesmo em indivíduos que apresentam lesões neoplásicas. Ademais, construções vacinais carreadas por leveduras se mostram uma abordagem promissora pela sua facilidade de manuseio e custo de manutenção reduzido, quando em comparação a vetores como bactérias e células humanizadas. Assim como, a exploração do cassete de apresentação do antígeno na superfície da parede da levedura pode aprimorar e facilitar o reconhecimento antigênico e a produção de uma resposta imune de forma que facilite a identificação do antígeno pelos macrófagos e produza estratégia de combate ao vírus mais robusta e completa. Tendo isso em mente, a monografia aqui apresentada buscou a produção de uma revisão literária integrativa com o objetivo de responder o questionamento da possibilidade de criação de um vetor de expressão estável e capaz de gerar as respostas imunes propostas, além de buscar criar um esboço para a criação da metodologia de um cassete de expressão vacinal e sua capacidade de inserção em leveduras e ancoragem de suas proteínas secretadas nas paredes celulares das mesmas. Para isso, foi utilizada uma pesquisa bibliográfica transversal por meio de artigos encontrados nas plataformas de pesquisa: *Google Scholar*, *ScienceDirect* e *PubMed* utilizando as palavras-chaves: “HPV”, “Anchorage”, “IRES”, “Cancer” e “Yeasts”. A construção do vetor expressão aqui proposto pode permitir a obtenção das linhagens de leveduras recombinantes as quais espera-se avaliar a expressão e ancoragem das proteínas virais além de discutir seu potencial terapêutico possibilitando novas perspectivas na produção de meios de tratamento para infecções como a causada pelo HPV.

Palavras-chave: Imunoterapia. Levedura. IRES. Vetor. Antígenos.

NOVIS, Pedro. **Therapeutic vaccine strategies against HPV-related cancers: Anchorage of antigens in yeast.** 2024. 35. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2024.

ABSTRACT

The Human Papillomavirus (HPV) was responsible for infecting approximately 9 million people in Brazil in 2022, having a correlation with the development of several cancers, particularly cervical cancer, one of the biggest causes of female deaths annually. Taking into account the high proportion of the population that is already infected by the virus and that suffers from its symptoms, it is necessary to produce therapeutic vaccines which aim to control tumor progression through the induction of immunological responses against the tumor or even in individuals with neoplastic lesions. Furthermore, vaccine constructs carried by yeast prove to be a promising approach due to their ease of handling and reduced maintenance cost, when compared to vectors such as bacteria and humanized cells. Likewise, the exploitation of the antigen presentation cassette on the surface of the yeast wall can improve and facilitate antigen recognition and the production of an immune response in a way that facilitates antigen identification by macrophages and produces a more robust virus-fighting strategy. and complete. With this in mind, the monograph presented here sought to produce an integrative literature review with the aim of answering the question of the possibility of creating a stable expression vector capable of generating the proposed immune responses, in addition to seeking to create an outline for the creation of the methodology of a vaccine expression cassette and its ability to insert into yeast and anchor its secreted proteins in their cell walls. For this, a cross-sectional bibliographic search was used using articles found on the search platforms: Google Scholar, ScienceDirect and PubMed using the keywords: “HPV”, “Anchorage”, “IRES”, “Cancer” and “Yeasts” . The construction of the expression vector proposed here may allow the obtaining of recombinant yeast strains which are expected to evaluate the expression and anchoring of viral proteins, in addition to discussing their therapeutic potential, enabling new perspectives in the production of means of treatment for infections such as that caused by HPV.

Key words: Immunotherapy. Yeast. IRES. Vector. Antigens.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Patogênese da infecção pelo HPV.....	15
Figura 2 - Histórico da evolução da pesquisa de utilização de leveduras e expansão do conhecimento acerca de seu genoma.....	20
Figura 3 - O mecanismo da vacina contra o câncer in vivo.....	25
Figura 4 - Esquematização da ancoragem de antígenos em uma parede celular de levedura, como pode ser observado no Quadro A. No Quadro B é apresentada uma aproximação para que se possa observar como é estruturado o “gancho” utilizado para conectar o antígeno à parede celular.....	32
Figura 5 - Esquematização do processo de construção do cassete de expressão.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Apresentação das principais proteínas presentes no genoma do HPV e suas funcionalidades.....	13
Tabela 2 – Apresentação das estratégias vacinais vigentes, acompanhadas por exemplos usuais e seus respectivos custos aproximados de produção.....	21
Tabela 3 – Elucidação das principais leveduras utilizadas para pesquisas vacinais.....	21
Tabela 4 – Elucidação das principais IRES utilizadas atualmente pesquisadas sobre seu uso em leveduras e seus respectivos vírus de origem.....	34

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1	HPV.....	12
2.1.1	ASPECTOS GERAIS DO HPV.....	12
2.1.2	INFECÇÃO.....	14
2.1.3	VACINAÇÃO PROFILÁTICA E TERAPÊUTICA.....	16
2.1.4	ESTRATÉGIAS VACINAIS TERAPÊUTICAS.....	17
2.1.5	ONCOPROTEÍNAS UTILIZADAS COMO ANTÍGENOS VIRAIS PARA O HPV.....	18
2.2	LEVEDURAS.....	19
2.2.1	HISTÓRICO DE UTILIZAÇÃO DE LEVEDURAS.....	19
2.2.2	APLICABILIDADE NA BIOTECNOLOGIA APLICADA À SAÚDE.....	20
2.2.3	LEVEDURAS COMO CARREADORAS DE ANTÍGENOS.....	24
3	OBJETIVOS.....	28
3.1	OBJETIVO GERAL.....	28
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
4	METODOLOGIA.....	29
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
6	CONCLUSÃO.....	37
	REFERÊNCIAS.....	38

1 Introdução

O HPV, sigla representativa do Papilomavírus Humano, é um microorganismo responsável por infectar, em 2022, um número estimado de 9 milhões de pessoas no Brasil, segundo o Ministério da Saúde (Ministério da Saúde, 2022). Sua infecção é considerada uma Infecção Sexualmente Transmissível (IST) e acredita-se que cerca de 80% da população sexualmente ativa entrará em contato com o vírus em algum momento ao longo da sua vida, tornando o vírus uma das ISTs mais disseminadas mundialmente (Butantan, [s.d.]). Além disso, os HPVs considerados de alto risco (HPV 16 e HPV 18) possuem uma alta taxa de correlação com o aparecimento de cânceres em pessoas infectadas, estes podendo acometer não somente a região vaginal como também orofaringe, ânus e pênis (Castro; Bussoloti Filho, 2006; Lin; Franceschi; Clifford, 2018). Destes, o câncer de colo de útero é o mais comumente conhecido e associado, assim como o segundo tipo de câncer que mais acomete mulheres (OPAS/OMS, [s.d.]).

O tratamento dos cânceres relacionados ao HPV tem sido objeto de crescente interesse, especialmente no contexto das vacinas terapêuticas. Enquanto os métodos tradicionais de tratamento, como cirurgia, quimioterapia e radioterapia, têm sido utilizados com sucesso, todavia, a eficácia dessas abordagens pode ser limitada e os efeitos colaterais podem ser significativos. Nesse sentido, as vacinas terapêuticas emergem como uma promissora modalidade de tratamento, visando ativar ou reforçar a resposta imunológica do paciente contra as células tumorais (Trimble; Frazer, 2009). Estudos recentes têm investigado o potencial das vacinas terapêuticas baseadas em antígenos do HPV para estimular respostas imunológicas específicas contra células tumorais HPV-positivas. Por exemplo, a vacina terapêutica VGX-3100, que contém plasmídeos de DNA codificando antígenos E6 e E7 do HPV, demonstrou induzir respostas imunes robustas e promissoras em ensaios clínicos de fase II para câncer cervical e vulvar (Bagarazzi et al., 2012; Tang et al., 2022). Além disso, a combinação de vacinas terapêuticas com outros tratamentos imunomoduladores, como inibidores de *checkpoint* imunológico, tem sido explorada para potencializar ainda mais as respostas imunológicas antitumorais. Embora ainda em estágios iniciais, as vacinas terapêuticas representam uma abordagem inovadora e promissora para o tratamento dos cânceres HPV-relacionados, oferecendo perspectivas de terapias mais eficazes e com menor toxicidade (Massarelli et al., 2019). No entanto, são necessárias mais pesquisas clínicas para

validar sua eficácia e segurança em uma variedade de contextos clínicos e de pacientes.

Leveduras vêm sendo exploradas como veículo vacinal devido ao seu relativo baixo custo de cultivo, facilidade de reprodução e manipulação gênica facilitada (Huang et al., 2019; Kumar; Kumar, 2019). A *Saccharomyces cerevisiae* foi a pioneira na utilização de leveduras pelo setor de saúde, sendo avaliada por sua capacidade de produção de proteínas recombinantes (Capilla et al., 2009; Kumar; Kumar, 2019). Ademais, o tecnologia de ancoragem de proteínas na superfície de leveduras elevou ainda mais o valor desses microrganismos no setor vacinal; um procedimento que favorece o reconhecimento de antígenos pelo sistema imune, facilitando e agilizando o processo de resposta imune frente à patologia (Gai; Wittrup, 2007).

Em retrospectiva, a utilização de leveduras no setor biotecnológico se limitava no seu uso para purificação de proteínas (Raran-Kurussi; Waugh, 2017) ou, em casos mais recentes, a utilização de leveduras completas como vetores vacinais, que tem despertado considerável interesse devido à sua capacidade de induzir respostas imunes robustas e específicas contra antígenos estranhos (Siva et al., 2023). Todavia, ambas as metodologias eram em sua maior parte utilizadas para produção de vacinas profiláticas, abrindo um espaço para o questionamento da viabilidade do uso das leveduras em esquemas de imunotratamentos vacinais para quadros cancerígenos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. 1. HPV

2.1.1 ASPECTOS GERAIS DO HPV

O Papilomavírus Humano pertencente à família Papillomaviridae, dentro do gênero Papilomavírus, possui uma origem incerta onde pesquisas de sua gênese apontam para o final da era Paleozóica. A contar desta época, pôde-se observar a presença do vírus em diversos tipos de organismos, encontrando-o em répteis, aves e diversos animais mamíferos. É considerado um vírus de DNA dupla fita não

envolvido possuindo cerca de 55 nm de diâmetro com uma forma tridimensional icosaédrica e seu DNA é composto por cerca de 8.000 pares de bases (Ross, 2023). Sua estruturação genética se dá pela presença de proteínas estruturais, a exemplo da L1 e L2, assim como proteínas não estruturais como o E5, E6 e E7, como pode ser elucidado na Tabela 1, além de regiões capazes de regular a expressão gênica do vírus e regiões de controle viral (Muñoz et al., 2003). Ademais, o HPV apresenta uma grande diversidade genética, sendo considerado uma família de vírus que engloba mais de 100 tipos devido a alterações em regiões específicas de seus genes, conferindo ao vírus uma plasticidade referente a oncogenicidade (Hebner; Laimins, 2006).

Tabela 1 - Apresentação das principais proteínas presentes no genoma do HPV e suas funcionalidades.

Proteína	Função
E1	Proteína envolvida na replicação do DNA viral, atua como helicase e auxilia na separação das cadeias de DNA durante a replicação viral.
E2	Proteína reguladora da expressão gênica viral, controla a replicação do DNA viral e a transcrição dos genes virais. Também está envolvida na manutenção do genoma viral.
E4	Proteína envolvida na desorganização do citoesqueleto da célula hospedeira, facilitando a liberação de partículas virais.
E5	Proteína associada à transformação celular e à progressão do ciclo celular. Interage com receptores de fatores de crescimento e promove a proliferação celular.
E6	Proteína que inibe a apoptose celular e promove a degradação da proteína p53, suprimindo a resposta imune do hospedeiro e contribuindo para a carcinogênese.
E7	Proteína que se liga e inativa proteínas do retinoblastoma (pRb), levando à desregulação do ciclo celular e à proliferação celular descontrolada. Também está envolvida na imortalização celular.
L1	Proteína estrutural principal do capsídeo viral, forma a cápside que envolve o DNA viral e é essencial para a montagem de novas partículas virais.
L2	Proteína estrutural do capsídeo viral, auxilia na montagem do capsídeo viral e na entrada do DNA viral nas células hospedeiras durante a infecção.

Fonte: Autor

Sabe-se que, no Brasil, cerca de 54,4% das mulheres já foram infectadas pelo vírus, enquanto 41,6% dos homens também compartilham desse quadro (Wendland et al., 2018). É um vírus epitelial, comumente podendo causar

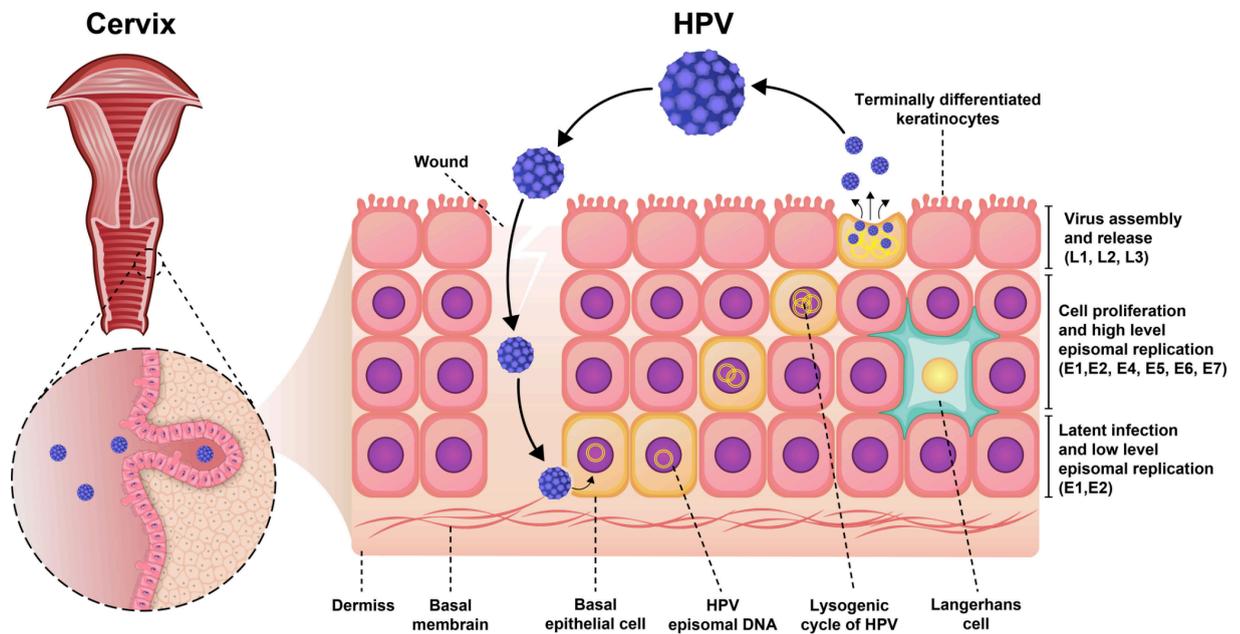
sintomatologia na forma do aparecimento de verrugas na região infectada, sendo ela nas mãos, pés, articulações, regiões mucosas ou região anogenital (Witchey et al., 2018). É considerado um fator de risco à saúde não somente da mulher como também da saúde pública, o HPV é considerado uma infecção sexualmente transmissível com uma alta taxa de contágio, sendo capaz de ser transmitido tanto pelo homem quanto pela mulher (Hebner; Laimins, 2006). Apesar de sua sintomatologia no homem ser mais branda, ainda assim pode se agravar para casos de câncer peniano (Gamboa-Hoil, 2023). Enquanto na mulher, o vírus possui uma alta correlação com o aparecimento de tumores no colo uterino, sendo uma das maiores causas de morte em mulheres (Cohen et al., 2019). Não obstante, existem outros tipos de cânceres que possuem correlação com o HPV, tais como o câncer de cabeça e pescoço e câncer anal; ademais, pesquisas recentes vem analisando a presença e a correlação desse vírus com o desenvolvimento de câncer mamário (Anna Szymonowicz; Chen, 2020. Roman; Aragones, 2021).

O HPV é considerado uma família de diversos tipos virais os quais compartilham características entre si, no momento atual do estudo, mais de 100 tipos diferentes do vírus foram catalogados pelos servidores de saúde, entre esses, 4 se destacam como tendo uma importância elevada sob os demais (Yousefi et al., 2022). Os tipos 6, 11, 16 e 18 são os mais amplamente estudados mundialmente, esse fato se dá pelo entendimento de que os tipos 16 e 18 são os que se fazem mais presentes nos casos de tumores uterinos, resultando em cerca de 70% dos casos hospitalares. Enquanto isso, os tipos 6 e 11, apesar de não serem considerados oncogênicos, também recebem atenção especial pois se fazem mais presentes em casos de condilomas genitais e papilomas laríngeos (Okunade, 2020).

2. 1. 2. INFECÇÃO

Quanto à infecção, a família Papillomaviridae é considerada espécie-específica, assim, o HPV é capaz apenas de infectar seres humanos, também sendo classificados como restritos à infecção tecidual, com tropismo por tecido cutâneo ou escamoso (Schiller; Day; Kines, 2010). O ciclo infectante do Papilomavírus pode ser dividido de forma educativa em 5 partes, como elucidado na Figura 1 (Della Fera et al., 2021):

Figura 1: Patogênese da infecção pelo HPV. Inicialmente, o vírus estava latente no interior da célula epitelial e apresentava baixa taxa de proliferação. À medida que o vírus entra no ciclo lisogênico, a taxa de proliferação aumenta. Finalmente, os vírus são montados e secretados pelos queratinócitos para repetir o ciclo de infecção.



Fonte: Yousefi et al., 2022

1. Transmissão - O vírus é primariamente transmitido através do contato direto entre um tecido epitelial saudável e um tecido infectado, sendo em sua maioria, transmitido através do contato sexual; sendo ele vaginal, anal ou oral. Porém, qualquer contato de pele infectada com pele saudável pode levar a infecção, causando assim infecções em regiões das palmas, nos dedos e em outras regiões corpóreas. Essa transmissão pode ocorrer com a presença ou ausência de sintomas visíveis no indivíduo infectante.

2. Entrada nas células epiteliais - Após a transmissão, o vírus entra no corpo através de micro-abrasões ou pequenos cortes na pele e/ou membranas mucosas do organismos. Como a família Papilomaviridae tem seu tropismo por células epiteliais, esse tipo celular vai ser seu alvo primário para invasão.

3. Infecção de Células basais - Após sua invasão, o vírus irá migrar para as células basais do organismo, encontradas na parte mais profunda do epitélio. Isso se dá pois essas células têm maior taxa de replicação e um nível maior de funcionamento de seu metabolismo. Assim, o vírus infecta as células basais e começa seu processo de replicação.

4. Replicação e produção de partículas virais - O HPV se replica dentro das células basais, usando a maquinaria celular para produzir cópias de si mesmo. Assim garantindo de que quando as células infectadas se multiplicarem e moverem-se para a superfície da pele, elas irão continuar com a produção viral, aumentando o número de células com a capacidade de produzir novos vírus.

5. Espalhamento das partículas virais - As células infectadas, ao chegar no apogeu epitelial, vão expulsar as partículas virais para o meio ambiente do organismo contaminando-o, fazendo assim com que mais células sejam infectadas pelo vírus, além de aumentar a chance de contágio de outros indivíduos através desse processo.

2. 1. 3. VACINAÇÃO PROFILÁTICA E TERAPÊUTICA

A vacinação contra o Papilomavírus Humano (HPV) no Brasil é uma estratégia fundamental para a prevenção do câncer do colo do útero e outras doenças associadas ao HPV. Desde 2014, o Ministério da Saúde implementou as vacinas contra o HPV no Programa Nacional de Imunizações (PNI), oferecendo gratuitamente a vacina contra o HPV para meninas e meninos entre 9 e 14 anos (Martins CM et al. , 2021). Além disso, campanhas de conscientização são promovidas para garantir a adesão da população-alvo e fornecer informações sobre a importância da vacinação precoce. A iniciativa tem sido fundamental para reduzir a incidência de doenças relacionadas ao HPV no Brasil. Todavia, segundo pesquisa feita pelo Ministério da Saúde, de 2019 para 2022 ocorreu uma queda na cobertura vacinal contra o HPV onde, em 2019, cerca de 87% de garotas brasileiras estavam imunizadas contra o vírus, mas em 2022 essa porcentagem caiu para cerca de 75%. Enquanto para meninos o decréscimo foi de 61% para 52%.

Quanto ao objetivo vacinal, existem dois tipos de vacinas: as profiláticas e as terapêuticas. As vacinas profiláticas podem ser produzidas a partir de partes virais isoladas como por exemplo proteínas virais, estruturas de composição do vírus ou até mesmo de DNA ou RNA viral (Derchain; Sarian, 2007). Elas tem como objetivo a preparação pré-infecção do organismo humano para lidar com o vírus, ou seja, ela prepara o sistema imune através de uma exposição controlada ao antígeno em questão de uma forma que leve o sistema imunológico a criar uma resposta imune frente a carga viral e gravar tal resposta para que, em caso de eventuais exposições,

o corpo possa ser capaz de se defender de forma mais rápida e capaz, evitando assim casos mais graves (Zardo et al., 2014).

Enquanto isso, as vacinas terapêuticas são voltadas para a parcela da população que já está infectada e que enfrenta sintomas referentes ao vírus. Logo, o objetivo desse tipo vacinal não é preparar o organismo, mas sim reforçar as defesas imunológicas ou até mesmo criar uma abertura para que o sistema imune seja capaz de controlar ou eliminar o vírus de seu sistema (Morse; Gwin; Mitchell, 2021). São vacinas que usam de diversas metodologias para conseguir alcançar o efeito desejado, tal como restringir genes específicos virais responsáveis pelo alastramento da doença, por seu agravamento de quadro ou até mesmo estruturas responsáveis pela evasão imunológica inerente ao microrganismo (Izda; Jeffries; Sawalha, 2021). Essas vacinas têm o potencial de dar o apoio necessário para evitar sequelas em pacientes assim como para ajudar em casos de pior prognóstico, sendo uma grande ferramenta para ser usada em conjunto aos tratamentos vigentes.

2. 1. 4. ESTRATÉGIAS VACINAIS TERAPÊUTICAS

Dentre as principais estratégias terapêuticas, destacam-se as vacinas de células dendríticas, que envolvem a coleta *in vivo* e processamento *ex vivo* de maturação e ativação das células do paciente, seguida da sua reinserção no organismo para desencadear uma resposta imunológica direcionada contra células tumorais ou autoantígenos (Santos; Butterfield, 2018). Além disso, as vacinas baseadas em peptídeos sintéticos ou proteínas recombinantes representam uma alternativa promissora, permitindo a administração de antígenos específicos para induzir respostas imunológicas direcionadas, sem os riscos associados à administração de células vivas (Tripathi; Shrivastava, 2018). Recentemente, a tecnologia de RNA mensageiro (mRNA) tem emergido como uma plataforma versátil para a entrega de antígenos, permitindo a rápida produção de vacinas personalizadas contra uma ampla variedade de alvos terapêuticos (Xu et al., 2020).

Em adição, o uso de leveduras como estratégias vacinais terapêuticas tem despertado interesse significativo devido à sua capacidade de apresentar antígenos de forma eficaz ao sistema imunológico. Leveduras, como a *Saccharomyces cerevisiae*, têm sido exploradas como veículos para a entrega de antígenos

terapêuticos contra uma variedade de doenças, incluindo câncer e doenças infecciosas (Galao et al., 2007; Wansley et al., 2008). Estudos demonstraram que as leveduras podem ser geneticamente modificadas para expressar antígenos específicos, induzindo uma resposta imunológica adaptativa direcionada contra células tumorais ou patógenos (Wansley et al., 2008).

2. 1. 5. ONCOPROTEÍNAS UTILIZADAS COMO ANTÍGENOS VACINAIS PARA O HPV

Os principais genes que usualmente são pesquisados sobre e utilizados na pesquisa de produção de imunotratamentos para o HPV são chamados de E6 e E7; a letra E representa a palavra “Early Proteins” responsáveis pela replicação viral e controle dos processos da célula hospedeira, cruciais para estabelecer e manter a infecção (Estêvão et al., 2019). Além disso, existe a proteína E5, um gene que vem sendo pesquisado e analisado quanto a sua intrínseca atividade emparelhada com os genes mencionados anteriormente e sua capacidade de viabilizar as células cancerígenas (Venuto et al., 2011).

O gene E5 possui importância para manter a “homeostase” das células infectadas e facilitar o aparecimento de tumores. Ele possui a capacidade de aprimorar a ativação ligante-dependente do Receptor de Fator de Crescimento Epidérmico (EGF-R), levando a uma proliferação descontrolada de queratinócitos, expandindo a população de células infectadas pelo HPV no organismo humano, através da diminuição dos fatores que levam a degradação e acidificação endossomal do EGF-R, assim como pode utilizar a ATPase para gerar o mesmo resultado (Dimaiio; Mattoon, 2001; Dimaiio; Petti, 2013). Ademais, o E5 também possui sua função de impedimento da morte celular através de interações com a proteína BAX, onde o gene vai inibir essa estrutura que possui papel no processo de apoptose celular (Venuti et al., 2011).

Enquanto isso, o gene E7 retém sua importância na transformação dos queratinócitos infectados, assim como tendo um papel crucial na progressão do ciclo de vida viral assim como na patogênese associada ao HPV. Sua principal função é inativar proteínas reguladoras do ciclo celular como o pRb, levando a uma rápida proliferação de células danificadas, alterando a fase S do ciclo de duplicação celular. Da mesma forma, o gene E7 altera o funcionamento normal da transição da fase G1 para a fase S do ciclo mitótico através de interações com o inibidores de ciclina p21

e p27, levando a uma falha no sistema de verificação da viabilidade do genoma celular a ser replicado, permitindo que células com genomas danificados ou incompletos sejam replicadas (Estêvão et al., 2019; McLaughlin-Drubin; Munger, 2009; Munger et al., 2001). Assim, o E7 permite o acúmulo de defeitos genéticos nas células infectadas aumentando o risco do aparecimento de defeitos cancerígenos e surgimento de tumores no local infectado.

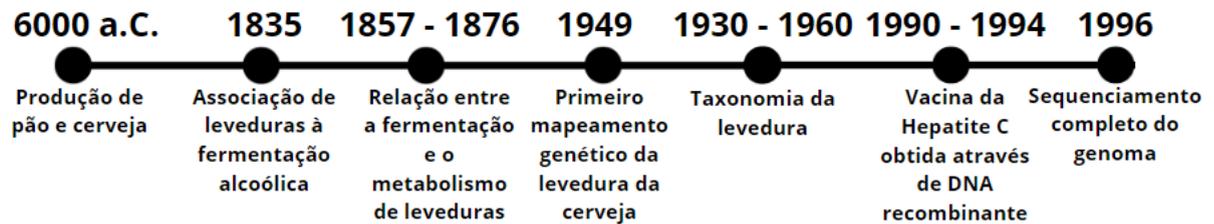
Por fim, o E6 do HPV age por meio de sua interação com proteínas celulares essenciais. Uma das principais interações ocorre com a proteína p53, reguladora da resposta ao estresse celular e supressor de tumor. O E6 se liga à p53 e promove sua degradação por meio do sistema ubiquitina-proteassoma, resultando na perda da capacidade da p53 de induzir a apoptose e reparar o DNA danificado. Essa inibição da p53 pelo E6 é considerada uma etapa crítica na transformação celular induzida pelo HPV, permitindo a sobrevivência e proliferação não controlada das células infectadas. Além disso, o E6 também está envolvido na regulação da função de outras proteínas celulares, incluindo proteínas do ciclo celular e fatores de transcrição, contribuindo assim para o desenvolvimento de tumores associados ao HPV (Hoppe-Seyler et al., 2018; Manzo-Merino et al., 2013).

2. 2. LEVEDURAS COMO VETORES VACINAIS

2. 2. 1 HISTÓRICO DE UTILIZAÇÃO DE LEVEDURAS

A seleção do vetor vacinal adequado depende do tipo de patógeno-alvo, da resposta imune desejada e das considerações de segurança. Ao otimizar a eficácia e a segurança dos vetores vacinais, é possível desenvolver vacinas mais eficazes e seguras para prevenir uma ampla gama de doenças infecciosas. Leveduras vêm sendo utilizadas no ramo industrial há milhares de anos no ramo da alimentação e seu uso foi verdadeiramente catapultado pelo pioneirismo da *Saccharomyces cerevisiae* na fermentação alcoólica e na produção de cervejas (Barnett, 2007; Gibson et al., 2007). Desde então, diversas pesquisas foram produzidas para entender os mecanismos de funcionamento desses microrganismos e seu sistema de fermentação, como elucidado na Figura 2, assim como a sua aplicabilidade na expressão de proteínas, como elucidado no esquema abaixo.

Figura 2 - Histórico da evolução da pesquisa de utilização de leveduras e expansão do conhecimento acerca de seu genoma.



Fonte: Autor

Devido ao advento da biotecnologia e sua constante evolução, o entendimento de como modificar microrganismos para uso em diversos setores tais quais alimentícios, farmacêuticos e, em especial, biomédicos foi indispensável para o desenvolvimento da tecnologia médica como conhecemos hoje, levando a um estopim na produção de formas vacinais de diferentes funcionalidades.

2. 2. 2. APLICABILIDADE NA BIOTECNOLOGIA APLICADA À SAÚDE

As leveduras podem se apresentar como um sistema de produção vacinal mais simples, quando comparado ao de bactérias, tanto em seus aspectos de manuseio como também apresentam um custo de desenvolvimento e manutenção que, por diversas vezes, tem um teor chamativo para países em desenvolvimento como o Brasil, em comparação a outros modelos vacinais que são mais custosos, como apresentado na Tabela 2. (De Sá Magalhães; Keshavarz-Moore, 2021). A comparação de custos da utilização de leveduras em relação a outros sistemas utilizados em pesquisas vacinais, como bactérias ou células humanas, apresenta um certo impasse de fatores, incluindo o tipo de vetor, a escala de produção e os requisitos de purificação (Kumar; Kumar, 2019). Embora as leveduras apresentem vantagens claras em termos de baixo custo de cultivo e alta capacidade de expressão de proteínas recombinantes, os custos totais podem variar dependendo das especificidades do processo de produção. Em comparação com sistemas de expressão em células de mamíferos, as leveduras tendem a ser mais econômicas devido aos menores requisitos de nutrientes e ao menor tempo de cultivo (Ahmad et al., 2014). Aspectos como dificuldade em armazenamento, falta de estrutura industrial para sua produção e pouco ou inexistente investimento no setor de

pesquisa vacinal são pontos que dificultam a produção em alta escala e ampla distribuição de vacinas em países em desenvolvimento (Kumar; Kumar, 2019).

Tabela 2 - Apresentação das estratégias vacinais vigentes, acompanhadas por exemplos usuais e seus respectivos custos aproximados de produção.

Estratégia vacinal	Exemplos	Custo por dose (aproximado)
Vírus Inativado	Sinovac, Sinopharm	R\$ 27,50 - R\$ 55,00
Vírus Atenuado	Vacina contra a poliomielite oral (OPV)	R\$ 5,50 - R\$ 16,50
Subunidades Protéicas	Vacina contra a Hepatite B	R\$ 55,00 - R\$ 110,00
Vetor Viral	AstraZeneca, Johnson & Johnson's Janssen	R\$ 27,50 - R\$ 82,50
RNA Mensageiro	Pfizer-BioNTech, Moderna	R\$ 82,50 - R\$ 165,00
Partículas semelhantes a vírus	Novavax	R\$ 82,50 - R\$ 137,50

Fonte: autor

Fora os fatores mencionados acima, outro ponto importante que torna as leveduras um ponto especial de interesse médico é sua alta capacidade de produção de proteínas heterólogas dando a elas uma posição vantajosa pela preferência de seu uso por laboratórios de pesquisa para produção de biofármacos (Mattanovich et al., 2012). Essas características tornam as leveduras uma escolha atraente para estudos em uma variedade de áreas, incluindo biologia molecular, genética, biologia celular, biotecnologia e medicina. Existem diversas leveduras que compartilham essas características e a Tabela 3 apresenta as 3 mais populares para pesquisas vacinais; todavia a *S. cerevisiae* e a *P. pastoris* se destacam como as com melhor relação praticidade/produção dentre as leveduras utilizadas para produção de proteínas terapêuticas e expressão de genes heterólogos.

Tabela 3 - Elucidação das principais leveduras utilizadas para pesquisas vacinais.

Levedura	Características	Principais aplicações
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Metabolismo fermentativo: <i>S. cerevisiae</i> é capaz de fermentar uma variedade de substratos, como glicose, frutose e maltose, produzindo etanol e dióxido de carbono como principais produtos	Produção de vacinas: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> é utilizada como plataforma para a produção de vacinas recombinantes. A levedura é capaz de expressar antígenos de patógenos humanos de

	<p>metabólicos.</p> <p>Tolerância a estresse: A levedura demonstra uma notável capacidade de sobreviver e proliferar em condições de estresse, como altas concentrações de etanol, temperatura elevada, baixo pH e alta pressão osmótica.</p> <p>Facilidade de manipulação genética: A disponibilidade de ferramentas genéticas e técnicas de manipulação molecular torna <i>S. cerevisiae</i> um organismo modelo ideal para estudos em biologia molecular e genética.</p> <p>Produção de proteínas recombinantes: <i>S. cerevisiae</i> é amplamente utilizada na produção de proteínas recombinantes devido à sua capacidade de realizar modificações pós-traducionais complexas, como glicosilação e dobramento correto de proteínas.</p>	<p>interesse, como vírus e bactérias, permitindo a produção de vacinas contra uma variedade de doenças infecciosas.</p> <p>Produção de proteínas terapêuticas: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> é utilizada na produção de proteínas terapêuticas, como insulina, fatores de crescimento, hormônios e enzimas, por meio de técnicas de engenharia genética.</p> <p>Pesquisa e desenvolvimento de medicamentos: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> é frequentemente utilizada como organismo modelo em estudos de pesquisa para entender os mecanismos moleculares de doenças humanas e para identificar potenciais alvos terapêuticos. Além disso, a levedura pode ser usada em ensaios de triagem de medicamentos para identificar compostos com atividade terapêutica contra uma variedade de condições de saúde.</p>
<p><i>Pichia pastoris</i></p>	<p>Sistema de expressão heteróloga eficiente: <i>Pichia pastoris</i> é capaz de secretar grandes quantidades de proteínas recombinantes para o meio de cultura, tornando-a uma escolha atraente para a produção em larga escala de proteínas heterólogas.</p> <p>Regulação do promotor indutível: O sistema de expressão de <i>Pichia pastoris</i> é baseado na regulação do promotor AOX1 (alcohol oxidase 1), que é induzido pela presença de metanol no meio de cultura. Isso permite o controle preciso da expressão da proteína recombinante.</p> <p>Capacidade de glicosilação: Assim como leveduras como <i>Saccharomyces cerevisiae</i>, <i>Pichia pastoris</i> é capaz de</p>	<p>Produção de proteínas terapêuticas: <i>Pichia pastoris</i> é frequentemente empregada na produção de proteínas terapêuticas, como hormônios, fatores de crescimento, enzimas e anticorpos monoclonais.</p> <p>Desenvolvimento de vacinas: <i>Pichia pastoris</i> é utilizada como plataforma para o desenvolvimento e produção de vacinas recombinantes. A levedura pode expressar antígenos de patógenos humanos de interesse, permitindo a produção de vacinas contra uma variedade de doenças infecciosas, incluindo vírus, bactérias e parasitas.</p> <p>Produção de enzimas: <i>Pichia pastoris</i> é uma plataforma</p>

	<p>realizar glicosilação pós-traducional de proteínas recombinantes, o que é importante para a adequada dobragem e função de muitas proteínas e também para aplicações terapêuticas.</p> <p>Tolerância a condições de cultivo: <i>Pichia pastoris</i> é capaz de crescer em uma variedade de condições de cultivo, incluindo diferentes temperaturas, pH e concentrações de metanol, tornando-a adaptável a diferentes processos de produção industrial.</p>	<p>eficaz para a produção de enzimas industriais devido à sua capacidade de expressar enzimas heterólogas em altos níveis.</p> <p>Engenharia de proteínas: <i>Pichia pastoris</i> é frequentemente utilizada na engenharia de proteínas para modificar e otimizar proteínas terapêuticas e enzimas para melhorar sua estabilidade, atividade e especificidade. Essa capacidade de engenharia de proteínas permite o desenvolvimento de medicamentos e produtos biotecnológicos mais eficazes e seguros.</p>
<p><i>Kluyveromyces lactis</i></p>	<p>Capacidade de utilização de fontes alternativas de carbono: <i>Kluyveromyces lactis</i> é capaz de utilizar uma variedade de fontes de carbono, incluindo lactose e galactose. Isso é particularmente vantajoso em aplicações industriais, onde substratos alternativos podem ser mais econômicos ou abundantes.</p>	<p>Produção de enzimas: <i>Kluyveromyces lactis</i> é uma plataforma eficaz para a produção de enzimas industriais devido à sua capacidade de expressar enzimas heterólogas em altos níveis. As enzimas produzidas por <i>Kluyveromyces lactis</i> são utilizadas em uma variedade de aplicações, incluindo diagnóstico, indústria alimentícia e farmacêutica.</p> <p>Engenharia de proteínas: <i>Kluyveromyces lactis</i> pode ser empregada na engenharia de proteínas para modificar e otimizar proteínas terapêuticas e enzimas para melhorar sua estabilidade, atividade e especificidade. Essa capacidade de engenharia de proteínas permite o desenvolvimento de medicamentos e produtos biotecnológicos mais eficazes e seguros.</p>

Fonte: autor

Em específico, a levedura *Pichia pastoris* já é frequentemente utilizada para a expressão heteróloga de proteínas recombinantes, devido ao fato de ser reconhecida por suas qualidades que a tornam um hospedeiro valioso na

biotecnologia. Ela possui a capacidade de crescer em meios de cultura simples e de secretar grandes quantidades de proteínas recombinantes com modificações pós-traducionais adequadas, fazendo dela uma escolha popular em aplicações industriais e de pesquisa (Vogl; Glieder, 2013). Além disso, a sua estrutura genética já é comumente conhecida e a sua capacidade de realizar modificações genéticas de forma relativamente simples, incluindo deleções e inserções específicas, contribuem para uma facilidade maior no seu manuseio genético (Karbalaei; Rezaee; Farsiani, 2020). Além disso, estudos recentes (Huang et al., 2019) têm explorado o potencial biotecnológico desta levedura com foco na engenharia metabólica para melhorar a sua produção de proteínas recombinantes, assim como a otimização de processos fermentativos para aumentar o rendimento e a qualidade do produto.

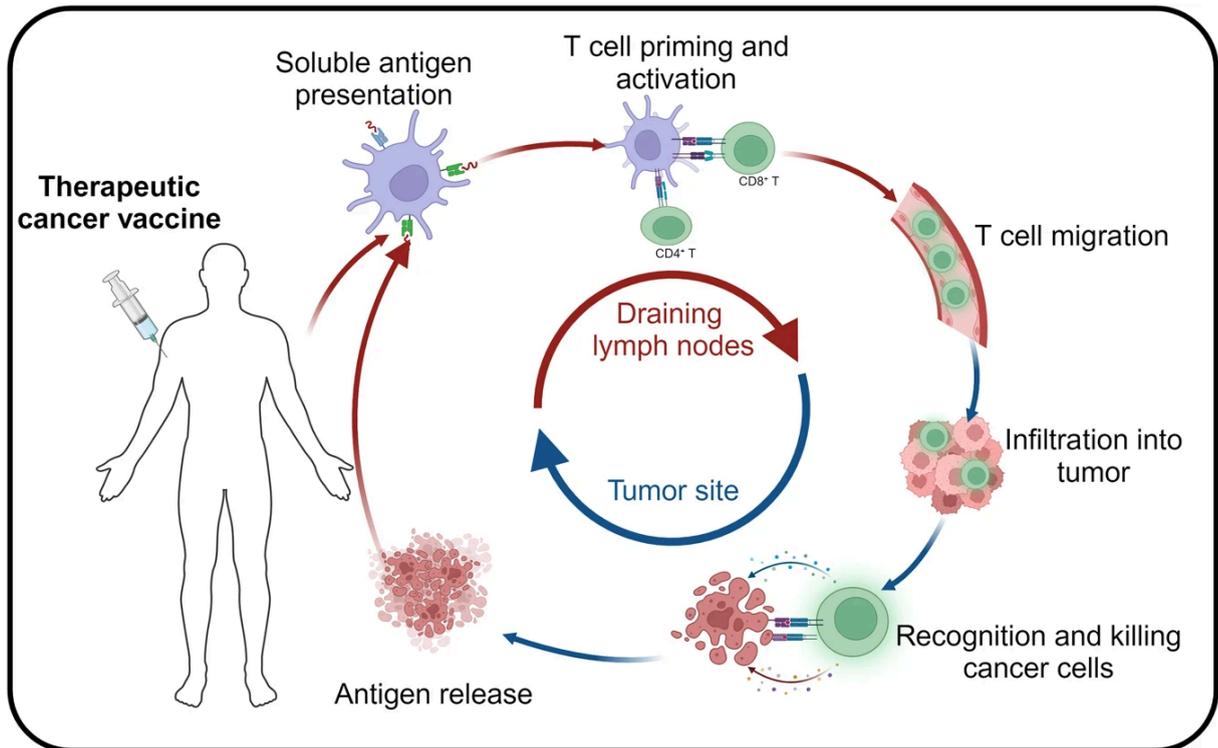
2. 2. 3. LEVEDURAS COMO CARREADORAS DE ANTÍGENOS

As leveduras apresentam propriedades imunoestimuladoras distintas que as tornam alvos de interesse na área de imunologia e biomedicina. Estudos têm demonstrado que componentes da parede celular de leveduras, como β -glucanos e manoproteínas, possuem atividades imunoestimuladoras significativas. Os β -glucanos, por exemplo, são capazes de ativar receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) no sistema imunológico, como os TLRs e os receptores de reconhecimento de β -glucanos (Dectin-1), desencadeando respostas imunes inatas, como a produção de citocinas pró-inflamatórias e a ativação de células fagocíticas, como macrófagos e neutrófilos (Brown; Gordon, 2001; Goodridge; Wolf; Underhill, 2009). Além disso, as leveduras também podem ser utilizadas como vetores vacinais, estimulando respostas imunológicas adaptativas contra antígenos expressos em sua superfície. Essas propriedades imunoestimuladoras das leveduras têm sido exploradas em diversas aplicações biotecnológicas, incluindo o desenvolvimento de vacinas, terapias imunológicas e adjuvantes para aprimorar a eficácia de tratamentos médicos (Santos et al., 2017). Leveduras, como a *Pichia pastoris* e a *Saccharomyces cerevisiae* são o foco de estudos recentes que têm explorado a capacidade das leveduras de expressar antígenos virais, bacterianos e parasitários, demonstrando seu potencial na indução de respostas imunológicas específicas e protetoras (Cregg et al., 2000).

A parede celular de levedura é uma estrutura complexa que desempenha um papel crucial na integridade e na função celular. Composta por uma matriz de polissacarídeos, lipídios e proteínas, a parede celular de levedura é caracterizada por sua resistência e capacidade de adaptação a diferentes condições ambientais. Os principais componentes da parede celular de levedura incluem β -glucanos, manoproteínas e quitina, que conferem rigidez e estabilidade à estrutura. Além disso, as manoproteínas presentes na parede celular desempenham um papel importante na adesão a superfícies e na interação com o ambiente circundante (Klis; Boorsma; De Groot, 2006).

O carregamento de antígenos é uma estratégia fundamental em imunologia e biotecnologia para apresentar antígenos de interesse ao sistema imunológico de forma eficaz, uma de suas formas pode ser visualizada na Figura 3. Esse processo envolve o uso de sistemas de entrega, como células hospedeiras, vetores virais, nanopartículas ou proteínas carreadoras, para transportar antígenos para células apresentadoras de antígenos, como células dendríticas, macrófagos ou linfócitos. Uma vez entregues às células apresentadoras de antígenos, os antígenos são processados e apresentados às células T, desencadeando respostas imunológicas adaptativas específicas contra patógenos, células cancerígenas ou outras ameaças. O carregamento de antígenos é amplamente explorado no desenvolvimento de vacinas, terapias imunológicas e tratamentos para doenças, visando estimular respostas imunológicas protetoras ou terapêuticas. Diversas estratégias de carregamento de antígenos têm sido desenvolvidas e otimizadas ao longo dos anos, com o objetivo de aumentar a eficácia e a segurança das intervenções imunológicas (Irvine et al., 2015; Moon; Huang; Irvine, 2012).

Figura 3: O mecanismo da vacina contra o câncer in vivo. Depois que os antígenos tumorais migram para o corpo em diferentes formas, eles são fagocitados, expressos intracelularmente e processados eficientemente por células apresentadoras de antígenos (APCs) especializadas. O complexo principal de histocompatibilidade (MHC) das células dendríticas apresenta antígenos em sua superfície, e os complexos MHC ativam as células T específicas do antígeno, ligando-se aos receptores de células T (TCR) na superfície das células T, portanto, de forma segura e persistente, e especificamente destruindo células tumorais e inibindo o crescimento tumoral.



Fonte: Fan et al., 2023

Existem diversos sistemas de carreamento de antígenos como é o caso das proteínas transportadoras, como toxinas modificadas ou proteínas de fusão, que podem ser conjugadas aos antígenos de interesse, melhorando sua estabilidade e imunogenicidade e facilitando sua internalização pelas células apresentadoras de antígenos (Lundstrom, 2020). Da mesma forma, ácidos nucleicos, como o DNA e o RNA, podem ser empregados para codificar antígenos específicos e induzir sua expressão intracelular após a administração. Vacinas baseadas em ácidos nucleicos oferecem vantagens significativas em termos de flexibilidade de design, facilidade de produção e potencial para induzir respostas imunes robustas tanto de células T quanto de células B (Pardi et al., 2018). Outra abordagem é o carreamento de antígenos de forma intracelular, onde os antígenos são direcionados para o interior de células hospedeiras, como células dendríticas, macrófagos ou linfócitos, para apresentação aos linfócitos T (Deng et al., 2016). Além disso, o carreamento de antígenos de forma ancorada, onde os antígenos são ancorados à superfície de células ou partículas, tem sido explorado como uma estratégia eficaz para a apresentação direta de antígenos às células do sistema imunológico (Arafiles et al., 2023; Li et al., 2021). As leveduras, como *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris*, possuem sistemas eficientes de expressão de proteínas e são capazes de

apresentar antígenos na sua superfície celular. Essa capacidade de exibir antígenos permite que as leveduras sejam utilizadas como plataformas versáteis para o desenvolvimento de vacinas e terapias imunológicas.

Ademais, pode-se acoplar IRES aos plasmídeos inseridos dentro dessas leveduras para produzir uma resposta mais complexa. Os Elementos Internos de Entrada Direta (IRES) são estruturas de RNA presentes em alguns vírus de RNA que permitem a tradução cap-independente de mRNAs eucarióticos. Esses elementos têm sido amplamente explorados na engenharia genética para a expressão coordenada de múltiplos genes a partir de um único transcrito, facilitando a produção de proteínas recombinantes em sistemas de expressão heteróloga. A utilização de IRES oferece diversas vantagens no contexto industrial, incluindo a simplificação do design de vetores de expressão e a produção mais eficiente de proteínas recombinantes. Embora originalmente identificadas em vírus, as sequências de IRES também foram encontradas em alguns organismos eucarióticos, ampliando seu potencial para aplicações biotecnológicas. A compreensão do funcionamento e da aplicação desses elementos tem impulsionado avanços significativos na produção industrial de proteínas de interesse biomédico e biotecnológico (Abdullah et al., 2023; Martínez-Salas et al., 2015).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Discutir a utilização de vacinas terapêuticas para tratamento de cânceres HPV-relacionados e analisar a viabilidade da utilização de células de leveduras como vetor vacinal através do método de ancoragem de antígenos na superfície celular.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar o uso de leveduras em abordagens vacinais para o HPV.
- Exemplificar a construção de um vetor de expressão vacinal em leveduras que permitam a ancoragem de antígenos na sua superfície celular.
- Elucidar o procedimento de ancoragem de antígenos na superfície de leveduras e suas aptidões na melhoria da estratégia vacinal.
- Apresentar a possibilidade de dupla ancoragem através do método de inserção de uma sequência IRES no vetor de expressão.

4 METODOLOGIA

Trata-se de uma revisão de literatura do tipo integrativa, utilizando as bases de dados: MEDLINE/PubMed, Google Scholar, ScienceDirect e Scientific Electronic Library Online (SciELO). A busca teve como palavras chaves: “HPV”, “Anchorage”, “IRES”, “Cancer” e “Yeasts”, com adaptações dependendo da base de dados e estratégia de combinação das palavras chaves para ampliação da busca por material.

Definiu-se como pergunta norteadora: seria viável a aplicação de leveduras completas utilizando o sistema de ancoragem de antígenos como alternativa de tratamento imunoterápico em pacientes com câncer HPV-relacionados?

A fim de avaliar a estratégia e relação dos principais estudos clínicos sobre a produção de vacinas para o HPV e utilizando leveduras, foram aplicados os seguintes filtros: *Yeast Vaccines*, *Cell Therapy* e *HPV-related cancers*. Os estudos identificados foram importados para a biblioteca do Zotero.

Foram incluídos elementos tendo inglês e português como idiomas e que tratassem de aspectos relacionados à utilização de leveduras completas no processo de produção vacinal para tratamento de cânceres-HPV relacionados, a metodologia de ancoragem de antígenos nas paredes dos microrganismos, análises de estratégias vacinais e sobre a possível utilização de estruturas IRES na construção de um vetor de expressão.

Foram excluídos artigos duplicatas, resumos publicados em eventos científicos, trabalhos de conclusão de curso, teses, dissertações, artigos que não abordassem sobre a temática em questão. Após a leitura e aplicação dos critérios de seleção adotados, restaram 88 artigos para serem utilizados nesta revisão.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As tecnologias envolvendo os mecanismos de vacinação estão sempre em desenvolvimento e são um foco de diversas pesquisas na área de saúde. Devido a isso, atualmente existem diversos sistemas e metodologias que podem ser utilizadas para o desenvolvimento de estratégias vacinais e que abrem espaço para inovações dentro desse ramo, sejam essas inovações de forma a simplificar o processo de produção vacinal, diminuir seu custo ou otimizar a apresentação dos antígenos para o sistema imunológico. Dentre esses, as vacinas terapêuticas atraem uma atenção especial quando se fala de metodologia paralela ao tratamento de cânceres.

O tratamento de cânceres HPV-relacionados abrange uma variedade de abordagens terapêuticas que visam eliminar as células tumorais infectadas pelo papilomavírus humano (HPV) e prevenir a recorrência da doença. As opções terapêuticas comuns incluem cirurgia, radioterapia e quimioterapia, muitas vezes utilizadas em combinação para melhorar os resultados clínicos (Chaturvedi et al., 2011). A cirurgia é frequentemente realizada para remover o tumor primário e os linfonodos regionais afetados, especialmente em estágios iniciais da doença. A radioterapia, por outro lado, utiliza radiação ionizante para destruir células cancerígenas e é frequentemente empregada em cânceres HPV-relacionados, como os cânceres de colo do útero e de orofaringe (Chera; Amdur, 2018). Além disso, a quimioterapia pode ser administrada antes ou após a cirurgia e/ou radioterapia para eliminar células cancerígenas remanescentes e reduzir o risco de recorrência da doença (Burmeister et al., 2022).

Recentemente, terapias imunológicas, como as vacinas terapêuticas e a terapia com inibidores de checkpoint imunológico, têm sido exploradas como opções de tratamento promissoras para cânceres HPV-relacionados, visando estimular o sistema imunológico do paciente a reconhecer e combater as células tumorais (Yang et al., 2017). Essas vacinas são projetadas para estimular uma resposta imune adaptativa contra antígenos específicos associados ao HPV, como as proteínas E6 e E7, que são expressas de forma persistente nas células tumorais (Rosales, 2014). Ao induzir uma resposta imune direcionada contra esses antígenos, as vacinas terapêuticas têm o potencial de eliminar seletivamente as células tumorais, retardar o crescimento do tumor e prevenir a recorrência da doença (Yang et al., 2017). Estudos pré-clínicos e clínicos têm demonstrado a eficácia das vacinas terapêuticas

HPV-associadas na indução de respostas imunes específicas e na melhoria dos resultados clínicos em pacientes com cânceres HPV-relacionados, como os cânceres de colo do útero e de orofaringe (Chera; Amdur, 2018; Yang et al., 2017). Essas vacinas representam uma abordagem terapêutica inovadora e específica, que pode complementar ou até mesmo substituir as modalidades de tratamento convencionais, como cirurgia, radioterapia e quimioterapia, oferecendo uma opção de tratamento mais eficaz e com menos efeitos colaterais para os pacientes.

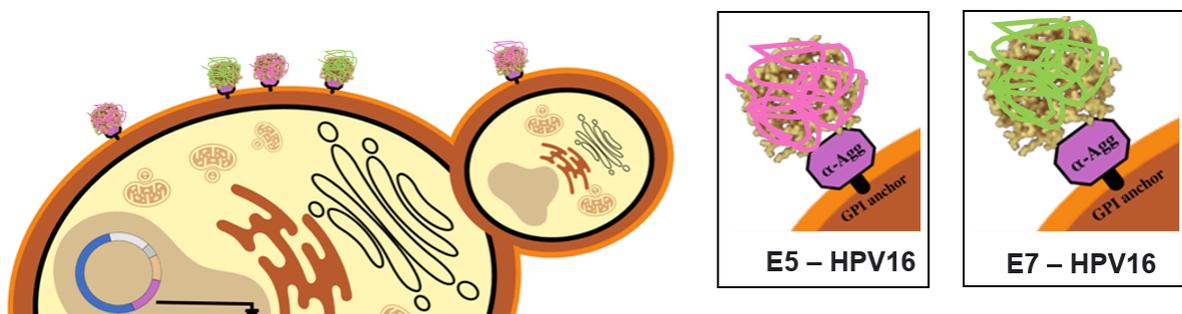
Os vetores vacinais desempenham um papel crucial no desenvolvimento de vacinas eficazes contra uma variedade de patógenos, incluindo vírus, bactérias e parasitas. Esses vetores são sistemas de entrega projetados para transportar e apresentar antígenos específicos ao sistema imunológico, desencadeando uma resposta imune protetora. Uma ampla gama de vetores vacinais tem sido explorada, incluindo vírus atenuados, vírus replicativos recombinantes, vetores virais não replicativos, bactérias atenuadas e nanopartículas sintéticas (Kim et al., 2021). Os vetores virais, como adenovírus, poxvírus e vírus do sarampo, são frequentemente utilizados devido à sua capacidade intrínseca de infectar células hospedeiras e expressar antígenos estranhos de forma eficaz. Além disso, os vetores bacterianos, como *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG), têm sido amplamente empregados em vacinas contra doenças como tuberculose e cólera. Recentemente, nanopartículas sintéticas têm ganhado destaque como vetores vacinais devido à sua capacidade de entregar antígenos de maneira precisa e controlada, além de sua versatilidade de projeto (Ferrari, 2010).

Microrganismos como leveduras podem ser modificados para expressar antígenos de interesse, os quais são então apresentados às células do sistema imunológico, desencadeando uma resposta imune adaptativa. Além disso, a facilidade de produção em larga escala e o baixo custo tornam as vacinas baseadas em leveduras uma opção atraente para países em desenvolvimento e regiões com recursos limitados (Karabalaee; Rezaee; Farsiani, 2020). No entanto, desafios como a estabilidade dos antígenos expressos, a eficiência de entrega e a segurança ainda precisam ser abordados para otimizar o uso de leveduras como vetores vacinais.

A ancoragem de antígenos pode melhorar a eficácia da resposta imune, promovendo a captação pelas células apresentadoras de antígenos e a ativação de linfócitos específicos (Silva et al., 2023). Estudos têm demonstrado o sucesso desta abordagem em várias aplicações além de seu uso em leveduras, incluindo o

desenvolvimento de vacinas contra doenças infecciosas, câncer e alergias, bem como terapias imunológicas para distúrbios autoimunes e inflamatórios (Isticato et al., 2001; Li et al., 2022; Niu et al., 2015; Pfaar et al., 2018). Esta técnica envolve a fusão de antígenos de interesse a proteínas de superfície de leveduras, tais como a proteína de superfície A (Ag α 1p) de *Saccharomyces cerevisiae* ou proteínas de ancoragem da membrana de *Pichia pastoris*. A exposição dos antígenos na superfície celular das leveduras facilita a sua captação por células apresentadoras de antígenos, tais como células dendríticas e macrófagos, promovendo a ativação de células T e a produção de anticorpos específicos (Kumar; Kumar, 2019). Estudos têm demonstrado a eficácia desta abordagem em várias aplicações, incluindo o desenvolvimento de vacinas terapêuticas contra doenças infecciosas e câncer, bem como na engenharia de leveduras probióticas para a entrega de antígenos intestinais (Zhang et al., 2022), como elucidado na Figura 4.

Figura 4 - Esquemática da ancoragem de antígenos em uma parede celular de levedura, como pode ser observado no painel A, na parte esquerda. No painel B, é apresentada uma aproximação para que se possa observar como é estruturado o “gancho” utilizado para conectar o antígeno à parede celular.



Fonte: Autor

A utilização da parede celular de levedura como plataforma vacinal apresenta diversas vantagens. Em primeiro lugar, as leveduras são organismos seguros e não patogênicos, o que minimiza o risco de efeitos adversos em humanos. Além disso, as leveduras, como *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris*, são capazes de expressar e apresentar antígenos invasores de forma eficaz às células do sistema imunológico, desencadeando uma resposta imune adaptativa. Isso se deve à capacidade das leveduras de processar e apresentar antígenos de maneira semelhante às células apresentadoras de antígenos do sistema imunológico (Boder; Wittrup, 1997).

Em adição, a utilização de dupla ancoragem em leveduras representa uma estratégia inovadora para o desenvolvimento de esquemas vacinais de tratamento para cânceres. Essa abordagem envolve a expressão de antígenos tumorais em leveduras por meio de duas formas de ancoragem: a primeira ancoragem é direcionada à parede celular da levedura, enquanto a segunda ancoragem é direcionada à membrana plasmática. Essa dupla ancoragem permite que os antígenos tumorais sejam apresentados de maneira eficaz às células do sistema imunológico, desencadeando uma resposta imune adaptativa direcionada contra as células cancerosas. Estudos têm demonstrado que essa estratégia pode melhorar a eficácia das vacinas terapêuticas contra o câncer, promovendo uma resposta imune mais robusta e duradoura (Teymennet-Ramírez et al., 2022; Tran et al., 2009).

Existem diversas estratégias para ancorar mais de um antígeno na parede celular de leveduras, visando a criação de vacinas multivalentes ou terapias imunológicas mais eficazes. Uma abordagem comum envolve a fusão dos antígenos de interesse a proteínas de ancoragem específicas da parede celular, como a proteína Ag α 1p de *Saccharomyces cerevisiae* ou proteínas de ancoragem da membrana de *Pichia pastoris*. Essa fusão permite que os antígenos sejam apresentados na superfície da levedura de forma estável e acessível ao sistema imunológico. Outra estratégia consiste na utilização de sistemas de ancoragem heterólogos, nos quais os antígenos são ancorados à parede celular de microrganismos como vírus, bactérias ou leveduras por meio de proteínas ou domínios de ancoragem provenientes de organismos diferentes, como bactérias ou fungos (Jacobs et al., 2009).

A utilização de elementos de resposta a IRES tem sido uma estratégia valiosa para permitir a coexpressão de antígenos em vetores de expressão. Os elementos de IRES são sequências de RNA que permitem o recrutamento direto de ribossomos através do RNA mensageiro (mRNA), permitindo assim a tradução cap-independent de múltiplos transcritos a partir de uma única molécula de mRNA. Os IRES são predominantemente oriundos de vírus de RNA de fita positiva, principalmente os vírus pertencentes às famílias Picornaviridae e Flaviviridae. Por exemplo, os IRES mais bem caracterizados foram identificados em vírus como o vírus da poliomielite, o vírus da hepatite C, o vírus da encefalomiocardite e o vírus da coriomeningite linfocítica (Hellen; Sarnow, 2001; Malygin et al., 2013). Embora a maioria dos IRES conhecidos tenha sido identificada em vírus de RNA, também foram descobertos

IRES em RNA bacteriano e até mesmo em genes celulares eucarióticos (Colussi et al., 2015). No entanto, a maioria dos estudos e aplicações atuais dos IRES se concentra nos IRES de origem viral devido à sua eficácia e versatilidade em sistemas de expressão heteróloga.

Essa capacidade de coexpressar múltiplos genes a partir de um único vetor oferece uma vantagem significativa na construção de vacinas e terapias gênicas, permitindo a apresentação eficiente de múltiplos antígenos e a indução de uma resposta imune mais ampla e específica. Estudos têm demonstrado a eficácia dos elementos de IRES em permitir a coexpressão de antígenos em uma variedade de sistemas de expressão, incluindo sistemas baseados em vírus, bactérias e leveduras (Jangra; Yi; Lemon, 2010; Niu; Wu; Lian, 2023). Portanto, a utilização de elementos de IRES representa uma estratégia promissora no desenvolvimento de vacinas e terapias gênicas que requerem a coexpressão de múltiplos antígenos; a Tabela 4 apresenta os principais IRES explorados pela biociência.

Tabela 4 - Elucidação das principais IRES utilizadas atualmente pesquisadas sobre seu uso em leveduras e seus respectivos vírus de origem.

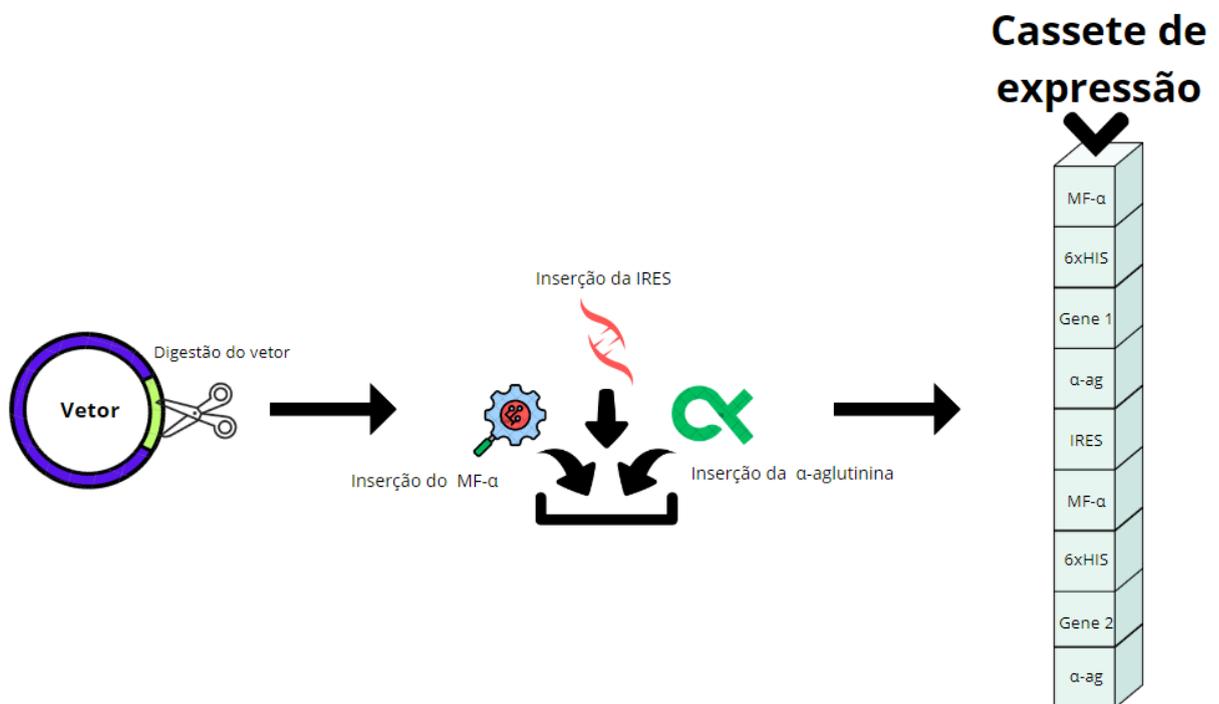
IRES	Origem
TEV	Vírus do Tabaco
PVY	Vírus Y da Batata
TRV-IGR	Triatoma virus
crTMV	Vírus do Mosaico do Tabaco
RhPV	Vírus da Coriomeningite Linfocítica
KSHV	Herpesvírus Associado ao Sarcoma de Kaposi

Fonte: Adaptado de Huang et al., 2019

A Figura 5 apresenta a metodologia proposta para a construção de um esquema de vetor de expressão englobando essas características. Essa metodologia é separada em clonagem dos genes alvo e construção do cassete de expressão, os quais juntos vão formar o vetor de expressão que será inserido dentro da levedura. Em primeira instância deve-se escolher, isolar e clonar os genes que irão ser utilizados na produção vacinal, precisam ser genes capazes de gerar uma resposta imune e que estejam interligados com o processo de carcinogênese, ao

exemplo dos oncogenes E5, E6 e E7. Após essa etapa, o foco se voltará na construção de um vetor de expressão adequado para a estratégia escolhida, ou seja, que seja capaz de produzir ancoragem de antígenos virais na superfície da parede celular da levedura, essa ancoragem é possível devido a inserção no vetor do gene responsável pela produção de proteínas da parede celular, como a α -Aglutinina, uma proteína natural produzida por algumas leveduras responsável por gerar adesão e agregação de estruturas no microrganismo (Zhao et al., 2001). Ademais, se faz necessário a presença de um gene capaz de permitir a liberação das proteínas recombinantes para que elas sejam levadas para a parede celular e expostas a partir da fusão com a α -Aglutinina. Para isso, pode-se usar um gene codificador de sinal como o MF- α , uma proteína capaz de desencadear uma cascata de eventos de sinalização resultando numa secreção de proteínas (Silva et al., 2021). A estrutura final desse cassete de expressão pode ser visualizada na Figura 5.

Figura 5 - Esquematização do processo de construção do cassete de expressão



Fonte: Autor

Esta abordagem envolve a expressão e exibição simultânea de múltiplos antígenos na superfície celular ou na parede celular de leveduras, potencializando a resposta imunológica contra diferentes patógenos ou variantes antigênicas de um

mesmo patógeno. Ao combinar antígenos com diferentes alvos ou funções específicas, como proteínas virais de diferentes cepas ou epítomos de um mesmo patógeno, a dupla ancoragem permite a indução de uma resposta imunológica mais ampla e diversificada. Além disso, essa estratégia pode melhorar a estabilidade e a integridade estrutural dos antígenos na superfície da levedura, aumentando sua imunogenicidade, uma vez que sua exposição na superfície da levedura confere uma matriz tridimensional que protege contra a degradação e aumenta a imunogenicidade. Estudos recentes têm explorado a viabilidade e os benefícios da dupla ancoragem de antígenos em leveduras, destacando seu potencial para o desenvolvimento de vacinas mais eficazes e versáteis (Cai et al., 2017; Lim et al., 2017; Wang et al., 2016).

6 CONCLUSÃO

As leveduras possuem um bom histórico de uso quanto a construção a expressão de proteínas recombinantes, assim como tem seu uso construção de estratégias vacinais profiláticas. Através de pesquisas mais profundas quanto ao seu papel no incentivo da resposta imunológica e aplicabilidade na indústria vacinal, as leveduras passaram de ser somente utilizadas de forma incompleta, na construção de cápsulas de entrega e produção de biomassa, para serem utilizadas como uma estrutura completa, o que diminui os custos de purificação e edição da estrutura do microrganismo, possibilitando um maior barateamento no custo geral da produção vacinal, permitindo vacinas mais acessíveis para países em desenvolvimento como o Brasil. Todavia, se faz necessário pesquisas mais aprofundadas sobre a capacidade de aumentar as proteínas secretadas pelas leveduras, aumentando mais ainda o seu valor em produção em larga escala. Além disso, também se faz necessário uma melhora na capacidade das mesmas de produzir proteínas mais complexas e maiores.

A construção de um vetor de expressão que se utiliza de dupla ancoragem para a exibição de oncogenes diferentes na superfície celular de leveduras se mostra uma ideia viável e capaz de gerar uma resposta imune mais complexa e potente, permitindo que o corpo produza uma estratégia de defesa que engloba mais de um dos procedimentos carcinogênicos do HPV, reduzindo a chance de produção de células com defeitos genéticos ao mesmo tempo que combate a “homeostase” cancerígena e a evasão imunológica conferida às células infectadas pelo vírus.

Por fim, essa estruturação vacinal de dupla ancoragem em células de leveduras inteiras abre parâmetros não somente para seu uso contra o vírus HPV como também gera a possibilidade de seu uso terapêutico para outros tipos de cânceres e infecções ocasionadas por diversos outros microrganismos.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, M. et al. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 12, p. 5301–5317, jun. 2014.
- ANNA SZYMONOWICZ, K.; CHEN, J. Biological and clinical aspects of HPV-related cancers. **Cancer Biology and Medicine**, v. 17, n. 4, p. 864–878, 2020.
- ARAFILES, J. V. V. et al. Cell-Surface-Retained Peptide Additives for the Cytosolic Delivery of Functional Proteins. **Journal of the American Chemical Society**, p. jacs.3c05365, 31 out. 2023.
- BAGARAZZI, M. L. et al. Immunotherapy Against HPV16/18 Generates Potent T_H 1 and Cytotoxic Cellular Immune Responses. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 155, 10 out. 2012.
- BARNETT, J. A. A history of research on yeasts 10: foundations of yeast genetics ¹. **Yeast**, v. 24, n. 10, p. 799–845, out. 2007.
- BODER, E. T.; WITTRUP, K. D. Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. **Nature Biotechnology**, v. 15, n. 6, p. 553–557, jun. 1997a.
- BROWN, G. D.; GORDON, S. A new receptor for β -glucans. **Nature**, v. 413, n. 6851, p. 36–37, set. 2001.
- BURMEISTER, C. A. et al. Cervical cancer therapies: Current challenges and future perspectives. **Tumour Virus Research**, v. 13, p. 200238, jun. 2022.
- CAI, H. et al. Co-expression of lipase isozymes for enhanced expression in *Pichia pastoris*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 65, n. 4, p. 335–342, out. 2017.
- CAPILLA, J. et al. *Saccharomyces cerevisiae* as a vaccine against coccidioidomycosis. **Vaccine**, v. 27, n. 27, p. 3662–3668, jun. 2009.
- CASTRO, T. P. P. G.; BUSSOLOTI FILHO, I. Prevalência do papilomavírus humano (HPV) na cavidade oral e na orofaringe. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 72, n. 2, p. 272–282, abr. 2006.
- CHERA, B. S.; AMDUR, R. J. Current Status and Future Directions of Treatment Deintensification in Human Papilloma Virus-associated Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. **Seminars in Radiation Oncology**, v. 28, n. 1, p. 27–34, jan. 2018.

- CHATURVEDI, A. K. et al. Human Papillomavirus and Rising Oropharyngeal Cancer Incidence in the United States. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 32, p. 4294–4301, 10 nov. 2011.
- COHEN, P. A. et al. Cervical cancer. **The Lancet**, v. 393, n. 10167, p. 169–182, jan. 2019.
- COLUSSI, T. M. et al. Initiation of translation in bacteria by a structured eukaryotic IRES RNA. **Nature**, v. 519, n. 7541, p. 110–113, 5 mar. 2015.
- CREGG, J. M. et al. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. **Molecular Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 23–52, set. 2000.
- DE SÁ MAGALHÃES, S.; KESHAVARZ-MOORE, E. *Pichia pastoris* (Komagataella phaffii) as a Cost-Effective Tool for Vaccine Production for Low- and Middle-Income Countries (LMICs). **Bioengineering**, v. 8, n. 9, p. 119, 31 ago. 2021.
- DELLA FERA, A. N. et al. Persistent Human Papillomavirus Infection. **Viruses**, v. 13, n. 2, p. 321, 20 fev. 2021.
- DENG, Z. et al. Engineering Intracellular Delivery Nanocarriers and Nanoreactors from Oxidation-Responsive Polymersomes via Synchronized Bilayer Cross-Linking and Permeabilizing Inside Live Cells. **Journal of the American Chemical Society**, v. 138, n. 33, p. 10452–10466, 24 ago. 2016.
- DERCHAIN, S. F. M.; SARIAN, L. O. Z. Vacinas profiláticas para o HPV. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 29, n. 6, jun. 2007.
- DIMAIO, D.; MATTOON, D. Mechanisms of cell transformation by papillomavirus E5 proteins. **Oncogene**, v. 20, n. 54, p. 7866–7873, 26 nov. 2001.
- DIMAIO, D.; PETTI, L. M. The E5 proteins. **Virology**, v. 445, n. 1–2, p. 99–114, out. 2013.
- ESTÊVÃO, D. et al. Hallmarks of HPV carcinogenesis: The role of E6, E7 and E5 oncoproteins in cellular malignancy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1862, n. 2, p. 153–162, fev. 2019.
- FAN, T. et al. Therapeutic cancer vaccines: advancements, challenges, and prospects. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 8, n. 1, p. 450, 13 dez. 2023.

FERRARI, M. Frontiers in cancer nanomedicine: directing mass transport through biological barriers. **Trends in Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 181–188, abr. 2010.

GAI, S. A.; WITTRUP, K. D. Yeast surface display for protein engineering and characterization. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 17, n. 4, p. 467–473, ago. 2007.

GALAO, R. P. et al. *Saccharomyces cerevisiae*: a versatile eukaryotic system in virology. **Microbial Cell Factories**, v. 6, n. 1, p. 32, out. 2007.

GAMBOA-HOIL, S. I. Human papillomavirus in men. **Revista Internacional de Andrología**, v. 21, n. 1, p. 100325, jan. 2023.

GIBSON, B. R. et al. Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling: Figure 1. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 31, n. 5, p. 535–569, set. 2007.

GOODRIDGE, H. S.; WOLF, A. J.; UNDERHILL, D. M. β -glucan recognition by the innate immune system. **Immunological Reviews**, v. 230, n. 1, p. 38–50, jul. 2009.

HEBNER, C. M.; LAIMINS, L. A. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. **Reviews in Medical Virology**, v. 16, n. 2, p. 83–97, mar. 2006.

HELLEN, C. U. T.; SARNOW, P. Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. **Genes & Development**, v. 15, n. 13, p. 1593–1612, 1 jul. 2001.

HOPPE-SEYLER, K. et al. The HPV E6/E7 Oncogenes: Key Factors for Viral Carcinogenesis and Therapeutic Targets. **Trends in Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 158–168, fev. 2018.

HUANG, Y. et al. Screening for functional IRESes using α -complementation system of β -galactosidase in *Pichia pastoris*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, n. 1, p. 300, dez. 2019.

IRVINE, D. J. et al. Synthetic Nanoparticles for Vaccines and Immunotherapy. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 19, p. 11109–11146, 14 out. 2015.

ISTICATO, R. et al. Surface Display of Recombinant Proteins on *Bacillus subtilis* Spores. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 21, p. 6294–6301, nov. 2001.

IZDA, V.; JEFFRIES, M. A.; SAWALHA, A. H. COVID-19: A review of therapeutic strategies and vaccine candidates. **Clinical Immunology**, v. 222, p. 108634, jan. 2021.

JACOBS, P. P. et al. Engineering complex-type N-glycosylation in *Pichia pastoris* using GlycoSwitch technology. **Nature Protocols**, v. 4, n. 1, p. 58–70, jan. 2009.

JANGRA, R. K.; YI, M.; LEMON, S. M. Regulation of Hepatitis C Virus Translation and Infectious Virus Production by the MicroRNA miR-122. **Journal of Virology**, v. 84, n. 13, p. 6615–6625, jul. 2010.

KARBALAEI, M.; REZAEI, S. A.; FARSIANI, H. *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. **Journal of Cellular Physiology**, v. 235, n. 9, p. 5867–5881, set. 2020.

KIM, D. et al. Advances in vaccine delivery systems against viral infectious diseases. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 11, n. 4, p. 1401–1419, ago. 2021.

KLIS, F. M.; BOORSMA, A.; DE GROOT, P. W. J. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 23, n. 3, p. 185–202, fev. 2006.

KUMAR, R.; KUMAR, P. Yeast-based vaccines: New perspective in vaccine development and application. **FEMS Yeast Research**, v. 19, n. 2, 1 mar. 2019.

LI, L. et al. Mucosal IgA response elicited by intranasal immunization of *Lactobacillus plantarum* expressing surface-displayed RBD protein of SARS-CoV-2. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 190, p. 409–416, nov. 2021.

LI, Y. et al. Rapid Surface Display of mRNA Antigens by Bacteria-Derived Outer Membrane Vesicles for a Personalized Tumor Vaccine. **Advanced Materials**, v. 34, n. 20, p. 2109984, maio 2022.

LIM, S. et al. Dual display of proteins on the yeast cell surface simplifies quantification of binding interactions and enzymatic bioconjugation reactions. **Biotechnology Journal**, v. 12, n. 5, p. 1600696, maio 2017.

LIN, C.; FRANCESCHI, S.; CLIFFORD, G. M. Human papillomavirus types from infection to cancer in the anus, according to sex and HIV status: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 2, p. 198–206, fev. 2018.

LUNDSTROM, K. Self-Amplifying RNA Viruses as RNA Vaccines. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 14, p. 5130, 20 jul. 2020.

MALYGIN, A. A. et al. HCV IRES interacts with the 18S rRNA to activate the 40S ribosome for subsequent steps of translation initiation. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 18, p. 8706–8714, 1 out. 2013.

MANZO-MERINO, J. et al. HPV E6 oncoprotein as a potential therapeutic target in HPV related cancers. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 17, n. 11, p. 1357–1368, nov. 2013.

MASSARELLI, E. et al. Combining Immune Checkpoint Blockade and Tumor-Specific Vaccine for Patients With Incurable Human Papillomavirus 16–Related Cancer: A Phase 2 Clinical Trial. **JAMA Oncology**, v. 5, n. 1, p. 67, 1 jan. 2019.

MATTANOVICH, D. et al. Recombinant Protein Production in Yeasts. Em: LORENCE, A. (Ed.). **Recombinant Gene Expression**. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press, 2012. v. 824p. 329–358.

MCLAUGHLIN-DRUBIN, M. E.; MÜNGER, K. The human papillomavirus E7 oncoprotein. **Virology**, v. 384, n. 2, p. 335–344, fev. 2009.

MOON, J. J.; HUANG, B.; IRVINE, D. J. Engineering Nano- and Microparticles to Tune Immunity. **Advanced Materials**, v. 24, n. 28, p. 3724–3746, 24 jul. 2012.

MORSE, M. A.; GWIN, W. R.; MITCHELL, D. A. Vaccine Therapies for Cancer: Then and Now. **Targeted Oncology**, v. 16, n. 2, p. 121–152, mar. 2021.

MÜNGER, K. et al. Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. **Oncogene**, v. 20, n. 54, p. 7888–7898, 26 nov. 2001.

MUÑOZ, N. et al. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 6, p. 518–527, 6 fev. 2003.

NIU, D.; WU, Y.; LIAN, J. Circular RNA vaccine in disease prevention and treatment. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 8, n. 1, p. 341, 11 set. 2023.

NIU, M. et al. Engineering Bacterial Surface Displayed Human Norovirus Capsid Proteins: A Novel System to Explore Interaction Between Norovirus and Ligands. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 22 dez. 2015.

NÓVOA, T. D'AVILA et al. Cobertura vacinal do programa nacional de imunizações (PNI). **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 4, p. 7863–7873, 2020.

OBSTETRÍCIA, F. B. DAS A. DE G. E (ED.). **Programa Vacinal para Mulheres**. 2. ed. São Paulo, SP: Febrasgo, 2021.

OKUNADE, K. S. Human papillomavirus and cervical cancer. **Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 40, n. 5, p. 602–608, 3 jul. 2020.

PARDI, N. et al. mRNA vaccines — a new era in vaccinology. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 17, n. 4, p. 261–279, abr. 2018.

PFAAR, O. et al. Clinical trials in allergen immunotherapy: current concepts and future needs. **Allergy**, v. 73, n. 9, p. 1775–1783, set. 2018.

RARAN-KURUSSI, S.; WAUGH, D. S. Expression and Purification of Recombinant Proteins in Escherichia coli with a His6 or Dual His6-MBP Tag. Em: WLODAWER, A.;

ROMAN, B. R.; ARAGONES, A. Epidemiology and incidence of HPV-related cancers of the head and neck. **Journal of Surgical Oncology**, v. 124, n. 6, p. 920–922, nov. 2021.

ROSALES, R. Immune therapy for human papillomaviruses-related cancers. **World Journal of Clinical Oncology**, v. 5, n. 5, p. 1002, 2014.

ROSS, J. D. R. **Da história a infecção em grupos minoritários: variedades de um fardo global chamado HPV**. 1. ed. [s.l.] Atena Editora, 2023.

SANTOS, P. M.; BUTTERFIELD, L. H. Dendritic Cell–Based Cancer Vaccines. **The Journal of Immunology**, v. 200, n. 2, p. 443–449, 15 jan. 2018.

SILVA, A. J. D. et al. Advancing Immunotherapies for HPV-Related Cancers: Exploring Novel Vaccine Strategies and the Influence of Tumor Microenvironment. **Vaccines**, v. 11, n. 8, p. 1354, 11 ago. 2023.

SILVA, A. J. D. et al. Whole Yeast Vaccine Displaying ZIKV B and T Cell Epitopes Induces Cellular Immune Responses in the Murine Model. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 7, p. 1898, 6 jul. 2023.

SILVA, A. J. D. et al. Pichia pastoris displaying ZIKV protein epitopes from the Envelope and NS1 induce in vitro immune activation. **Vaccine**, v. 39, n. 18, p. 2545–2554, abr. 2021.

- SCHILLER, J. T.; DAY, P. M.; KINES, R. C. Current understanding of the mechanism of HPV infection. **Gynecologic Oncology**, v. 118, n. 1, p. S12–S17, jun. 2010.
- TANG, J. et al. Therapeutic DNA Vaccines against HPV-Related Malignancies: Promising Leads from Clinical Trials. **Viruses**, v. 14, n. 2, p. 239, 25 jan. 2022.
- TEYMENNET-RAMÍREZ, K. V.; MARTÍNEZ-MORALES, F.; TREJO-HERNÁNDEZ, M. R. Yeast Surface Display System: Strategies for Improvement and Biotechnological Applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, p. 794742, 10 jan. 2022.
- TRAN, M. et al. Synthesis and assembly of a full-length human monoclonal antibody in algal chloroplasts. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 104, n. 4, p. 663–673, nov. 2009.
- TRIMBLE, C. L.; FRAZER, I. H. Development of therapeutic HPV vaccines. **The Lancet Oncology**, v. 10, n. 10, p. 975–980, out. 2009.
- TRIPATHI, N. K.; SHRIVASTAVA, A. Recent Developments in Recombinant Protein–Based Dengue Vaccines. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 1919, 23 ago. 2018.
- VENUTI, A. et al. Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions. **Molecular Cancer**, v. 10, n. 1, p. 140, dez. 2011.
- VOGL, T.; GLIEDER, A. Regulation of *Pichia pastoris* promoters and its consequences for protein production. **New Biotechnology**, v. 30, n. 4, p. 385–404, maio 2013.
- WANG, X. et al. EV71 virus-like particles produced by co-expression of capsid proteins in yeast cells elicit humoral protective response against EV71 lethal challenge. **BMC Research Notes**, v. 9, n. 1, p. 42, dez. 2016.
- WANSLEY, E. K. et al. Vaccination with a Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Expressing a Tumor Antigen Breaks Immune Tolerance and Elicits Therapeutic Antitumor Responses. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 13, p. 4316–4325, 1 jul. 2008.
- WENDLAND, E. M. et al. POP-Brazil study protocol: a nationwide cross-sectional evaluation of the prevalence and genotype distribution of human papillomavirus (HPV) in Brazil. **BMJ Open**, v. 8, n. 6, p. e021170, jun. 2018.

WITCHEY, D. J. et al. Plantar Warts: Epidemiology, Pathophysiology, and Clinical Management. **The Journal of the American Osteopathic Association**, v. 118, n. 2, p. 92, 1 fev. 2018.

XU, S. et al. mRNA Vaccine Era—Mechanisms, Drug Platform and Clinical Prospection. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 18, p. 6582, 9 set. 2020.

YAN, N. et al. Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* serves as novel carrier for oral DNA vaccines in *Carassius auratus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 47, n. 2, p. 758–765, dez. 2015.

YANG, A. et al. The current state of therapeutic and T cell-based vaccines against human papillomaviruses. **Virus Research**, v. 231, p. 148–165, mar. 2017.

YOUSEFI, Z. et al. An Update on Human Papilloma Virus Vaccines: History, Types, Protection, and Efficacy. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 805695, 27 jan. 2022.

ZARDO, G. P. et al. Vacina como agente de imunização contra o HPV. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 19, n. 9, p. 3799–3808, set. 2014.

ZHANG, C. et al. *Saccharomyces cerevisiae* cell surface display technology: Strategies for improvement and applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, p. 1056804, 7 dez. 2022.

ZHAO, H. et al. Interaction of α -Agglutinin and α -Agglutinin, *Saccharomyces cerevisiae* Sexual Cell Adhesion Molecules. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 9, p. 2874–2880, maio 2001.