

NATIELY SILVA SALES

**EFEITOS DA ELETROPORAÇÃO *IN VIVO* NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA
INDUZIDA POR UMA VACINA DE DNA CONTRA TUMORES INDUZIDOS POR
HPV-16**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2015

NATIELY SILVA SALES

**EFEITOS DA ELETROPORAÇÃO *IN VIVO* NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA
INDUZIDA POR UMA VACINA DE DNA CONTRA TUMORES INDUZIDOS POR
HPV-16**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira

Versão original

São Paulo
2015

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

reprodução não autorizada pelo autor

Sales, Natiely Silva.

Efeitos da eletroporação *in vivo* na resposta imunológica induzida por uma vacina de DNA contra tumores induzidos por HPV-16 / Natiely Silva Sales. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Luis Carlos de Souza Ferreira.

(Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Imunoterapia.

Versão do título para o inglês: Effects of the *in vivo* electroporation in the induced immune response by DNA vaccine against induced tumors by HPV-16.

1. Câncer cervical 2. HPV 3. Vacinas de DNA 4. Eletroporação I. Ferreira, Prof. Dr. Luis Carlos de Souza II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB0158/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Natiely Silva Sales.

Título da Dissertação: Efeitos da eletroporação *in vivo* na resposta imunológica induzida por uma vacina de DNA contra tumores induzidos por HPV-16.

Orientador(a): Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira.

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

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **046** nas fls. **05** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Rita de Cássia Café Ferreira**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Efeitos da eletroporação in vivo na resposta imunológica induzida por uma vacina de DNA contra tumores induzidos por HPV*" do qual participam o(s) aluno(s), **Natiely Silva Sales, Mariana de Oliveira Diniz**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **02.05.2013, com validade de 4 anos.**

São Paulo, 9 de maio de 2013.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA - ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEPESH. 080/2015.

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 046/2013/CEUA, aprovado em 02/05/2013 e com projeto intitulado: "*Efeitos da eletroporação in vivo na resposta imunológica induzida por uma vacina de DNA contra tumores induzidos por HPV*" da aluna **Natiely Silva Sales**, informo que a orientação passa a ser de responsabilidade do Prof. Dr. **Luis Carlos de Souza Ferreira**, sem modificações de seu conteúdo.

São Paulo, 15 de setembro de 2015.

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador da CEUA - ICB/USP

Ao criador de tudo, Deus

Aos meus pais,
Antônio Carlos e Noranei

Aos meus irmãos,
João Victor e Luis Rodrigo

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Luís Carlos de Souza Ferreira, pela orientação e dedicação no desenvolvimento desse trabalho, e pela contribuição no meu desenvolvimento científico.

Aos amigos que conquistei no Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas, Sara, Mari Cintra, Rúbens, Lenon, Ewerton, Hélic, André, Dalva, Deni, Monica, Robert, Naína, Gisela, Raíza, Renatinha, Milene, Cariri, Edu, Wilson, Camila, Rafael, pelos “cafés” na copa compartilhando bolachas, dramas e muitas risadas.

Ao corpo técnico do laboratório, Edu, uma pessoa muito comprometida com todo o Laboratório, e Carol, pela organização e limpeza dos materiais do laboratório.

Às meninas do “grupo HPV”, Mari Diniz, Bruna, Luana, Carina, Carol, Laís, Mariângela, Jamile e Paty, pelos momentos de convívio tolerando meu humor, pela ajuda, amizade e conselhos, contribuindo com meu desenvolvimento científico e pessoal e crescimento do grupo.

À uma grande pessoa que considero minha “mãe científica” Mariana Diniz! Eu não tenho palavras para agradecer por tudo que me ensinou sobre a vida acadêmica e pessoal, Jamile e Mariângela pela amizade e ajuda nos experimentos e seminários.

Aos grandes amigos que fiz aqui em São Paulo, Rúbens, Mari Cintra, Ewerton, Sara e Laís Carolina, pela imensa amizade que excede os muros da universidade.

À professora Rita, pela alegria e conselhos profissionais, e a professora Beth pelo carinho com todos, e pela ajuda com a manipulação dos animais.

À equipe do Biotério da Parasitologia e Microbiologia pelo cuidado com os animais.

À Gisele, pela ajuda com toda documentação na secretaria de Pós-graduação.

Às professoras de canto Paula e Sílvia, que muito contribuíram com meu desempenho vocal e musical.

Aos meus amigos da IPP, por compartilhar o amor de Cristo, carinho e amizade. Aos meus amigos do Coral Jovem, pelos ensaios divertidos.

Aos amigos, João Paulo, Diana, Laiane, Tiala, Andréa, Ícaro, Filipe, Débora, Evelyn, Gabi Rosy, Péricles, Evilásia, Laís, Tamires Pereira, Karina, Rafa Rosa, Gilly e Fabiana, Cida Corriler, Tiago e Tamires Anjos pelas conversas via internet e telefone, me ajudando a suportar a distância de casa, e por vibrarem com cada vitória minha.

À Lourdes e toda família Omissias, meus sinceros agradecimentos.

À grandes professores que tive em minha vida, Graça Telles que me ensinou matemática com alegria, Vilela pelo seu grande conhecimento da língua portuguesa e sobre a vida, Solange e Sílvia que foram grandes mestres na minha graduação, e Marta, que me fez gostar de imunologia.

Aos meus tios Rosa e Núncio que me hospedaram em sua casa. A todos os meus tios, primos, e a minha avó pelo carinho, e pelas orações.

À painho e mainha, pelo amor, pelo carinho, pelas ligações e pelo cuidado com minha saúde. Por me ensinarem a amar a Deus, e ao próximo. Aos meus irmãos pelo carinho e apoio.

Este trabalho foi realizado sob a orientação do Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira, no Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas (LDV), do Departamento de Microbiologia no Instituto de Ciências Biomédicas II, Universidade de São Paulo, com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

*Portanto, quer comais quer
bebais, ou façais outra
qualquer coisa, fazei tudo
para glória de Deus.*

1 Coríntios 10:31

RESUMO

SALES, N. S. **Efeitos da eletroporação *in vivo* na resposta imunológica induzida por uma vacina de DNA contra tumores induzidos por HPV-16.** 2015. 63 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O câncer cervical é a terceira causa de morte de mulheres no mundo e a quarta causa de mortes em mulheres por câncer no Brasil. Seu principal agente etiológico é o vírus do papiloma humano (HPV). Já foram identificados mais de 100 tipos virais, e cerca de 40 deles infectam a mucosa anogenital, os quais são classificados de acordo com seu potencial oncogênico como vírus de alto ou baixo risco. Dentre os tipos virais de alto risco, destacam-se o HPV-16 e o HPV-18, que são considerados os principais causadores de câncer cervical. Esforços estão sendo feitos na busca de estratégias imunoterapêuticas que combatam os tumores causados por esses vírus, uma vez que as vacinas profiláticas atualmente comercializadas, não são capazes de beneficiar pessoas já infectadas ou com o câncer estabelecido. Neste contexto, as vacinas de DNA têm demonstrado boa eficácia em estudos contra esses tipos de tumores em modelo murino, e são consideradas seguras, estáveis e capazes de induzir resposta imune específica. Entretanto, essas formulações apresentam baixa imunogenicidade em humanos, fazendo-se necessária a busca de abordagens que aumentem a eficácia dessas vacinas, tais como o uso de adjuvantes, a otimização de códons e a utilização de sistemas de entrega plasmidial. A eletroporação *in vivo* (EP) é um método de entrega de vacinas de DNA, que consiste na aplicação de pulsos elétricos, promovendo a abertura de poros na membrana e facilitando a entrada do DNA na célula. Essa técnica já vem sendo amplamente estudada pela sua capacidade de potencializar o efeito de vacinas de DNA. Nosso grupo desenvolveu uma vacina baseada em DNA (pgDE7h) que expressa a proteína E7 do HPV-16 fusionada à glicoproteína D (gD) do vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1). O uso da EP para a entrega de 50 µg dessa vacina pela via intramuscular (i.m.) aumentou o efeito antitumoral terapêutico em camundongos desafiados com a linhagem TC-1, que expressa as proteínas E6 e E7 do HPV-16, proteção total. A vacina combinada à EP induziu migração de células para o sítio de inoculação e promoveu maior ativação de células T CD8⁺E7-específicas. Foi observado ainda o aumento de linfócitos de perfil citotóxico e a indução de linfócitos polifuncionais capazes de secretar IFN-γ, IL-2 e TNF-α simultaneamente. Também foi observado um aumento da frequência de células de memória efetora produtoras de IFN-γ e maior avidéz das células T ativadas em animais submetidos à eletroporação. O uso da EP em imunizações feitas pela via intradérmica (i.d.) não foi capaz de melhorar a eficiência da vacina. Em conclusão, os resultados obtidos nesse trabalho consolidam o uso da EP como técnica potencializadora do efeito terapêutico induzido pela vacina pgDE7h administrada pela via i.m. reforçando seu potencial de aplicação em futuros ensaios clínicos.

Palavras-chave: Câncer Cervical. HPV. Vacinas de DNA. Eletroporação.

ABSTRACT

SALES, N. S. **Effects of the *in vivo* electroporation in the induced immune response by DNA vaccines against induced tumors by HPV-16.** 2015. 63 p. Masters thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Cervical cancer is the third leading cause of cancer death among women in the world and the fourth cause of cancer death in women in Brazil. It's main etiological agent is human papilloma virus (HPV). More than 100 types of this virus have been identified and about 40 of them infect anogenital mucosal tissues. Among them, they are classified as high or low risk viruses according to their oncogenic potential. Among the high-risk virus types, HPV-16 and HPV-18 are considered the main cause of cervical cancer, being responsible for around 85% of the cases. Efforts are being made in the search for immunotherapeutic strategies against HPV-induced tumors, since the prophylactic vaccines now commercialized, are not able to benefit already infected individuals or patients with established cancer. In this context, DNA vaccines have demonstrated good efficacy against these tumors in murine studies, and are considered safe, stable and capable of inducing specific immune response. However, these formulations have shown immunogenicity in humans, requiring the use of approaches that increase the efficacy of these vaccines, such as the use of adjuvants, codon optimization and the use of different plasmid delivery systems. The *in vivo* electroporation (EP) is a method for delivering DNA vaccines, consisting on the application of electric pulses that open transient pores in the cell membrane and facilitate DNA entry into the cell. This technique has been extensively studied for its ability to potentiate the effect of DNA vaccines. Our group has developed a DNA vaccine expressing the E7 protein of HPV-16 fused to glycoprotein D (gD) of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) (pgDE7h). The use of EP for the delivery of 50 µg of the vaccine by the intramuscular route (im) increased the therapeutic effect in mice challenged with the TC-1 tumor cell line that expresses the HPV-16 E6 and E7 proteins, generating full anti-tumor protection. The vaccine combined to EP induced increased cell transfection by plasmid DNA and the migration of pro-inflammatory cells to the inoculation site. It was also observed an enhanced activation of CD8⁺ E7-specific cells, with greater cytotoxic ability and capacity of secreting IFN-γ, IL-2 and TNF-α simultaneously. It was also observed an increased frequency of CD8⁺ T cells with greater avidity and effector memory phenotype in animals subjected to the electroporation immunization system. The use of EP in immunizations through the intradermal (id) route was not able to improve the vaccine effectiveness. In conclusion, the present results consolidated the EP as a powerful technique to potentiate the therapeutic effect induced by the pgDE7h vaccine administered by intramuscular injection reinforcing its potential for use in future clinical trials.

Keywords: Cervical Cancer. HPV. DNA vaccines. Electroporation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema do protocolo de imunização terapêutico, análise de resposta e acompanhamento da proteção antitumoral.....	25
Figura 2. Fotos representativas do equipamento NEPA21 Super Eletroporador (NepaGene), e os eletrodos utilizados pela via i.d. CUY650P10 e pela via i.m. CUY560-5-0.5.....	26
Figura 3. EP <i>in vivo</i> aumenta a expressão de luciferase pelas diferentes vias de imunização.....	30
Figura 4. A associação da EP à vacina pgDE7h pela via i.m. promove o aumento dos níveis de proteção antitumoral terapêutica e da ativação de linfócitos T CD8 ⁺ E7-específicos.....	33
Figura 5. A imunização com a vacina pgDE7h pela via i.d. associada ou não à EP promove baixos níveis de proteção antitumoral terapêutica e de ativação de linfócitos T CD8 ⁺ E7-específicos produtores de IFN- γ	35
Figura 6. EP associada à imunização com o plasmídeo vacinal pgDE7h promove recrutamento de células do sistema imune para o sítio de inoculação pela via i.m.....	37
Figura 7. EP associada à imunização com o plasmídeo vacinal pgDE7h não altera o perfil celular do sítio de inoculação pela via i.d.....	39
Figura 8. Vacina pgDE7h administrada pela via i.m. seguida de EP promove aumento da expressão da molécula CD107a e da atividade citotóxica de células T CD8 ⁺	42
Figura 9. Administração da vacina pgDE7h pela via i.m. seguida de EP promove aumento de avidéz em células T CD8 ⁺	44
Figura 10. Administração da vacina pgDE7h pela via i.m. associada à EP induz a produção de IFN- γ , TNF- α e IL-2 por células T CD8 ⁺ E7-específicas.....	46
Figura 11. Administração do plasmídeo pgDE7h pela via i.m. associado à EP, induz resposta de células T CD8 ⁺ de memória efetora.....	48
Figura 12. EP associada à vacina pgDE7h pela via i.m. promove proteção antitumoral terapêutica em camundongos com tumores pré-estabelecidos.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACK - *Ammonium-Chloride-Potassium*

APC - *Antigen presenting cell* (célula apresentadora de antígeno)

BTLA - B and T lymphocyte attenuator (atenuador de linfócitos B e T)

CD - *Cluster of differentiation* (grupo de diferenciação)

CFSE - *Carboxyfluorescein succinimidyl ester*

CIN - *Cervical intraepithelial neoplasia* (neoplasia intraepitelial cervical)

CMV - Citomegalovírus

CRT - Calreticulina

CTL - *Cytotoxic T lymphocyte* (linfócito T citotóxico)

DCs - *Dendritic cells* (células dendríticas)

DNA - *Desoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucléico)

E - *Early protein* (proteína de expressão precoce)

EDTA – *Ethylenediaminetetraacetic acid* (Ácido etileno diamino tetra acético)

EP - Eletroporação *in vivo*

Flt3L - *Fms-like tyrosine kinase-3 ligand*

gD - Glicoproteína

HPV - *Human papilloma virus* (vírus do papiloma humano)

HSP - *Heat shock protein* (proteína de choque térmico)

HSV - *Herpes simplex virus* (vírus herpes simplex)

HVEM - *Herpes virus entry mediator*

IFN- γ - Interferon- γ

ID - Imunização intradérmica

IL - Interleucina

IM - Imunização intramuscular

INCA - Instituto Nacional do Câncer

KAN - Kanamicina

L - *Late protein* (proteína de expressão tardia)

LB - Meio Luria-Bertani

MHC - *Major histocompatibility complex* (complexo principal de histocompatibilidade)

NF- κ B - *Nuclear factor kappa B* (fator nuclear kappa B)

NK - *Natural killer cells*

PBMC - *Peripheral blood mononuclear cells* (células mononucleares do sangue periférico)

pRb - proteína retinoblastoma

PBS - *Phosphate buffered saline* (tampão salina fosfato)

SFB - Soro fetal bovino

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

Th - *T helper* (T auxiliar)

VLPs - *Virus like particles* (Partículas semelhantes a vírus)

LISTA DE SÍMBOLOS

% - porcentagem

® - marca registrada

μg - micrograma (10^{-6} grama)

μl - microlitro (10^{-6} Litro)

g - grama

Kg - kilograma

M - molar

mL - mililitro (10^{-3} Litro)

mm - milímetro (10^{-3} metros)

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

nm - nanômetro (10^{-9} metros)

°C - graus Celsius

p/s - *photons per seconds* (fótons por segundos)

rpm - rotações por minuto

V - voltagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 VETORES.....	23
3.2 ENSAIOS DE DESAFIO COM AS CÉLULAS TC-1.....	23
3.3 PROTOCOLO DE IMUNIZAÇÃO.....	24
3.4 ANÁLISE DO INFLUXO CELULAR PARA O SÍTIO DE INOCULAÇÃO DA VACINA.....	25
3.5 ADMINISTRAÇÃO DA EP <i>IN VIVO</i>	25
3.6 DETECÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE REPÓRTER (LUC2) EM CAMUNDONGOS APÓS TRANSFEÇÃO POR EP.....	26
3.7 MARCAÇÃO INTRACELULAR DE CITOCINAS.....	26
3.8 CITOTOXICIDADE <i>IN VIVO</i>	27
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	28
4 RESULTADOS	29
4.1 COMPARAÇÃO DOS EFEITOS DA ELETROPORAÇÃO <i>IN VIVO</i> PARA ENTREGA DE DNA PLAMIDIAL PELAS VIAS INTRAMUSCULAR E INTRADÉRMICA.....	29
4.1.1 Análise e quantificação da transfecção <i>in vivo</i> da atividade de luciferase após inoculação pelas vias i.m. e i.d.....	29
4.1.2 Análise da indução do efeito terapêutico antitumoral e da ativação de células T CD8 ⁺ pela imunização com o plasmídeo vacinal pgDE7h pelas vias i.m. e i.d. associadas à EP.....	31
4.1.3 Efeitos da EP no recrutamento de células para o sítio de inoculação da vacina pgDE7h pelas vias i.m. e i.d.....	36
4.2 EFEITOS DA EP PELA VIA I. M. NA RESPOSTA CELULAR INDUZIDA PELA VACINA pgDE7h.....	40
5 DISCUSSÃO	51
6 CONCLUSÕES	54
REFERÊNCIAS	56

1 INTRODUÇÃO

O papiloma vírus humano (HPV) é um vírus não envelopado, com DNA circular dupla fita, e tropismo por epitélio escamoso. Seu genoma é composto de aproximadamente 8.000 pares de bases. O vírus HPV possui dois genes de expressão tardia que codificam as proteínas do capsídeo viral, denominadas L1 e L2 (L, do inglês *late*). A proteína L1, sozinha ou associada à L2, forma partículas que se assemelham ao vírus, conhecidas como VLPs (do inglês *Viral-Like Particles*) (DE VILLIERS et al., 2004; KIRNBAUER et al., 1992). As VLPs mostraram-se altamente imunogênicas e induzem resposta de anticorpos neutralizantes capaz de evitar infecções por vírus HPV em humanos (BROWN et al., 2001). Já as proteínas codificadas por genes de expressão precoce (E, do inglês *early*), desempenham funções importantes na regulação do ciclo viral (VILLA, 2006). Especificamente, as proteínas E6 e E7 interagem com diversas proteínas celulares, contribuindo para o processo de malignização celular. Entre outras ações já descritas, a proteína E7 interage com pRb liberando o fator de transcrição E2F, e a proteína E6 promove a degradação de p53, promovendo proliferação celular e bloqueio de apoptose, respectivamente (WERNESS; LEVINE; HOWLEY, 1990). As oncoproteínas virais E6 e E7 são constitutivamente expressas em células de carcinoma cervical, e estão relacionadas à transformação celular e manutenção deste estado. Por essas, proteínas representam alvos potenciais para o desenvolvimento de formulações vacinais contra tumores relacionados ao HPV (FRAZER, 2004).

O câncer cervical é o terceiro tumor mais frequente em mulheres e a quarta causa de mortes por cancer em mulheres no Brasil. Segundo dados divulgados pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2015), em 2013, foram relatados 15.590 novos casos deste tipo de câncer no Brasil e 5.430 óbitos. Todos os casos de câncer de colo de útero estão associados a infecções persistentes pelo vírus do papiloma humano com potencial oncogênico (PARKIN et al., 2005). Em diferentes frequências, o vírus HPV também está associado a outros tipos de câncer como de cabeça e pescoço, pênis, vagina, vulva e ânus (MUÑOZ et al., 2006). Mais de 100 tipos de HPV foram identificados e cerca de 40 infectam a mucosa anogenital (de VILLIERS et al., 2004), sendo classificados em tipos virais de baixo ou alto risco, devido à sua propensão ao desenvolvimento de câncer. Dentre os tipos que fazem parte do grupo de baixo risco, destacam-se como mais frequentes o HPV-6 e HPV-11, associados à formação de verrugas genitais benignas. Já os vírus HPV-16 e HPV-18 pertencem ao grupo considerado de alto risco e são considerados os principais agentes causadores do câncer cervical (BOSCH et

al., 2002), causando conjuntamente mais de 80% dos casos deste tipo de câncer, sendo o HPV-16 o responsável por pelo menos 50% dos casos (WALBOOMERS et al., 1999).

O tratamento de tumores induzidos por HPV atualmente disponíveis envolvem cirurgia, radioterapia e quimioterapia, correspondendo a intervenções invasivas, agressivas e que não agem especificamente sobre as células tumorais. Apesar de muito terem contribuído para salvar vidas, esses tratamentos induzem efeitos adversos graves e não apresentam boa eficácia no controle de tumores em estágios avançados (KENTER et al., 2009), evidenciando a necessidade do desenvolvimento de estratégias vacinais que impeçam o estabelecimento de infecções por vírus HPV ou que busquem conter lesões ou tumores induzidos por esse vírus.

Visando evitar a infecção viral, e consequentemente a ocorrência do câncer em longo prazo, foram desenvolvidas vacinas preventivas baseadas em VLPs que se encontram disponíveis para comercialização. Essas vacinas são compostas pela proteína L1 do capsídeo viral e induzem a produção de anticorpos neutralizantes, conferindo proteção contra a infecção pelos tipos virais cobertos pela vacina. A vacina Gardasil (Merck & CO. Whitehouse Station, NJ, USA) contém VLPs dos tipos virais HPV-6, 11, 16 e 18 e a Cervarix produzida pela GlaxoSmithKline (GSK, Filadélfia, PA, Estados Unidos) dos HPV-16 e 18. Entretanto, as vacinas profiláticas não protegem indivíduos com infecções já estabelecidas, uma vez que as proteínas do capsídeo não são expressas pelas células tumorais (FRAZER, 2004). Além disso, essas vacinas apresentam custo elevado, impedindo sua distribuição em larga escala, o que seria necessário para que o número de casos de câncer de colo de útero seja de fato reduzido (LIN et al., 2010).

Por outro lado, as vacinas terapêuticas visam induzir resposta celular citotóxica específica contra células alvo que expressam as oncoproteínas E6 e E7, necessárias para a malignização celular e também para a manutenção do estado transformado (FRAZER, 2004; LIN et al., 2010), possibilitando a eliminação de lesões já existentes (WU, 2007). Entre as vacinas terapêuticas, as formulações vacinais que empregam DNA plasmidial representam uma estratégia em potencial na indução de resposta imune antígeno-específica (DONNELLY; WAHREN; LIU, 2005). Essa abordagem vacinal apresenta várias vantagens em relação às vacinas tradicionais baseadas em vetores vivos, pois são seguras, estáveis, de fácil fabricação em larga escala e apresentam capacidade de induzir resposta celular (TRIMBLE et al., 2003).

Em relação às vacinas de DNA contra tumores induzidos por HPV, plasmídeos codificando as oncoproteínas de HPV apresentam baixa imunogenicidade, exigindo o desenvolvimento de abordagens capazes de intensificar a ativação de células T CD8⁺ antígeno-específicas como: fusão a genes carreadores, otimização de códons, administração

de adjuvantes e a busca de métodos de entrega mais eficientes capazes de transfectar um maior número de células ou direcionar o DNA plasmidial para um sítio com maior presença de APCs (KUTZLER; WEINER, 2008; TRIMBLE et al., 2003). A utilização de abordagens como as acima mencionadas permitiu a detecção de indução de resposta de células T CD8⁺ específicas contra epítomos de E6 e E7 e tornaram as vacinas capazes de conferir algum grau de proteção terapêutica a desafios com células tumorais transformadas com as proteínas E6 e E7 do HPV-16 (CHEN et al., 2000).

Considerando vacinas avaliadas em ensaios clínicos contra tumores associados ao HPV, algumas estratégias baseadas em vacinas de DNA foram testadas recentemente. Entre essas formulações está uma estratégia que codifica a proteína híbrida empregando a fusão de E7 à proteína HSP70 de *Mycobacterium tuberculosis* (que promove a ativação de células dendríticas), sendo observada resposta imune em 8 dos 15 pacientes com CIN2/3, e regressão de lesões em 3 de 9 pacientes (TRIMBLE et al., 2009). Outro trabalho demonstrou resultados promissores com uma vacina de DNA codificando as proteínas E6/E7 utilizando o método de EP para a entrega do DNA, induzindo um aumento da resposta citotóxica de linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN- γ em 14 dos 18 pacientes (BAGARAZZI et al., 2012). Como as lesões foram removidas cirurgicamente antes da vacinação, não foi possível avaliar a regressão histológica após imunização com essa formulação vacinal. A vacina de DNA que está em estágio mais avançado de desenvolvimento, é a GX-188, que foi testada em 9 pacientes com lesões CIN3. Essa abordagem foi desenvolvida, visando facilitar a apresentação e processamento dos antígenos E6/E7 por células dendríticas, pela co-expressão do ligante denominado de *Fms-like tyrosine kinase-3* (Flt3L) e utiliza a EP como método de entrega. Em 8 dos 9 pacientes, observou-se o aumento de resposta de linfócitos T CD8⁺ e atividade citolítica, além de secreção de citocinas, e regressão completa das lesões em sete pacientes (KIM et al., 2014).

No Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas (LDV) foi desenvolvida uma formulação vacinal terapêutica contra tumores induzidos por HPV baseada na expressão de E7 de HPV-16 fusionada à glicoproteína D (gD) do HSV-1 (LASARO et al., 2005). Nessa construção vacinal, a proteína gD confere um potencial adjuvante relacionado à sua capacidade de interação com receptor HVEM (do inglês *Herpes Virus Entry Mediator*) que promove ativação de células do sistema imunológico de modo direto pela produção de NF- κ B (SCIORTINO et al., 2008) ou, indiretamente, pelo bloqueio da ligação de BTLA e CD160 a este receptor que resultaria em sinais co-inibidores (STEINBERG; CHEUNG; WARE, 2011). Em modelo murino, esta vacina mostrou-se capaz de ativar células T CD8⁺ E7-específicas e

gerar proteção antitumoral terapêutica em 40% dos camundongos tratados após implante da linhagem tumoral TC-1 capaz de expressar as proteínas E6 e E7 do HPV-16. A formulação foi aprimorada pela co-administração de plasmídeos que codificam citocinas, pela imunização i.d. utilizando o *gene gun* ou por otimização dos códons que codificam a proteína, resultando em todos os casos em um aumento expressivo do efeito terapêutico antitumoral (DINIZ et al., 2010, DINIZ; FERREIRA, 2011 e dados não publicados). Os resultados recentemente obtidos pelo grupo, refletem o grande potencial da vacina terapêutica em desenvolvimento. Entretanto, dispor de um método de administração que aumente a imunogenicidade da vacina pode ser determinante para o sucesso da mesma em um futuro ensaio clínico.

A técnica de eletroporação (EP) *in vivo* emprega a utilização de pulsos elétricos que formam poros transientes na membrana celular e promovem deslocamento de DNA, facilitando a entrada do plasmídeo na célula. Essa técnica promove maior eficiência de transfecção e, conseqüentemente, aumento da quantidade de antígeno produzido (AIHARA et al., 1998; BEST et al., 2009; LIU et al., 2008; MIR et al., 1999). Além disso, a EP promove o recrutamento de células pró-inflamatórias e indução de secreção de citocinas e quimiocinas, gerando um ambiente inflamatório no sítio da inoculação, o que pode estar diretamente relacionado ao aumento da imunogenicidade desencadeado por este método de entrega (BABIUK et al., 2002 ; KALAT et al., 2002; SHIROTA et al., 2007).

Alguns trabalhos comparativos utilizando vacinas de DNA demonstraram um aumento de eficiência de 10 a 100 vezes em imunizações realizadas pelas vias i.m. ou i.d. quando associadas à EP *in vivo* (NYSTROÖM et al., 2010). Esses estudos e a demonstração da boa tolerabilidade da técnica em ensaios clínicos têm promovido um crescente interesse neste método para a entrega de vacinas de DNA e outros fármacos, como quimioterápicos (MÖLLER et al., 2009). Visando aumentar a eficiência da estratégia vacinal desenvolvida pelo grupo, o presente trabalho, portanto, propôs avaliar os efeitos da EP *in vivo* nas respostas imunológicas induzidas pela vacina de DNA desenvolvida no LDV, voltada ao controle de tumores induzidos por HPV-16.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo central avaliar os efeitos da EP *in vivo* na resposta imunológica induzida por uma vacina de DNA contra tumores induzidos por HPV, que codifica a proteína E7 do HPV-16 geneticamente fusionada à gD de HSV-1, denominada pgDE7h. Especificamente, o projeto apresentou como metas principais os seguintes pontos:

- Comparação da eficiência de transfecção *in vivo* de células utilizando a eletroporação, pela administração de plasmídeo que codifica a enzima luciferase.
- Avaliação dos efeitos gerados na resposta de células T CD8⁺ E7-específica e na proteção terapêutica antitumoral frente ao modelo de células TC-1 com a vacina pgDE7h após administração i.m. seguida ou não da EP *in vivo*.
- Análise do uso de eletrodos para imunização intradérmica (i.d.) utilizando a EP *in vivo* para a entrega da vacina pgDE7h buscando avaliar os efeitos na indução de células T CD8⁺ E7-específica e resposta antitumoral induzidos.
- Avaliação do perfil de células que migram para o sítio de inoculação da vacina após utilização da EP *in vivo* pelas vias i.m. e i.d. e determinação da potencialização do efeito da vacina de DNA.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 VETORES

A vacina pgDE7h foi desenvolvida no LDV, e consiste na fusão genética da proteína E7 do HPV-16, após o aminoácido 244 da glicoproteína D do vírus HSV-1. A sequência do gene que codifica a proteína gDE7 foi adaptada para a utilização de códons humanos (DINIZ et al., 2013). A otimização foi realizada seguindo os algoritmos de Sistema de Otimização Optimum Gene (GenScript, Piscataway Township, NJ., EUA). Foram alterados os aminoácidos 24 e 26, na sequência do gene E7 do HPV-16, para eliminar qualquer ligação da proteína E7 a pRb. O gene foi clonado em regiões específicas que tem restrição para as enzimas *Pst*I e *Bgl*III no terminal N' e C', respectivamente, para subsequente clonagem num vector pUMVC3 (Aldevron, Fargo, ND., EUA), que contém um promotor de CMV e um gene de resistência à canamicina.

O plasmídeo que expressa a proteína luciferase (pLuc) foi construído após clonagem do gene sintético da luciferase (*luc2*) – extraído do vetor pGL4 (Promega, Madison, WI, EUA) – nos sítios de *Bam*HI e *Xba*I do plasmídeo pcDNA3.0 (Invitrogen, Waltham, MA, EUA). Este possui gene que codifica resistência a ampicilina/neomicina e promotor de CMV.

A linhagem de *E. coli* utilizada para a propagação dos plasmídeos pgDE7h e pLuc foi a DH5 α . Para todos os ensaios realizados a linhagem bacteriana foi cultivada em meio Luria Broth (LB) (1% triptona, 0.5% extrato de levedura, 171 mM NaCl, pH 7.0) por um período de aproximadamente 18 h a 37 °C sob agitação intensa (200 rpm) em agitador orbital. As linhagens recombinantes com pgDE7h ou pLuc foram rotineiramente cultivadas em meio LB suplementado com canamicina (50 μ g/mL) ou ampicilina (100 μ g/mL), respectivamente. A extração e purificação foram realizadas através de *kits* de purificação (Qiagen, Hilden, NRW, Alemanha), seguindo instruções do fabricante. As amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro a 260 nm e confirmadas por inspeção visual em gel de agarose 0,8%.

3.2 ENSAIOS DE DESAFIO COM AS CÉLULAS TC-1

Os camundongos submetidos ao protocolo vacinal terapêutico foram desafiados com a linhagem tumoral TC-1. Essa linhagem celular é derivada do epitélio pulmonar de camundongos C57BL/6, e transformada com v-Has-ras e os genes E6 e E7 do HPV-16 (LIN

et al, 1996). As células foram lavadas duas vezes com PBS pH 7.4 e, em seguida, tratadas com Tripsina EDTA (CultLab, Campinas, SP, BR). Em seguida, foram ressuspensas em meio RPMI (GIBCO, Waltham, MA EUA) contendo 10% de soro fetal bovino (Vitrocell, Campinas, SP, BR) para inativação da tripsina. As células foram lavadas duas vezes, ressuspensas em meio RPMI sem soro fetal bovino e inoculado a uma concentração de $7,5 \times 10^4$ células TC-1/animal no flanco inferior direito pela via subcutânea (s.c.).

3.3 PROTOCOLO DE IMUNIZAÇÃO

Os experimentos de imunização foram realizados com grupos de 5-10 camundongos fêmeas ou machos C57BL/6, com idade entre 6 a 8 semanas adquiridos do Biotério de Camundongos Isogênicos do Departamento de Parasitologia da Universidade de São Paulo e manuseados de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão de ética do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

Os ensaios terapêuticos realizados na primeira etapa do trabalho envolveram a administração da vacina pelas vias i.m. ou i.d.. Para a via i.m., foram utilizadas as doses de 10, 25 ou 50 µg combinadas (IMEP) ou não (IM) à eletroporação, e para a via i.d. foi empregada a dose de 50 µg apenas (ID), ou combinada a EP (IDEP). Todas as formulações vacinais foram veiculadas em PBS 1X. Para a via i.m., o volume final foi de 50 µl inoculados no músculo tibial anterior, e para a via i.d., o volume final foi de 20 µl inoculados no pavilhão auditivo dos camundongos.

As imunizações foram realizadas em regime de dose única três dias após o desafio tumoral, e as análises de amostras de PBMCs e esplenócitos foram realizadas 14 dias após a imunização. Os tumores foram monitorados durante um período de 60 dias (Figura 1). Para os ensaios de desafio temporal, as imunizações foram realizadas após 7 ou 10 dias do desafio. Os animais que receberam eletroporação (EP) foram previamente anestesiados pela via intraperitoneal com uma mistura de ketamina (75 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). Na segunda etapa do trabalho, as imunizações foram realizadas apenas pela via i.m., conforme descrito acima.



Figura 1: Esquema do protocolo de imunização terapêutica, análise de resposta e acompanhamento da proteção antitumoral.

3.4 ANÁLISE DO INFLUXO CELULAR PARA O SÍTIO DE INOCULAÇÃO DA VACINA

Para os ensaios de análise de infiltrado celular no sítio de imunização, os animais foram divididos em cinco grupos experimentais, tanto para a via i.m., como i.d.: grupo inoculado com solução salina (PBS); grupo que não recebeu nenhuma inoculação (Naive); grupo que recebeu apenas os pulsos elétricos (EP); imunização i.m. ou i.d. (ID) do plasmídeo pgDE7h (IM); imunização i.m. ou i.d. seguida de EP (IMEP) ou (IDEP).

Os grupos imunizados receberam a dose de 50 µg de pgDE7h, e as amostras de pele ou músculo foram coletadas após 48 de inoculação da vacina. As amostras foram maceradas, e tratadas com colagenase D (Sigma-Aldrich C., St. Louis, EUA) na concentração de 1 mg/ml por amostra, por 1 h. Após esse tratamento, as amostras foram lavadas duas vezes com PBS 1X (pH 7.4) e filtradas com o auxílio de um filtro de 70nm (“*Cell strainer*”) (BD Biosciences, East Rutherford, NJ., EUA). As amostras foram incubadas com o tampão PBS, com 50 µl de uma diluição 1:100 de anticorpo monoclonal anti-NK1.1, anti-CD19, anti-CD11c ou a diluição 1:200 de anticorpo monoclonal anti-CD4, anti-CD8, anti-CD11b, anti-Gr1 ou anti-F4/80 conjugados a diferentes fluorocromos (BD Bioscience) por 30 min a 4 °C. Após as lavagens, as células foram ressuspensas em PBS, e avaliadas em citômetro de fluxo.

3.5 ADMINISTRAÇÃO DA EP *IN VIVO*

Para a realização da EP pela via i.m., utilizamos o eletrodo CUY560-5-0.5 (Figura 2B), que consiste em um par de agulhas fixas paralelas com espaço de 5 mm entre elas e 0,5 mm de diâmetro. O eletrodo foi inserido no músculo tibial anterior logo após a inoculação da vacina. Foram aplicados 2 pulsos elétricos de 130 V cada, com duração de 450 ms (pulsos que forma poros na membrana celular), e 4 pulsos de 70 V cada, com duração de 450 ms (pulsos de transferência). Para a EP pela via i.d., foi utilizado o eletrodo CUY650P10 (Figura 2C), que consiste em um par de pinças revestidas com platina com espaço variável e 10 mm de

diâmetro. A pinça foi levemente pressionada sobre o pavilhão auditivo do animal logo após a inoculação da vacina. Foram aplicados 2 pulsos elétricos de 45 V cada, com intervalo de duração de 450 ms, (pulsos que forma poros na membrana celular), e 4 pulsos de 20 V cada, com duração de 450 ms (pulsos de transferência) Os pulsos elétricos foram entregues utilizando o equipamento NEPA21 SuperEletroporador (NepaGeneCo., Ltd.; Chiba, Japão) (Figura 2A).

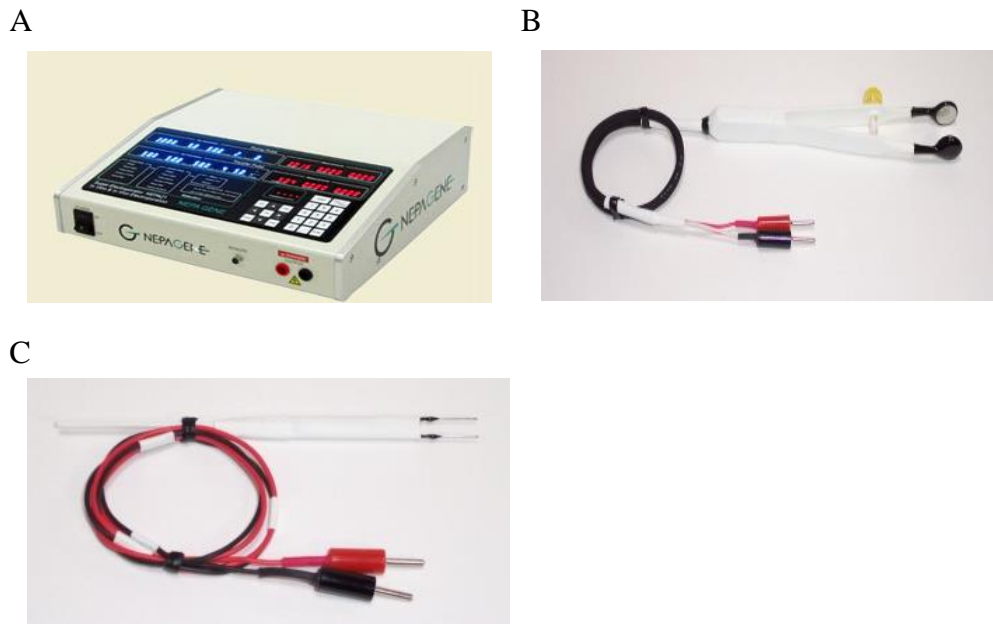


Figura 2: Fotos representativas do equipamento NEPA21 SuperEletroporador (NepaGeneCo., Ltd.; Chiba, Japão). (A), e os eletrodos utilizados pela via i.d., CUY650P10 (B) e pela via i.m., CUY560-5-0.5(C).

3.6 DETECÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE REPÓRTER (LUC2) EM CAMUNDONGOS APÓS TRANSFECCÃO POR EP

Para detecção da atividade da luciferase *in vivo*, foram utilizados três camundongos/grupo C57BL/6, fêmeas, de 6-8 semanas. Os animais foram inoculados com plasmídeo pLuc pelas vias i.m. ou i.d. com ou sem eletroporação. O grupo controle recebeu apenas PBS 1X (pH 7.4). Os resultados de bioluminescência foram obtidos após inoculação de 200 µl de luciferina (Promega, EUA), por via intraperitoneal, na concentração de 150 mg/kg de peso corpóreo, e visualização no equipamento IVIS® Spectrum (Caliper, Stoke Rochford, Inglaterra) 48 h ou 7 dias após a transfecção. As imagens de bioluminescência foram exibidas no modo “fótons” e analisadas posteriormente no próprio equipamento para obtenção dos valores de fluxo total (p/s), que se refere ao número de fótons por segundo.

3.7 MARCAÇÃO INTRACELULAR DE CITOCINAS

A marcação intracelular de citocinas intracelulares foi realizada utilizando amostras de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) ou esplenócitos, tratados com tampão de lise de hemácias ACK (BioSourceInternational, Waltham, MA EUA). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos e ressuspensas em meio RPMI. As células foram cultivadas a uma concentração aproximada de 10^6 células/poço por 6 h a 37 °C em placa de fundo côncavo em 200 µl de meio RPMI completo e Brefeldin A (GolgiPlug; BD Bioscience, EUA) a uma concentração de 10 µg/mL e IL-2 (5 ng/mL) na presença ou não do peptídeo E7 específico para linfócitos T CD8⁺ (E7 49-57: RAHYNIVTF). Após as lavagens, as células foram incubadas com 50 µl de uma solução diluída 1:100 do anticorpo monoclonal anti-CD8⁺ por 30 min a 4 °C. As células foram lavadas com PBS 2% SFB e fixadas com tampão contendo paraformaldeído a 4%. Em seguida, as células foram permeabilizadas com tampão contendo saponina a 0,5% e incubadas no mesmo tampão com 50 µl de uma solução diluída 1:100 de anticorpo monoclonal anti-IFN- γ , anti-TNF α ou anti-IL-2 conjugados a diferentes fluorocromos (BD Bioscience) por 30 min a 4 °C. Após as lavagens, as células foram ressuspensas em PBS 2% SFB e avaliadas em citômetro de fluxo.

Para os ensaios de avidéz, diluições seriadas do peptídeo E7 foram usadas como estímulo variando a concentração entre 0,001 e 3 µg/mL. Em alguns experimentos, anti-CD107a conjugado a fluoróforo e 10 µg/ml de monensina (GolgiStop; BD Biosciences) foram adicionados durante o estímulo *in vitro*. Para os ensaios de fenotipagem de memória, juntamente com a marcação de CD8 de superfície foram utilizados anticorpos anti-CD62L e anti-CD44. Os tampões e anticorpos foram comprados da BD Biosciences. As amostras foram examinadas por citometria de fluxo, usando o FACS LSRFortessa (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), e os dados foram analisados através do software FlowJo (TreeStar, OR, USA).

3.8 CITOTOXICIDADE *IN VIVO*

O ensaio de citotoxicidade *in vivo* foi realizado para verificar a presença de células T CD8⁺ citotóxicas específicas para o peptídeo E7 (RAHYNIVTF) em animais imunizados, de acordo com metodologia descrita por Barber, Wherry e Ahmed (2003). Quatorze dias após as imunizações, um grupo de animais não imunizados foi submetido à eutanásia e seus baços coletados para obtenção de esplenócitos, conforme descrito anteriormente (item 3.7) e as células foram incubadas com CFSE (*carboxyfluorescein succinimidyl ester*) (Invitrogen) a 0,5 µM ou 5 µM, em PBS por 15 min a 37 °C. Após a incubação, as células foram lavadas e

ressuspendidas em meio RPMI acrescido de 2% de SFB (RPMI 2%). Ao tubo contendo a população de células marcadas com 5 μ M de CFSE, foram adicionados 2,5 μ g/mL do peptídeo E7 e incubado por 40 min a 37 °C. Após esse período, as células foram lavadas com meio RPMI 2% para a remoção do peptídeo não ligado e, em seguida, contadas. Quantidades iguais das duas populações de células marcadas foram misturadas e centrifugadas a 1.500 rpm. O sedimento de células foi ressuspendido em RPMI de modo a conter 2-4x 10⁷ células/100 μ L e injetado nos animais imunizados pela via do plexo retro-orbital. No dia seguinte, todos os animais foram submetidos à eutanásia e os esplenócitos obtidos como descritos no item 3.7. As células foram lavadas 3 vezes com PBS contendo soro fetal bovino a 2% (PBS 2%), ressuspendidas em 400 μ L de PBS 2% e examinadas por citometria de fluxo. Os dados foram analisados para a determinação das porcentagens de células marcadas com 0,5 μ M ou 5 μ M de CFSE pelo programa FlowJo (TreeStar, OR, USA).

3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas através dos testes T, ou ANOVA seguidos de testes de comparação de Bonferroni, Tukey ou Dunnett. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados como indicativos de relevância estatística. A análise estatística do gráfico de sobrevivência foi realizada através do teste Long Rank (Mantel Cox).

4 RESULTADOS

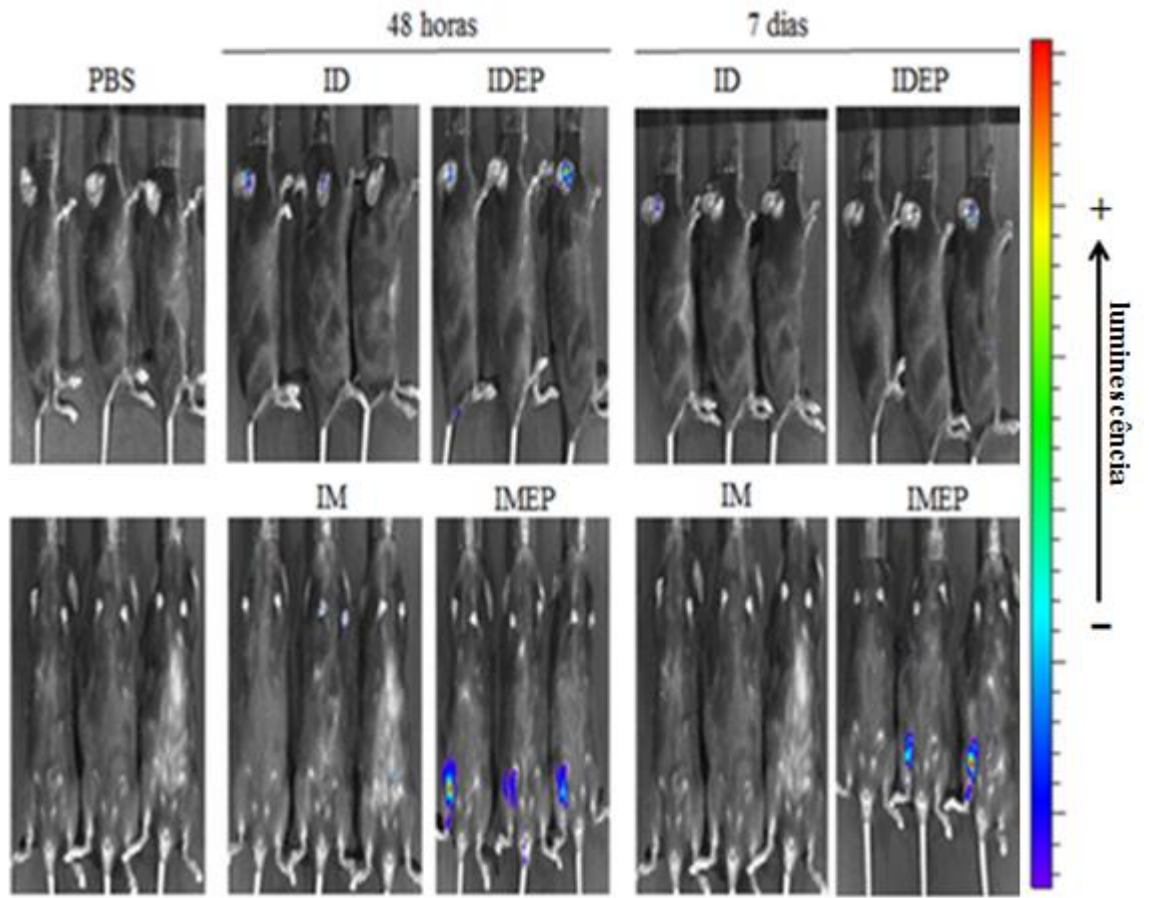
4.1 COMPARAÇÃO DOS EFEITOS DA EP *IN VIVO* PARA ENTREGA DE DNA PLAMIDIAL PELAS VIAS INTRAMUSCULAR E INTRADÉRMICA

4.1.1 Análise e quantificação da transfecção *in vivo* da atividade de luciferase após inoculação pelas vias i.m. e i.d.

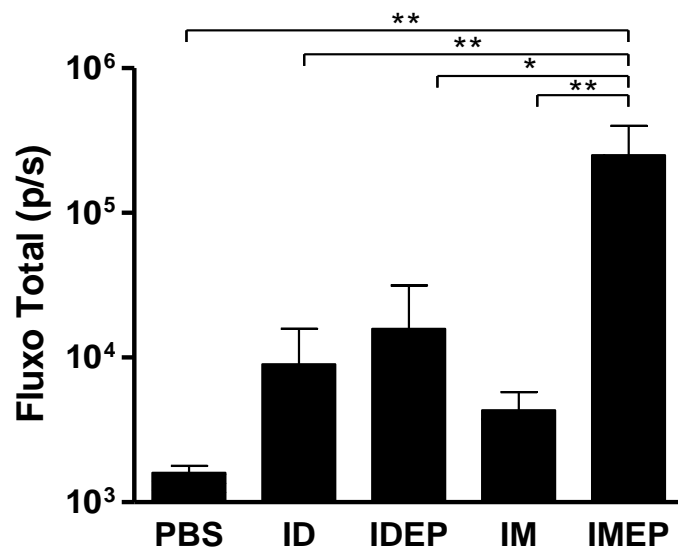
Primeiramente, o presente trabalho buscou avaliar a eficiência de transfecção *in vivo* de um plasmídeo que codifica a enzima luciferase (denominado pLuc) após a utilização da técnica de eletroporação. Para isso, camundongos C57BL/6 fêmeas receberam uma dose de 50 µg de pelas vias i.m. (IM), i.m. associada à EP (IMEP), i.d. (ID), i.d. associada à EP (IDEP) ou apenas PBS. Os resultados de bioluminescência foram obtidos 48 h ou 7 dias após a inoculação do plasmídeo. A atividade de luciferase foi quantificada por imagens de bioluminescência obtidas 7 a 10 min após a inoculação de luciferina e posteriormente quantificados em relação ao fluxo total de fótons emitidos (p/s) durante a reação de luminescência. (Figura 3).

Em relação à imunização pela via i.d., nos grupos ID e IDEP, apesar de dois dos três animais apresentarem emissão de luminescência (Figura 3A), não houve diferença estatística entre o grupo inoculado com e sem EP tanto no período de 2 dias como de 7 dias após a administração do pLuc (Figura 3B-C), sugerindo que a EP neste caso, não aumenta os níveis de transfecção do DNA. Por outro lado, a imunização pela via i.m. utilizando EP (IMEP) promoveu um aumento significativo da luminescência em relação ao grupo inoculado apenas com o plasmídeo (IM) em ambos os períodos avaliados, demonstrando capacidade de transfecção *in vivo* superior a todos os grupos de imunização (Figura 3).

A



B



C

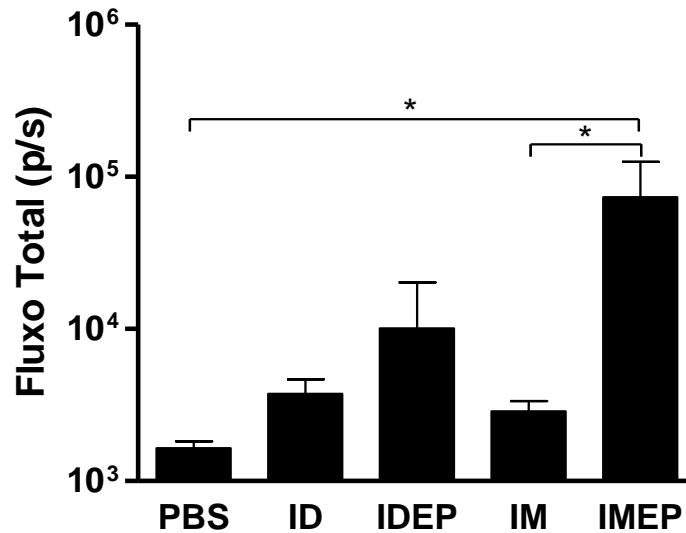


Figura 3: EP *in vivo* aumenta a expressão de luciferase pelas diferentes vias de imunização. Camundongos fêmeas C57BL/6 (n=3) foram vacinados com 50 µg/camundongo de pLuc, pela via i.m. (IM) ou i.d. (ID), combinadas à EP (IMEP ou IDEP), e o grupo controle recebeu apenas PBS. (A) A intensidade de bioluminescência foi obtida 48 h ou 7 dias após a inoculação do plasmídeo pLuc e as imagens representam a atividade de luciferase em camundongos 7 a 10 min após a inoculação de luciferina. Quantificação do fluxo total de fótons (p/s) durante a reação de luminescência, 48 h (B) e 7 dias (C), após a inoculação de pLUC * P < 0.05; ** P < 0.01.

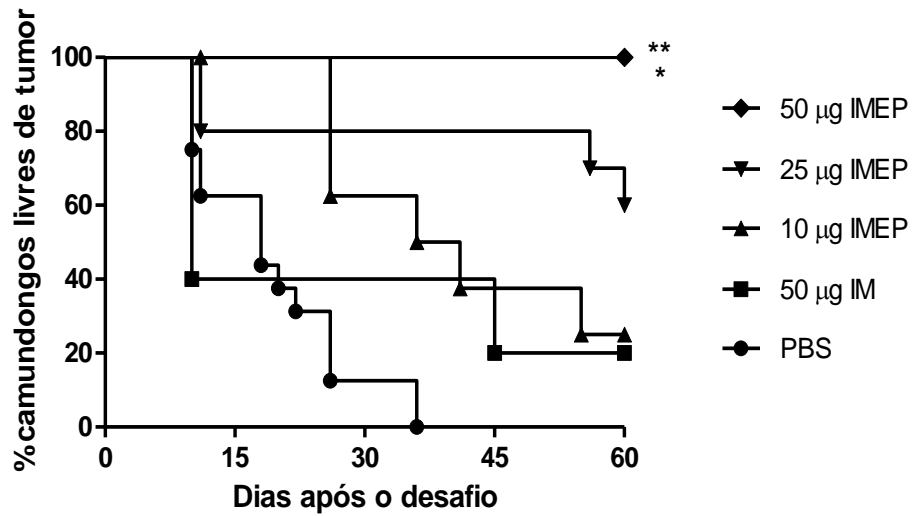
4.1.2 Análise da indução de efeito terapêutico antitumoral e da ativação de células T CD8⁺ pela imunização com o plasmídeo vacinal pgDE7h pelas vias i.m. e i.d. associadas à EP

Com o objetivo de avaliar o efeito da EP na indução da resposta antitumoral promovida pela vacina de DNA pgDE7h, camundongos C57BL/6 foram inoculados pela via s.c. com 7.5×10^4 células da linhagem tumoral TC-1 e após 3 dias imunizados em regime de dose única pela via i.m. com 50 µg (IM), ou pela via i.m. seguida da eletroporação (IMEP), com 10, 25 ou 50 µg do plasmídeo. O grupo controle recebeu apenas PBS pela mesma via sem eletroporação. A figura 4A apresenta a porcentagem de animais livres de tumores ao longo de 60 dias para os grupos mencionados acima. Como pode ser observada, a dose de 50 µg da vacina de DNA (sem eletroporação) foi capaz de promover proteção antitumoral de 20% dos animais imunizados. No entanto, a associação da EP aos grupos que receberam doses de 10 e 25 µg de pgDE7h levou à proteção antitumoral em 20% e 60% dos animais, respectivamente. Além disso, observamos que o uso da EP foi capaz de potencializar os

efeitos terapêuticos observados em animais vacinados com 50 µg, levando a 100% de proteção antitumoral por pelo menos 60 dias, apresentando diferença estatística em relação aos grupos imunizados com 50 µg da vacina e ao grupo controle PBS (Figura 4A).

Após observar a potencialização da proteção antitumoral com o uso da eletroporação, avaliou-se o envolvimento dos linfócitos T CD8⁺ na resposta antitumoral induzida pela vacina pgDE7h, associada ou não à eletroporação. Amostras de sangue foram obtidas 14 dias após a imunização e utilizadas para a marcação intracelular (ICS) de IFN-γ por linfócitos T CD8⁺E7⁺ como indicativo de ativação dessas células. A figura 4B mostra a porcentagem de linfócitos T CD8⁺IFN-γ⁺ E7-específicos em relação ao total de células T CD8⁺. De modo similar ao efeito observado na proteção antitumoral (Figura 4A), os resultados mostram que o uso da EP em animais imunizados com 50 µg levou ao aumento significativo da porcentagem de linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN-γ em relação ao grupo vacinado com 50 µg pela inoculação i.m. convencional, alcançando níveis próximos a 6%. Além disso, vale ressaltar que os grupos imunizados com as doses menores (10 e 25 µg) apresentaram níveis de T CD8⁺IFN-γ⁺ E7-específicos ainda maiores que o grupo que recebeu 50 µg de pgDE7h o qual foi mostrado-se estatisticamente semelhante ao grupo PBS.

A



B

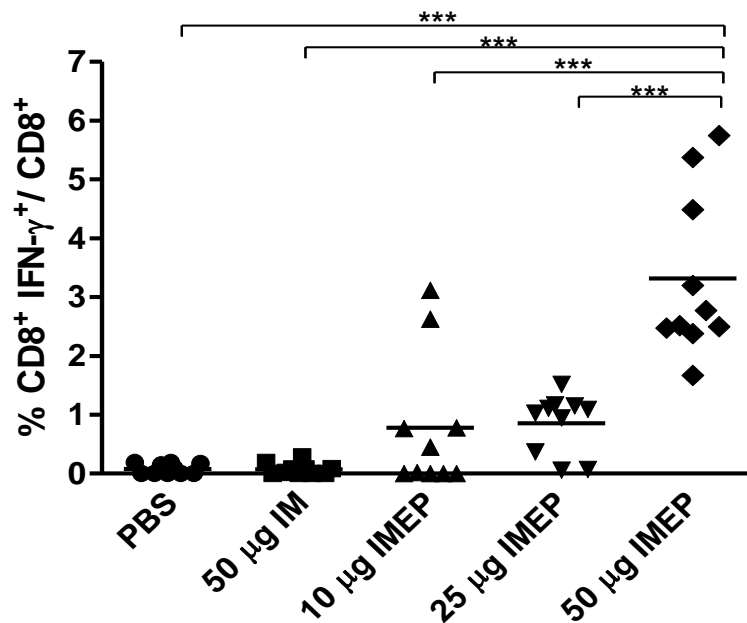
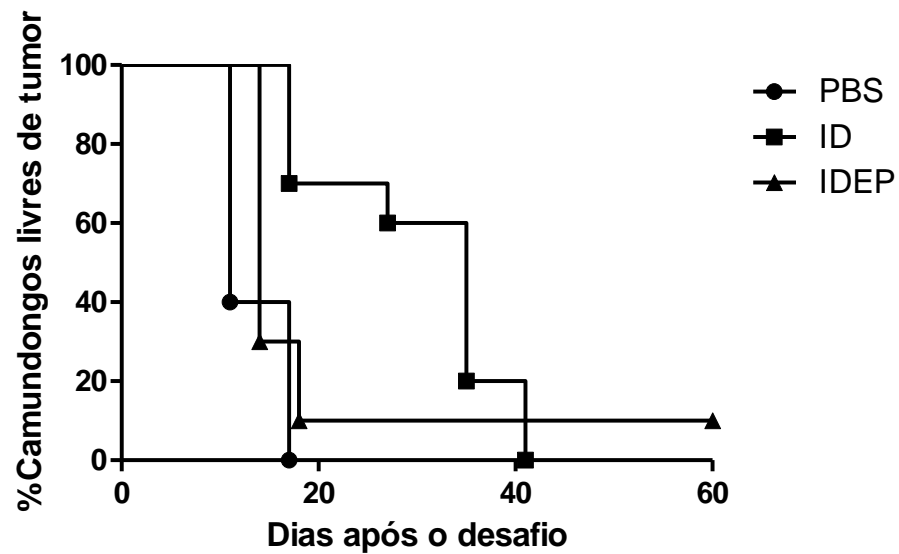


Figura 4: A associação da EP à vacina pgDE7h pela via i.m. promove o aumento dos níveis de proteção antitumoral terapêutica e da ativação de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos. Camundongos C57BL/6 fêmeas foram inoculados com $7,5 \times 10^4$ células/ animal da linhagem tumoral TC-1 pela via s.c. e 3 dias após o desafio foram imunizados com 50 µg do plasmídeo pgDE7h pela via i.m. (IM) ou com 10, 25 ou 50 µg da vacina pela via i.m. seguida de EP (IMEP). (A) Porcentagem de animais livres de tumores durante o acompanhamento da proteção antitumoral durante 60 dias após o desafio. * $P < 0.05$, teste Mantel Cox, * 50 µg EP vs 50 µg; ** 50 µg vs PBS (B) Porcentagem de células T CD8⁺ produtoras de IFN-γ em amostras de sangue coletadas 14 dias após a imunização. As células foram estimuladas com o peptídeo E7⁽⁴⁹⁻⁵⁷⁾ e os valores apresentados resultam da diferença em relação à expressão de IFN-γ por células não estimuladas, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0,001$.

Apesar de não se observar aumento significativo da expressão de luciferase em animais inoculados pela via i.d. com pLuc, esta mesma via foi testada com o plasmídeo vacinal com o intuito de se avaliar a proteção antitumoral terapêutica e a indução de células T CD8⁺ E7-específicas produtoras de IFN- γ promovida pela associação à eletroporação. Camundongos C57BL/6 foram desafiados com $7,5 \times 10^4$ células da linhagem tumoral TC-1 e, após 3 dias, imunizados com 50 μ g do plasmídeo pgDE7h pela via i.d. (ID) ou combinado à EP (IDEP). O grupo controle recebeu apenas PBS. A figura 5A apresenta o percentual de animais livres de tumores, e permite observar que, apesar de um discreto aumento da proteção antitumoral do grupo IDEP em relação ao grupo ID, não foi observada diferença estatística entre os grupos, apresentando proteção antitumoral correspondente a 0 e 10% de animais livres de tumores, respectivamente. A resposta de células T CD8⁺ também foi avaliada para os mesmos grupos em amostras de sangue coletadas 14 dias após a imunização, e analisada por citometria de fluxo (Figura 5B). Não foi observada diferença estatística entre os grupos ID e IDEP e nem em relação ao grupo PBS, apresentando níveis reduzidos de ativação de linfócitos T CD8⁺ IFN- γ ⁺ E7-específicos em relação aos obtidos com a vacinação pela via i.m. (Figura 4B).

A



B

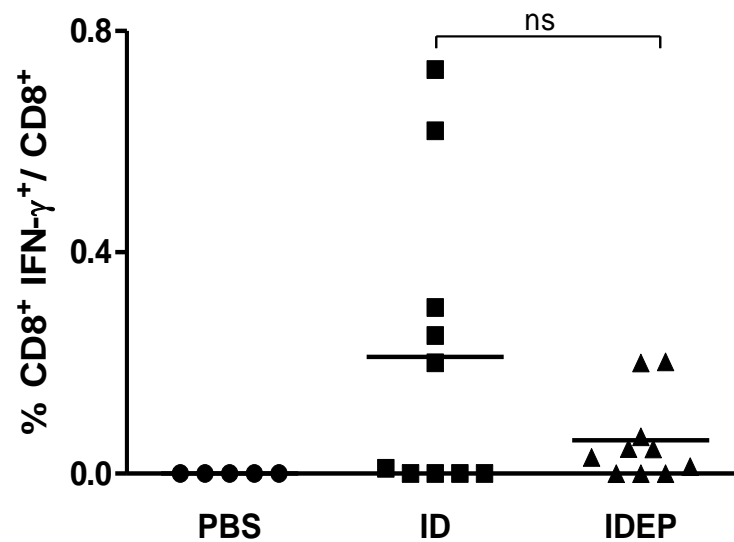


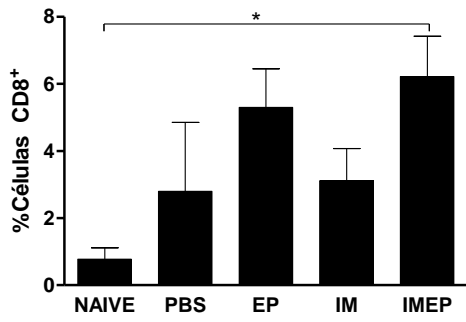
Figura 5: A imunização com a vacina pgDE7h pela via i.d. associada ou não à EP promove baixos níveis de proteção antitumoral terapêutica e de ativação de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos produtores de IFN- γ . Camundongos C57BL/6 fêmeas foram inoculados com $7,5 \times 10^4$ células/animal da linhagem TC-1 pela via subcutânea e 3 dias após o desafio imunizados pela via i.d. com 50 μ g do plasmídeo pgDE7h de forma convencional (ID) ou seguido de EP (IDEP). O grupo controle recebeu PBS após o desafio. (A) Porcentagem de animais livres de tumores durante o acompanhamento da proteção antitumoral durante 60 dias após o desafio. * P < 0.05, teste Mantel Cox. (B) Porcentagem de células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ em amostras de sangue coletadas 14 dias após a imunização. As células foram estimuladas com o peptídeo E7⁽⁴⁹⁻⁵⁷⁾ e os valores apresentados resultam da diferença em relação à expressão de IFN- γ por células não estimuladas. Não foi observada diferença estatística entre os grupos imunizados (ns). * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0,001

4.1.3 Efeitos da EP no recrutamento de células para o sítio de inoculação da vacina pgDE7h pelas vias i.m. e i.d.

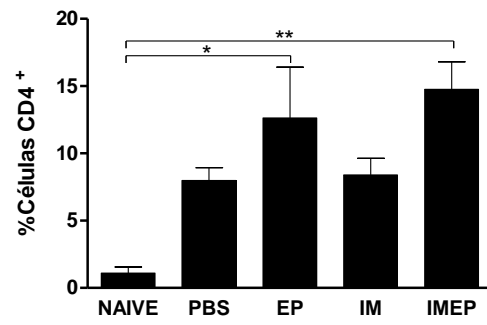
Após observação do efeito terapêutico da vacina pgDE7h associada à EP pelas duas vias de administração, o próximo passo foi avaliar o perfil de migração celular no sítio de imunização. Para tal, camundongos C57BL/6 foram inoculados com 50 µg da vacina pgDE7h pelas vias i.m. (IM) ou i.d. (ID) ou associada à EP (IMEP ou IDEP, respectivamente) e utilizamos como grupos controle animais inoculados com apenas o veículo vacinal (PBS), submetidos a pulsos elétricos (EP), ou animais sem manipulação (Naive). Em função da via de inoculação, amostras de pele ou músculo foram coletadas 48 h após à vacinação, processadas e incubadas com colagenase. Para monitorar as células recrutadas para o local da imunização, foram realizadas marcações de superfície para posterior análise por citometria de fluxo para avaliação da expressão das moléculas: CD8, CD4, CD19, CD11b/Gr1, CD11c, F4/80 e NK1.1.

Os resultados correspondentes à infiltração celular no músculo após a imunização por essas vias estão apresentados na figura 6. Células CD4⁺ e F4/80⁺ (Figura 6B e F) apresentaram níveis aumentados em relação ao grupo naïve em animais submetidos à eletroporação, associada ou não ao plasmídeo vacinal. Já em relação às células CD19⁺ e CD11b⁺Gr1⁺ (Figura 6C e D) apesar de se verificar a presença destas populações no músculo dos animais vacinados, não foi observado um aumento significativo das mesmas em comparação ao grupo naïve, sugerindo que tais células não estão envolvidas diretamente com o efeito terapêutico, mostrado anteriormente, para os grupos de vacinação. Em contrapartida, níveis aumentados de células CD8⁺, CD11c⁺ e NK1.1⁺ (Figura 6A, E, G) foram observados nos grupos submetidos à EP (EP e IMEP), com diferença estatística apenas para o grupo que recebeu a vacina (IMEP) em relação ao grupo controle Naïve. De um modo geral, a EP associada à vacina pgDE7h pela via i.m. induziu um aumento do influxo de células CD8⁺, CD4⁺, CD11c⁺, F4/80⁺ e NK1.1⁺, no local da imunização. Pela via i.d., no entanto, não foi possível observar aumento em nenhuma das frequências de células avaliadas, CD8⁺, CD4⁺, CD19⁺, CD11b/Gr1⁺, CD11c⁺, NK1.1⁺ e F4/80⁺ (Figura 7) na pele dos animais submetidos às mesmas condições estabelecidas para a via i.m..

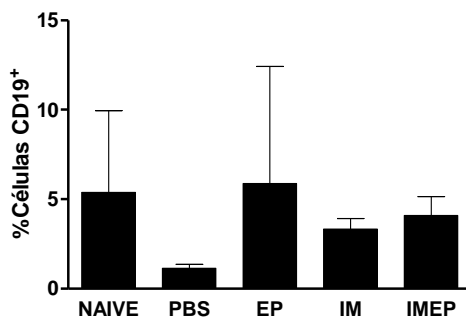
A



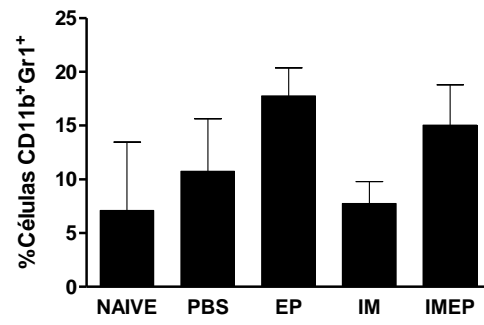
B



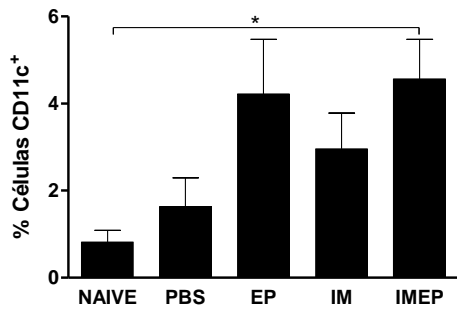
C



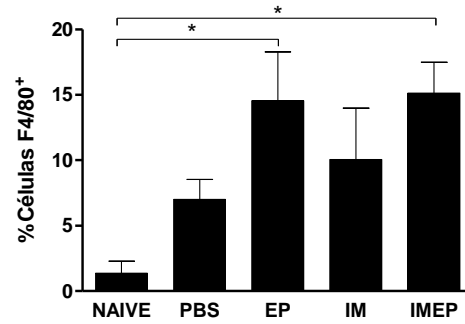
D



E



F



G

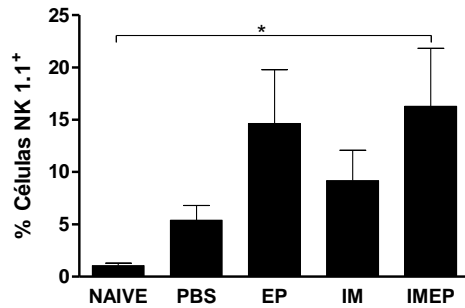
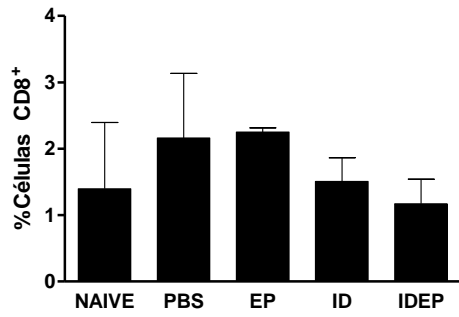
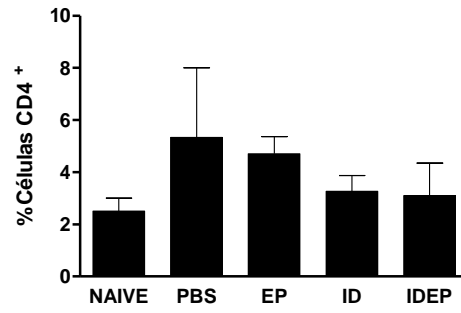


Figura 6: EP associada à imunização com o plasmídeo vacinal pgDE7h promove recrutamento de células do sistema imune para o sítio de inoculação pela via i.m. Camundongos C57BL/6 foram imunizados com 50 µg da vacina pgDE7h pela via i.m. (IM) apenas ou associada à EP (IMEP). Grupos controles receberam apenas PBS, ou pulsos elétricos (EP), ou não foram inoculados (Naive). Porcentagem de células positivas para a expressão das moléculas (A) CD8, (B) CD4, (C) CD19, (D) CD11b/Gr1, (E) CD11c, (F) F4/80 e (G) NK1.1, em relação às células totais de amostras provenientes do músculo. * P< 0.05; ** P< 0.01.

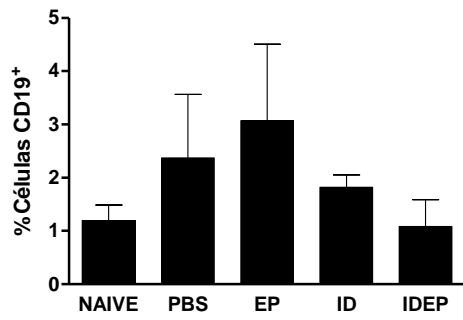
A



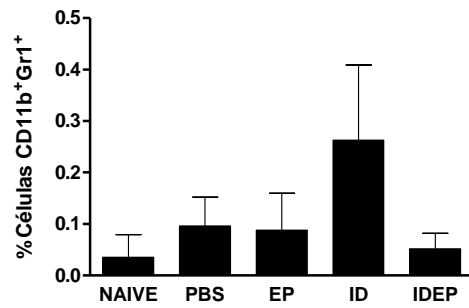
B



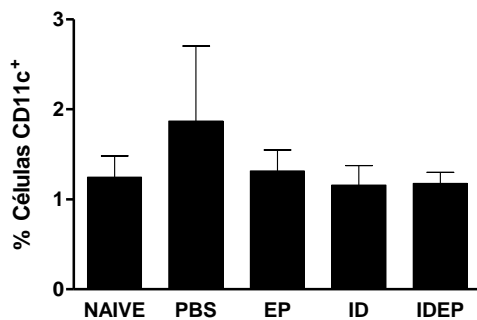
C



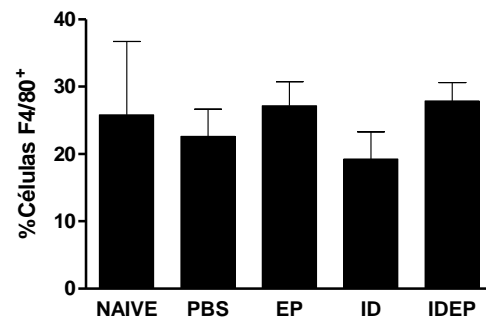
D



E



F



G

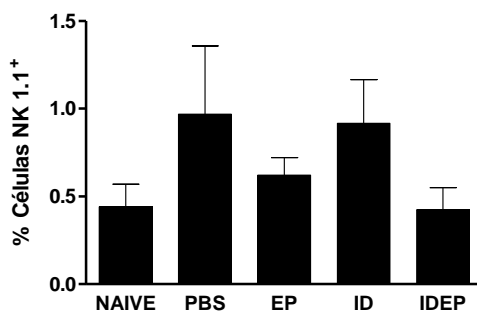


Figura 7: EP associada à imunização com o plasmídeo vacinal pgDE7h não altera o perfil celular do sítio de inoculação pela via i.d. Camundongos C57BL/6 foram imunizados com 50 µg da vacina pgDE7h pela via i.d. (ID) apenas ou associada à EP (IDEP). Grupos controles receberam apenas PBS, ou pulsos elétricos (EP), ou não foram inoculados (Naive). Porcentagem de células positivas para a expressão das moléculas (A) CD8, (B) CD4, (C) CD19, (D) CD11b/Gr1, (E) CD11c, (F) F4/80 e (G) NK1.1, em relação às células totais de amostras provenientes da pele. * P < 0.05; ** P < 0.01.

4.2 EFEITOS DA EP PELA VIA I.M. NA RESPOSTA CELULAR INDUZIDA PELA VACINA pgDE7h

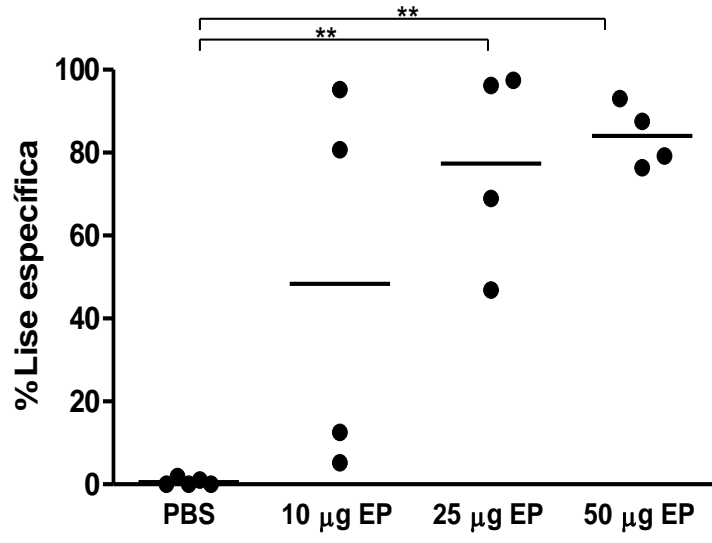
De acordo com os resultados obtidos após imunização pela via i.m., buscou-se investigar nesta etapa do trabalho, as características da resposta celular induzida capaz de conferir proteção total antitumoral terapêutica em animais submetidos à EP. A capacidade citolítica dos linfócitos ativados após as imunizações foi avaliada pelo ensaio de citotoxicidade *in vivo*. Grupos de camundongos C57BL/6 foram imunizados pela via i.m. em regime de dose única com: 10, 25 ou 50 µg de pgDE7h associados à EP, ou 50 µg da vacina de DNA sem eletroporação. O grupo controle recebeu apenas PBS. Após 14 dias, os animais receberam uma mistura de esplenócitos de camundongos não imunizados, pulsadas com um peptídeo derivado da proteína E7 (48-57) de HPV-16 e marcadas com 5 µM do corante CFSE (células alvo), ou 0,5 µM de CFSE e não pulsadas com estímulo (células controle). Os baços dos

animais imunizados foram coletados para análise de células marcadas com CFSE por citometria de fluxo 20 h após a inoculação das mesmas. A redução do número das células alvo em relação às células controle indica a atividade citotóxica mediada por linfócitos T CD8⁺.

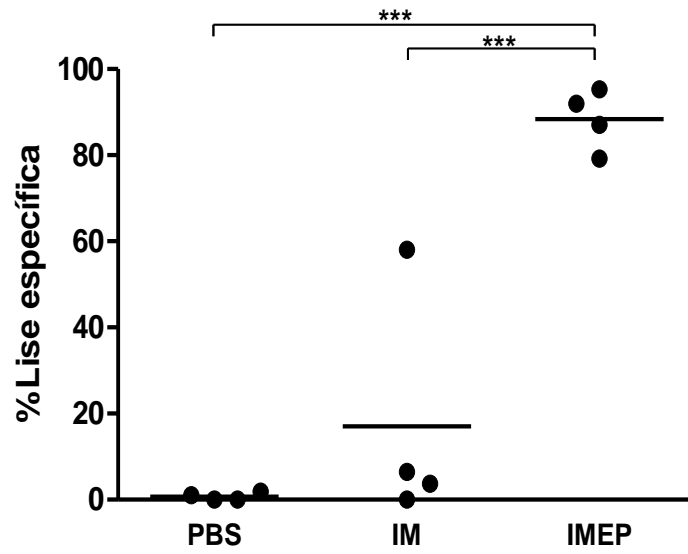
Na figura 8A é possível observar que os grupos que receberam as doses pela via i.m. associadas à EP apresentaram porcentagens de lise específicas iguais ou superiores a 50 e 80%, respectivamente, apresentando diferença estatística em relação ao grupo controle. Comparando animais imunizados com 50 µg da vacina pgDE7h pela via i.m. associada ou não à EP, observou-se que o grupo IM apresentou porcentagens de lise específica inferiores a 20% em média, destacando-se mais uma vez o grupo IMEP, que apresentou diferenças estatísticas quando comparado aos grupos PBS e IM (Figura 8B).

Para confirmar os dados de citotoxicidade *in vivo*, relacionando-os com a capacidade de degranulação das células T CD8⁺ mediante a um estímulo antigênico, analisamos a expressão da molécula CD107a em linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN-γ, seguindo o mesmo protocolo de imunização descrito acima. Os dados da figura 5C mostram que duas semanas após a vacinação, o grupo IMEP apresentou os maiores níveis de expressão da molécula CD107a em células T CD8⁺ ativadas E7-específicas, permitindo observar-se uma diferença estatística em relação ao grupo IM. Os resultados mostram que a EP associada à imunização com 50 µg do plasmídeo pgDE7h promove aumento da atividade citolítica de linfócitos T CD8⁺ antígeno-específicos.

A



B



C

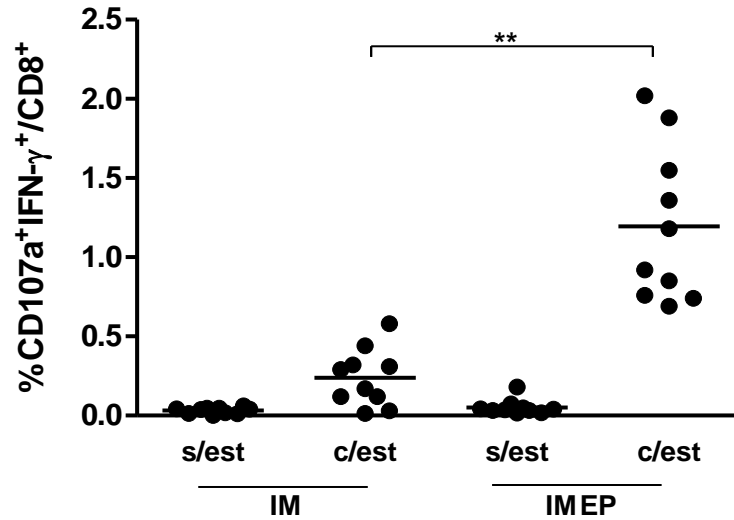


Figura 8: Vacina pgDE7h administrada pela via i.m. seguida de EP promove aumento da expressão da molécula CD107a e da atividade citotóxica de células T CD8⁺. Camundongos C57BL/6 foram desafiados com $7,5 \times 10^4$ células da linhagem tumoral TC-1 pela via s.c.. Após três dias, grupos foram imunizados pela via i.m. em regime de dose única e as análises foram realizadas 14 dias após a imunização. Porcentagem de lise específica no ensaio de citotoxicidade *in vivo* em grupos de animais que receberam 10, 25 ou 50 µg de DNA combinada à EP (A), ou que receberam 50 µg da vacina associada ou não à EP (IMEP e IM, respectivamente) (B). Os dados apresentados são representativos de um experimento, de um total de dois realizados (n=4). (C) Porcentagens de células T CD8⁺ capazes de expressar simultaneamente CD107a⁺ e IFN-γ⁺ em relação ao total de células CD8 presentes no baço. As amostras foram incubadas com (c/est) ou sem (s/est) estímulo, referindo-se ao peptídeo E7. Os animais foram imunizados com 50 µg da vacina associada ou não à EP (IMEP e IM, respectivamente). Os dados apresentados correspondem aos resultados de dois experimentos combinados (n=6). * P< 0.05; ** P< 0.01; *** P< 0,001.

Após observação dos resultados de indução de linfócitos T CD8⁺ específicos com a vacinação i.m. associada à EP, buscou-se avaliar a força da interação dessas células pelo peptídeo E7 utilizado nos ensaios de resposta celular (Figura 4), fenômeno conhecido por avidéz celular. Neste ensaio, esplenócitos de animais imunizados com uma dose de 50 µg de pgDE7h por via i.m. (IM) ou associada à EP (IMEP) foram coletados 14 dias após a imunização e incubados com diluições seriadas do peptídeo E7⁽⁴⁹⁻⁵⁷⁾, com as concentrações variando entre 0,001 e 3 µg/mL e então submetidos à marcação extracelular de CD8⁺ intracelular de IFN-γ⁺. Os dados obtidos nos permitem observar que o grupo IM, gerou níveis significativos de células T CD8⁺ capazes de secretar IFN-γ quando incubadas com o peptídeo

a partir da concentração de 0,01 $\mu\text{g/mL}$, enquanto que para o grupo IMEP, tal concentração foi reduzida em 10 vezes onde observa-se indução de resposta celular específica a partir de 0,001 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 9). Esse conjunto de dados permite observar que a eletroporação, quando associada a diferentes doses do plasmídeo pgDE7h, induz aumento da atividade citotóxica dos linfócitos ativados. Entretanto, quando combinado a dose de 50 μg de DNA, observamos um aumento da atividade citotóxica e da avides das células T CD8^+ pelo peptídeo E7 específico em relação à vacinação i.m. convencional, confirmando o potencial do uso da EP para indução de resposta celular específica.

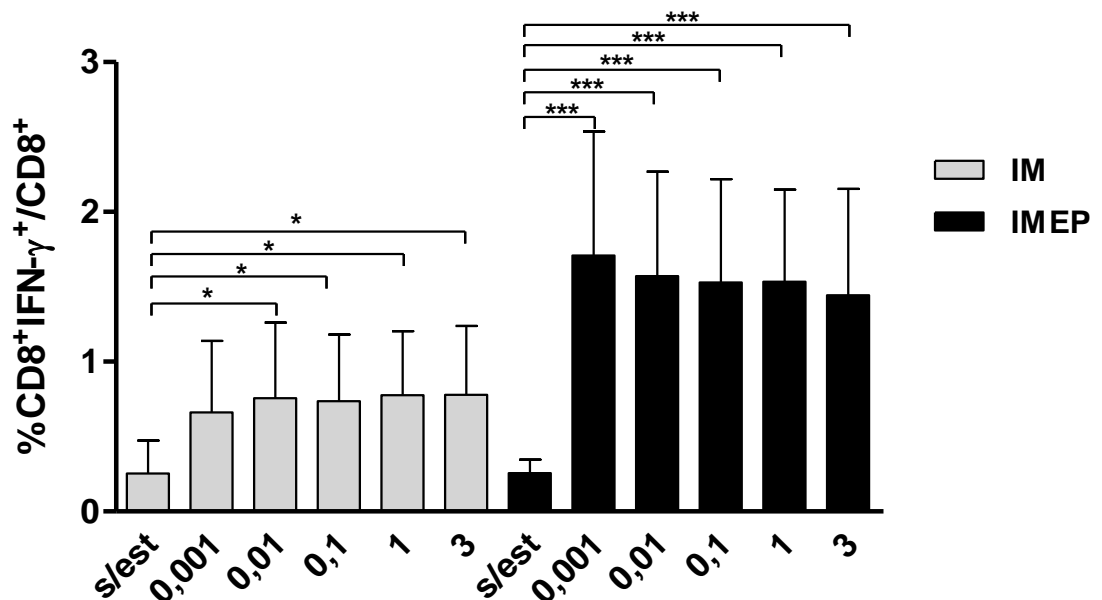
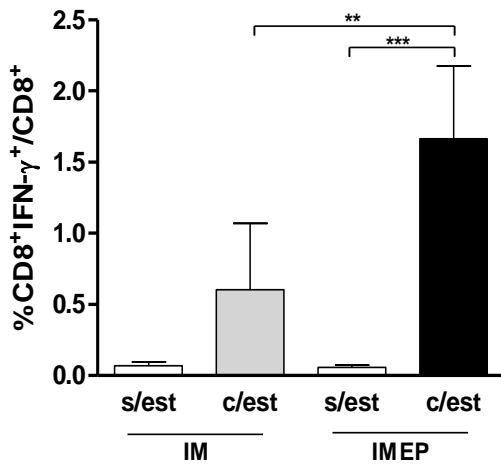


Figura 9: Administração da vacina pgDE7h pela via i.m. seguida de EP promove aumento de avides em células T CD8^+ . Camundongos C57BL/6 foram desafiados com $7,5 \times 10^4$ células da linhagem tumoral TC-1 pela via s.c.. Após três dias, os animais foram imunizados com 50 μg da vacina combinada (IMEP) ou não à EP (IM) pela via i.m. em regime de dose única. Os baços dos animais foram removidos 14 dias após a imunização e incubadas com diferentes concentrações do peptídeo E7 CD8^+ -específico (0,001; 0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1 e 3 $\mu\text{g/mL}$). Os valores indicam as porcentagens de células T CD8^+ produtores de IFN- γ sem ou com estímulo (n=6, resultados de 2 experimentos combinados, de um total de 3 experimentos realizados). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

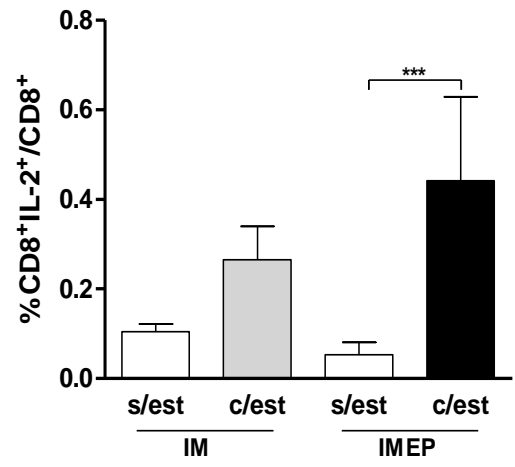
A partir dos resultados obtidos, propôs-se avaliar a capacidade dos linfócitos T CD8^+ ativados pela vacinação em produzirem outras citocinas, além de IFN- γ , que podem sugerir

uma polifuncionalidade dessas células na indução da resposta celular efetora. De fato, a imunização com a vacina pgDE7h associada à EP induziu níveis de expressão das citocinas IFN- γ , IL-2 ou TNF- α aumentados em comparação à vacinação convencional (IM), com diferença estatística entre esses grupos (Figuras 10A-C). Quando avaliada a frequência de linfócitos T CD8⁺ respondedores, isto é, capazes de produzir algumas das citocinas (IFN- γ ou IL-2 ou TNF- α) (Figura 10 D), a associação da EP à vacina pgDE7h pela via i.m. (IMEP) promoveu o aumento de produção das destas citocinas em relação ao grupo que recebeu a vacina pela inoculação convencional (IM). Já em relação à combinação da expressão por células T CD8⁺ E7-específicas das três citocinas mencionadas (Figura 10E), a vacinação associada à EP (IMEP) induziu níveis aumentados de células T CD8⁺ produzindo duas das três citocinas combinadas (IFN- γ e TNF- α), sugerindo uma característica de polifuncionalidade dos linfócitos induzidos pela vacinação.

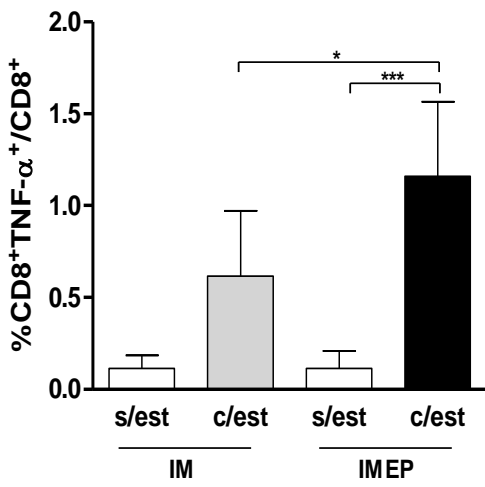
A



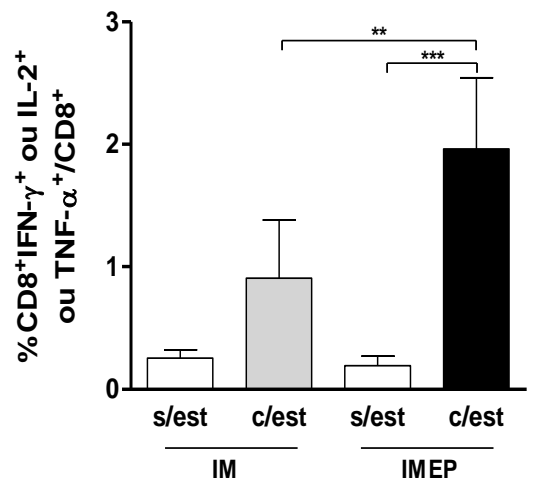
B



C



D



E

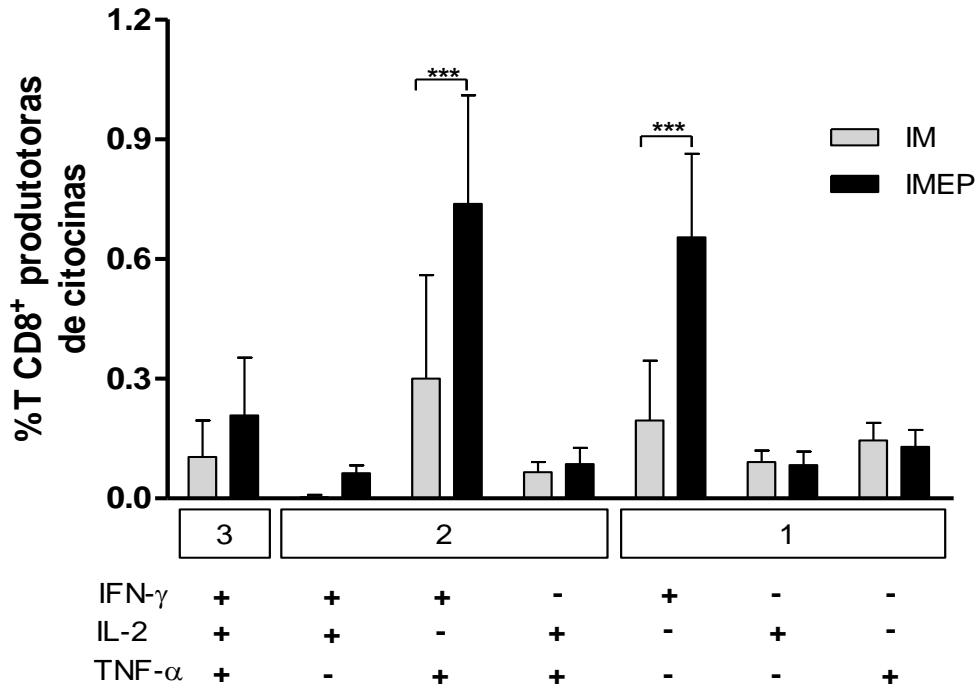


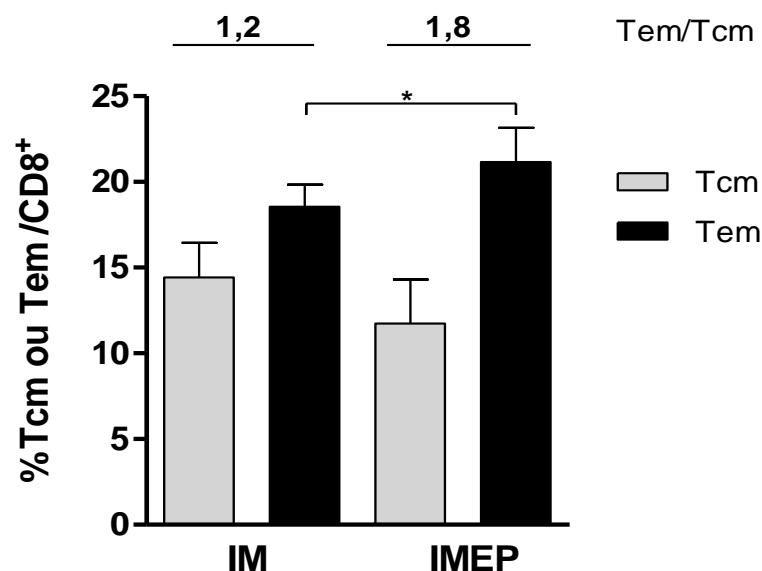
Figura 10: Administração da vacina pgDE7h pela via i.m. associada à EP induz a produção de IFN- γ , TNF- α e IL-2 por células T CD8⁺ E7-específicas. Camundongos C57BL/6 foram desafiados com $7,5 \times 10^4$ /animal de células TC-1 e vacinados após 3 dias com 50 μ g de DNA do plasmídeo pgDE7h pela via i.m. associada (IMEP) ou não (IM) à eletroporação. Os baços dos animais foram coletados 14 dias após a imunização e as células foram estimuladas e analisadas por citometria de fluxo para detectar a expressão de IFN- γ , IL-2 e TNF- α em células T CD8⁺. Porcentagem de células T CD8⁺ capazes de expressar individualmente (A) IFN- γ , (B) IL-2 e (C) TNF- α . (D) Magnitude da resposta expressa na forma de porcentagem de células T CD8⁺ capazes de produzir alguma das citocinas (IFN- γ ou TNF- α ou IL-2). (E) Porcentagem de células T CD8⁺ capazes de expressar 1, 2 ou as 3 das citocinas avaliadas, incluindo as diferentes combinações possíveis das mesmas. (n=6, resultados de um experimento representativo, de um total de 3 experimentos realizados). * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001.

Em seguida, com o objetivo de investigar a indução de células T de memória promovida pela combinação da vacina com a eletroporação, animais receberam 50 μ g de pgDE7h administrada pela via i.m. convencional (IM) ou associada a essa técnica (IMEP). Os esplenócitos dos animais vacinados foram obtidos 14 dias após a imunização e incubados com o peptídeo E7 para análise de ativação de células de memória através do monitoramento da produção de IFN- γ . Além da marcação de superfície para moléculas de CD8, as células foram

marcadas com anti-CD44 e anti-CD62L, permitindo a distinção entre células T CD8⁺ de memória central (CD44⁺CD62L⁺; Tcm) e efetora (CD44⁺CD62L⁻; Tem).

Os resultados demonstram que não houve diferença estatística na frequência de células T CD8⁺ de memória central (Tcm) entre os grupos IM e IMEP (Figura 11A). Entretanto, considerando a população de células T CD8⁺ de memória efetora (Tem), o grupo IMEP apresentou maior porcentagem de indução desse fenótipo celular em relação ao grupo IM, apresentando diferença estatística entre os grupos. A razão entre a frequência de Tem e Tcm (Tem/Tcm) no grupo IM foi de 1,2 e 1,8 no grupo IMEP, demonstrando uma polarização para memória efetora com a associação da eletroporação. A avaliação da produção de IFN- γ por células T CD8⁺ de memória efetora e central, indicou que o grupo que recebeu a vacina associada à EP apresentou uma maior quantidade de células Tem produtoras de IFN- γ em relação ao grupo IM, apresentando diferenças estatísticas entre os mesmos (Figura 11B). Em ambos os grupos, a produção de IFN- γ por Tcm não atingiu níveis detectáveis pelo ensaio realizado (dados não mostrados). Em resumo, notamos que a imunização utilizando 50 μ g do plasmídeo vacinal pgDE7h pela via i.m. combinado à EP induziu maior frequência e ativação de células T CD8⁺ de memória efetora.

A



B

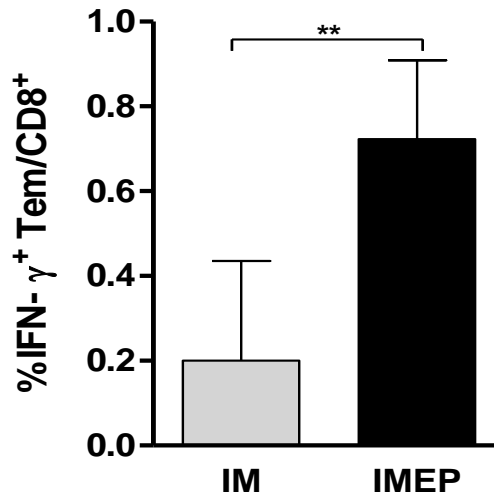
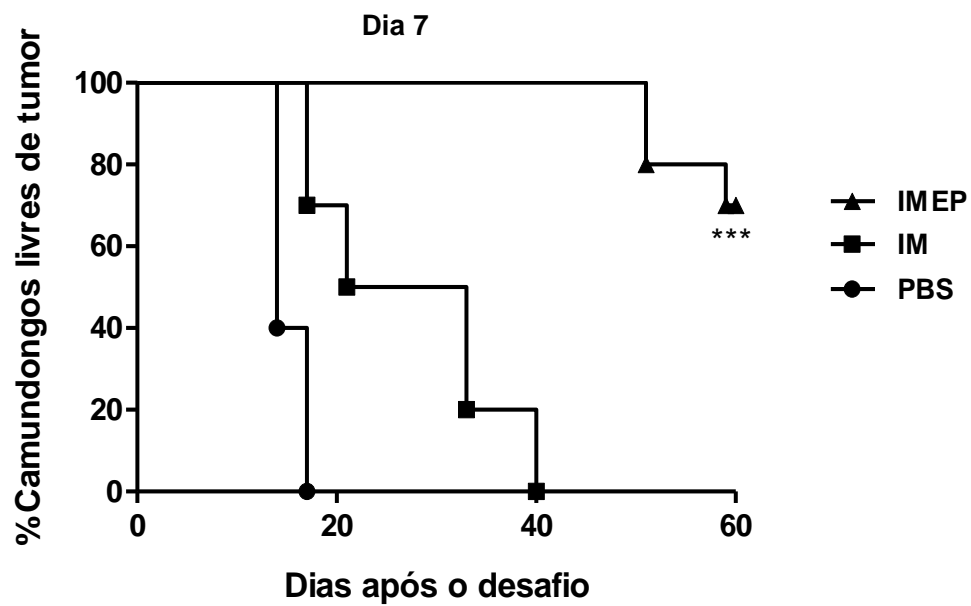


Figura 11: Administração do plasmídeo pgDE7h pela via i.m. associado à EP, induz resposta de células T CD8⁺ de memória efetora. Camundongos C57BL/6 foram desafiados com $7,5 \times 10^4$ /animal de células TC-1 e após 3 dias, grupos foram imunizados pela via i.m. com 50 μ g de DNA pela forma convencional (IM) ou combinada à EP (IMEP). O baço dos animais foi coletado 14 dias após a imunização, as células estimuladas com peptídeo E7, submetidas à marcação extracelular de moléculas CD8, CD44 e CD62L e intracelular de IFN- γ e analisadas por citometria de fluxo. (A) Porcentagens de células de memória central (CD8⁺CD44⁺CD62L⁺; Tcm) e efetora (CD8⁺CD44⁺CD62L⁻; Tem) (CD8⁺CD44⁺CD62L⁺) dentro da população CD8⁺. Valores na parte superior do gráfico representam a relação Tem/Tcm para os diferentes grupos de imunização. (B) Porcentagens de células Tem produtoras de IFN- γ dentro da população CD8⁺. * P < 0.05; ** P < 0.01.

Por fim, e diante dos resultados promissores obtidos com a vacinação associada à EP, pela via i.m., avaliou-se a eficácia desta estratégia vacinal contra tumores já estabelecidos, realizando a imunização 7 ou 10 dias após o desafio com as células TC-1, quando os tumores são palpáveis e possuem aproximadamente 2 mm de diâmetro (Figura 12). Os animais foram vacinados com 50 μ g do plasmídeo pgDE7h pela via i.m., seguido ou não de EP (IMEP ou IM, respectivamente). Os dados mostram que, animais dos grupos IM imunizados 7 ou 10 após o desafio tumoral, apresentam um atraso na evolução do crescimento tumoral, mas todos os animais desenvolveram tumores. Entretanto, quando associada à EP (IMEP), os animais imunizados tanto 7 ou 10 dias após o desafio, apresentaram 70% de proteção antitumoral, permanecendo livres de tumor até o final do período de monitoramento (60 dias), podendo ser observada uma total regressão do tumor na maioria dos animais imunizados.

A



B

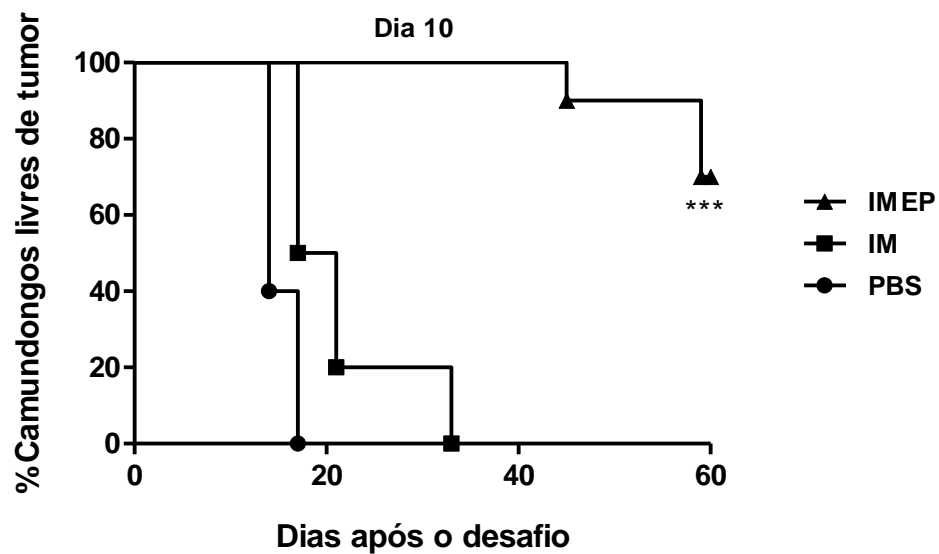


Figura 12: EP associada à vacina pgDE7h pela via i.m. promove proteção antitumoral terapêutica em camundongos com tumores pré-estabelecidos. Camundongos C57BL/6 foram desafiados com $7,5 \times 10^4$ células TC-1 pela via s.c. e imunizados pela via i.m. com 50 μ g do plasmídeo pgDE7h seguida (IMEP) ou não (IM) de EP 7 ou 10 dias após o desafio. Porcentagem de animais livres de tumores em grupos de animais imunizados 7 (A) ou 10 (B) dias após o implante das células tumorais. O grupo controle recebeu PBS 7 dias após o desafio. O acompanhamento da proteção antitumoral foi realizado durante 60 dias após o desafio.*** IMEP vs IM. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

5 DISCUSSÃO

A baixa eficácia das vacinas de DNA em ensaios clínicos impulsionou o desenvolvimento de diversas estratégias capazes de aumentar a imunogenicidade dessas vacinas em humanos, destacando-se entre elas a EP *in vivo* como método de entrega do DNA plasmidial. No presente trabalho, utilizamos essa técnica com o objetivo de potencializar uma vacina de DNA contra tumores associados ao vírus HPV-16 (pgDE7h), em modelo murino. Os resultados demonstraram que a associação da EP à vacina, quando administrada pela via i.m., promoveu um aumento na proteção antitumoral induzida e na ativação de células T CD8⁺ antígeno-específicas. O efeito observado está de acordo com a maior indução de transfecção celular e do influxo de células para o sítio de inoculação, evidenciados pela associação da EP à administração de plasmídeos por essa via. A utilização da EP *in vivo* para a entrega de vacinas de DNA pela via i.m. mostrou-se uma técnica a ser considerada para aumentar as chances de sucesso do plasmídeo vacinal em um futuro ensaio clínico.

A contribuição da EP *in vivo* para as respostas imunológicas induzidas por vacinas de DNA é frequentemente associada a um aumento na quantidade de células transfectadas pelo DNA plasmidial, o que acarretaria em um aumento na expressão do gene codificado. A transfecção celular facilitada pela EP ocorre pelo aumento da permeabilidade da membrana promovido por um pulso elétrico, com consequente aumento de captação de DNA e transferência de genes para o interior da célula, dessa forma, aumentando a transfecção *in vivo* (DAYBALL et al., 2003; PENG et al., 2007; ROOS et al. 2009; VANDERMEULEN et al., 2015). A capacidade da EP de promover o aumento da transfecção *in vivo* foi demonstrada em trabalhos que estudam vacinas de DNA contra tumores induzidos por HPV-16 (SUN et al., 2015), hepatite C (AHLÉN et al., 2007) e melanoma (KALAT et al., 2002). Alguns trabalhos demonstraram que a EP pode aumentar a eficiência de uma vacina de DNA, induzindo um aumento da expressão gênica de até 1.000 vezes (GOTHELF; GEHL, 2012; ZUCCHELLI, et al., 2000).

Em nosso trabalho, entretanto, não observamos efeitos benéficos da EP em relação ao aumento de expressão gênica pela via i.d., que apresentou semelhante atividade enzimática da luciferase após a inoculação do plasmídeo pLuc por essa via, independentemente da eletroporação. A via i.d., além de ser de fácil acesso e pouco invasiva, apresenta interesse do ponto de vista da entrega antigênica, pois a pele é um tecido rico em células apresentadoras de antígenos (CUI; DIERLING; FOLDVARI, 2006), capazes de captar os antígenos, migrar para

os linfonodos e apresentar eficientemente esses antígenos para células T, (BRODERICK; KHAN; SARDESAI, 2014; NICOLAS; GUY et al., 2008; PEACHMAN; RAO; ALVING, 2003; TIMARES et al., 2003). Por outro lado, quando utilizamos a técnica da EP associada à inoculação i.m. foi verificado um pronunciado aumento da expressão da proteína luciferase. Apesar de o músculo apresentar baixa frequência de APCs, este sítio também pode ser explorado com êxito para a administração de vacinas de DNA com a eletroporação. A célula muscular, transfectada pelo DNA vacinal, é capaz de produzir o antígeno, aumentar a expressão de moléculas de MHC I e outras moléculas co-estimulatórias o que leva à produção de citocinas e quimiocinas e promoção de um ambiente pró-inflamatório (BABIUK et al., 2002; KALAT et al., 2002; SHIROTA et al., 2007). De fato, em nossos estudos verificamos que, no músculo, a EP contribuiu para a migração de células *natural killer* (NK) e células que expressam as moléculas F4/80 ou CD11c, sugerindo a presença de macrófagos e células dendríticas no sítio da inoculação, além da infiltração de células CD4⁺ e CD8⁺. Os resultados obtidos para a via i.m. mostraram que esse influxo de células está particularmente relacionado à administração de pulsos elétricos e não ao DNA plasmidial, visto que animais que receberam apenas a EP apresentaram resultados semelhantes aos que receberam a EP associada à inoculação com DNA. Outros estudos demonstraram que a EP, além de aumentar a eficiência de transfecção, também é capaz de promover uma inflamação local, induzindo a produção de citocinas inflamatórias e o recrutamento de células do sistema imune como monócitos, macrófagos (LEBLANC et al., 2008; LUXEMBOURG et al., 2006;), células dendríticas, células natural killer, (AIHARA et al., 1998; BEST et al., 2009; LØVÅS et al., 2014; MIR et al., 1999), células B e T infiltradas (LIU et al., 2008), tornando o ambiente mais propício para a apresentação de antígenos e o desencadeamento de uma resposta imune efetiva.

Em contrapartida, associando-se o plasmídeo vacinal à EP pela via i.d. nas condições testadas, não foi possível observar um influxo de células pró-inflamatórias para o sítio de imunização. No entanto, observou-se a uma grande quantidade de células F4/80⁺ na pele, mas de forma independente de qualquer inoculação (também no animal naíve), fenótipo que pode ser associado à elevada frequência de células Langerhans nesse tecido, podendo ser caracterizado pela expressão em maior quantidade da molécula F4/80 e, em baixos níveis, CD11c (LIN et al., 2005; MCKNIGHT; GORDON, 1998). Alguns estudos demonstraram que a EP promove o aumento da transfecção de células na pele favorecendo a potência de vacinas de DNA (GLASSPOOL-MALONE et al., 2000; HELLER et al., 2001; LAMOLINARA et al., 2015; VANDERMEULEN et al., 2015). Nas condições avaliadas em nosso protocolo vacinal

baseado na administração pela via i.d., a vacina não foi capaz de conferir resposta antitumoral, ou induzir um aumento nas respostas imunológicas celulares. Esses resultados estão em acordo com os demais resultados obtidos pela via i.d., que indicaram que a EP não foi capaz de aumentar a transfecção de células, ou promover um influxo de células pró-inflamatórias para o sítio de inoculação.

A introdução da EP em nosso protocolo vacinal, quando administrada pela via i.m., promoveu o aumento da eficácia antitumoral da vacina. Apenas uma dose de 50 µg do plasmídeo pgDE7h, seguida de EP foi capaz de elevar em até cinco vezes o efeito terapêutico antitumoral em comparação à administração convencional e contribuiu para o aumento expressivo da indução de células T CD8⁺ IFN-γ⁺, promovendo uma resposta homogênea entre o grupo de animais, mesmo em regime de dose única. Nossos dados são condizentes com a literatura, que mostram a contribuição da EP em aumentar a potência de vacinas de DNA administradas pela via i.m. (DAYBALL et al., 2003; WIDERA et al., 2000), com aumento da proteção antitumoral e indução de resposta imune celular efetiva em modelos animais (AHMAD; MIYAZAKI, 2010; BEST et al., 2009; OHLSCHLAGER et al., 2011; ZHAO et al., 2006) e também em humanos (BAGARAZZI et al., 2014). A baixa eficácia da associação da EP à vacina de DNA pela via i.d., comparando-se aos resultados gerados pela via i.m. de imunização, pode estar associada a fatores como a utilização de um eletrodo em pinça não perfurante na via i.d. e a própria inoculação do DNA nesse sítio, que apresenta maior dificuldade técnica que a inoculação pela via i.m. Os efeitos obtidos pela via i.d. de imunização em combinação com a EP poderiam ser otimizados alterando algumas condições do protocolo vacinal empregado, como a quantidade de doses e de DNA, a voltagem e quantidade de pulsos aplicados, ou o próprio eletrodo. Por outro lado, o aumento da proteção antitumoral e respostas celulares obtidas seguindo o protocolo testado empregando a via i.m. como sítio de entrega da vacina de DNA combinada à eletroporação, foram coerentes com os maiores níveis de transfecção *in vivo* e de indução de migração de células imunológicas para o sítio de inoculação por essa via, apontando a via i.m. como a mais promissora a ser explorada em nosso estudo.

A partir dos resultados gerados anteriormente com a associação da EP pela via i.m. de imunização, como forma de potencializar os efeitos antitumorais e a ativação de células T CD8⁺ antígeno-específicas, buscamos definir as características da resposta celular induzida, buscando identificar como a EP favorece essa resposta. Em nosso trabalho, os efeitos da EP foram capazes de melhorar as respostas induzidas após a vacinação, elevando os níveis de

expressão da molécula CD107a em linfócitos T CD8⁺IFN- γ ⁺E7⁻-específicos. Observamos também, em ensaios de citotoxicidade *in vivo*, que a EP associada à vacina elevou a atividade citotóxica contra o epítipo CD8 presente em E7. Outros trabalhos mostram que a molécula CD107a é um marcador exposto exclusivamente durante a degranulação de linfócitos T citotóxicos, indicando que a célula T CD8 é uma CTL, e ressaltam a importância desses linfócitos com perfil citotóxicos na eliminação de células tumorais induzidas pelo vírus HPV (BETTS et al., 2003; BETTS et al., 2006; BAGARAZZI et al., 2014; KIM et al., 2014; MALDONADO et al., 2014; NAKAGAWA et al., 2000).

Além da entrega da vacina pgDE7h pela via i.m. pelo método de EP ter contribuído para aumentar o efeito antitumoral terapêutico e a resposta celular mediada por linfócitos T CD8 citotóxicos, também observamos que esse método de entrega contribuiu para o aumento da avidéz dos linfócitos ativados. Avidéz pode ser definida como a quantidade de peptídeo necessária para a ativação da função efetora, ou seja, é a capacidade de força total da interação entre os linfócitos T citotóxicos e a célula alvo (KROGER; ALEXANDER-MILLER, 2007; SANDBERG et al., 2000). Pudney e colaboradores demonstraram em seu estudo, que o aumento de avidéz foi capaz de promover atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* (PUDNEY et al., 2010). Dessa forma, a introdução da EP em nossa formulação vacinal, foi capaz de acentuar a avidéz dos linfócitos T CD8⁺ pelo antígeno e aumentar sua capacidade efetora, conferindo total efeito terapêutico antitumoral.

Ainda, a administração da vacina seguida de EP promoveu o aumento da produção das citocinas IFN- γ , IL-2 e TNF- α , e de IFN- γ e TNF- α simultaneamente. A secreção dessas citocinas indica o favorecimento de um perfil Th1 de resposta imune. A indução desse tipo resposta pode ser associada ao controle da progressão do câncer cervical, como mostrado em alguns trabalhos (BAIS et al., 2005; DELIGEOROGLOU et al., 2013; KIM et al., 2014; PEGHINI et al., 2012;). A introdução da EP em nossa estratégia vacinal induziu o aumento de células T de memória efetora, conferindo outra vantagem importante na resposta gerada após a imunização. A indução de células de memória efetora é um fator importante para a eficácia de uma vacina (KAECH; WERRY; AHMED, 2002; WHERRY; AHMED, 2004) e considerado um fator crítico na eliminação células infectado pelo HPV (NAKAGAWA et al., 2002).

Com o desdobramento do nosso estudo, alteramos nosso protocolo vacinal, realizando imunizações tardiamente, e a aplicação da EP conseguiu manter parte da eficácia antitumoral

vista no protocolo anterior, sugerindo que nossa estratégia vacinal combinada à EP pode ser utilizada para tratamento de tumores avançados. O conjunto de dados apresentados demonstra que o uso da EP como método de entrega do plasmídeo vacinal pgDE7h foi capaz de potencializar a eficácia da vacina, promovendo o aumento da proteção antitumoral terapêutica contra tumores que expressam as proteínas E6 e E7 do HPV-16, além de aumentar os níveis de resposta celular específica e efetora. Desta maneira, o trabalho consolidou o uso da EP como método potencial para entrega de vacinas de DNA, em especial de caráter terapêutico, tornando-se um forte candidato vacinal para futuros ensaios clínicos.

6 CONCLUSÕES

- A EP foi capaz de aumentar a eficiência de transfecção *in vivo* do plasmídeo que expressa o gene repórter da luciferase, quando administrado pela via i.m..
- A EP combinada a administração de 50 µg da vacina pgDE7h pela via i.m. foi capaz de gerar uma migração de diversas células do sistema imunológico para o sítio de inoculação, como células NK, e células expressando as moléculas F4/80 e CD11c.
- Apenas uma dose de 50 µg do plasmídeo vacinal pgDE7h combinada à EP pela via i.m. foi capaz de induzir proteção antitumoral terapêutica em camundongos 100% dos animais imunizados e indução de níveis expressivos de resposta celular mediada por linfócitos T CD8⁺E7-específica, capazes de secretar a citocina IFN-γ.
- O uso da EP como método de entrega da nossa de DNA plasmidial pela via i.d. não foi capaz de induzir aumento da transfecção celular *in vivo*, influxo de células pró-inflamatórias para o sítio de inoculação, respostas celulares antígeno-específicas, ou proteção antitumoral terapêutica, não se mostrando uma via de imunização promissora nas condições testadas.
- A utilização da EP para a entrega da vacina de DNA pgDE7h pela via i.m., foi capaz de aumentar o estado efetor dos linfócitos T ativados, induzindo em níveis elevados, a expressão da molécula CD107a em linfócitos T CD8⁺E7-específicos capazes de secretar a citocina IFN-γ, induzindo a degranulação, aumento do efeito citolítico E7-específico e da maior avides desses linfócitos.
- A estratégia vacinal pgDE7h administrada pela via i.m. e combinada à EP induziu linfócitos T CD8⁺E7-específicos capazes de secretar as citocinas IFN-γ, IL-2 e TNF-α. Além de induzir células T de memória efetora produtoras de IFN-γ.
- A associação da EP conseguiu manter a eficácia antitumoral da vacina pgDE7h quando as imunizações foram realizadas em diferentes tempos (7 e 10 dias após o desafio tumoral), conferindo 70% de proteção terapêutica.
- Como conclusão final, os dados apresentados por esse trabalho permitem afirmar que a estratégia vacinal associada à EP administrada pela via i.m. se mostrou eficiente no

controle de tumores expressando oncoproteínas de HPV-16. Esse trabalho contribui para a aplicação de uma nova abordagem imunoterapêutica voltada para o controle do câncer de colo de útero, assim como outros tumores induzidos pelo HPV, em condições clínicas.

REFERÊNCIAS*

- AHLÉN, G. et al. *In vivo* electroporation enhances the immunogenicity of hepatitis C virus nonstructural 3/4A DNA by increased local DNA uptake, protein expression, inflammation, and infiltration of CD3⁺ T cells. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 7, p. 4741-4753, 2007.
- AHMAD, S. et al. Optimised electroporation mediated DNA vaccination for treatment of prostate cancer. **Genetic Vaccines and Therapy**, v. 8, n. 1, p. 1, 2010.
- AIHARA, H.; MIYAZAKI, J-I. Gene transfer into muscle by electroporation *in vivo*. **Nature Biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 867-870, 1998.
- BABIUK, S. et al. Electroporation improves the efficacy of DNA vaccines in large animals. **Vaccine**, v. 20, n. 27, p. 3399-3408, 2002.
- BAGARAZZI, M. L. et al. Immunotherapy against HPV16/18 generates potent TH1 and cytotoxic cellular immune responses. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 155, p. 155ra138-155ra138, 2012.
- BAIS, A. G. et al. A shift to a peripheral Th2-type cytokine pattern during the carcinogenesis of cervical cancer becomes manifest in CIN III lesions. **Journal of Clinical Pathology**, v. 58, n. 10, p. 1096-1100, 2005.
- BARBER, D. L.; WHERRY, E. J.; AHMED, R. Cutting edge: rapid *in vivo* killing by memory CD8 T cells. **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 1, p. 27-31, 2003.
- BEST, S. R. et al. Administration of HPV DNA vaccine via electroporation elicits the strongest CD8⁺ T cell immune responses compared to intramuscular injection and intradermal gene gun delivery. **Vaccine**, v. 27, n. 40, p. 5450-5459, 2009.
- BETTS, Michael R. et al. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8⁺ T cells. **Blood**, v. 107, n. 12, p. 4781-4789, 2006.
- BETTS, Michael R. et al. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8⁺ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. **Journal of Immunological Methods**, v. 281, n. 1, p. 65-78, 2003.
- BOSCH, F. X. et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. **Journal of Clinical Pathology**, v. 55, n. 4, p. 244-265, 2002.
- BRODERICK, K. E.; KHAN, A. S.; SARDESAI, N. Y. DNA vaccination in skin enhanced by electroporation. In: **DNA Vaccines**. New York: Springer, p. 123-130, 2014.
- BROWN, D. R. et al. Neutralization of human papillomavirus type (HPV-11) by serum women vaccinated with yeast-derived HPV-11L1 virus-like particles: Correlation with competitive radioimmunoassay titer. **The Journal Infectious Diseases**; v. 184, n.9, p.1183-1186, 2001.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- CHEN, C-H. et al. Enhancement of DNA vaccine potency by linkage of antigen gene to an HSP70 gene. **Cancer Research**, v. 60, n. 4, p. 1035-1042, 2000.
- CUI, Z.; DIERLING, A.; FOLDVARI, M. Non-invasive immunization on the skin using DNA vaccine. **Current Drug Delivery**, v. 3, n. 1, p. 29-35, 2006.
- DAYBALL, Kelley et al. Electroporation enables plasmid vaccines to elicit CD8+ T cell responses in the absence of CD4+ T cells. **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 7, p. 3379-3384, 2003.
- DE VILLIERS, E-M. et al. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, n. 1, p. 17-27, 2004.
- DELIGEOROGLOU, E. et al. HPV infection: immunological aspects and their utility in future therapy. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, v. 2013, 2013.
- DINIZ, M. O.; FERREIRA, L. C. S. 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. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 5, p. 421-427, 2011.
- DINIZ, M. O. et al. Enhanced therapeutic effects conferred by an experimental DNA vaccine targeting human papillomavirus-induced tumors. **Human Gene Therapy**, v. 24, n. 10, p. 861-870, 2013.
- DINIZ, M. O. et al. Immune responses and therapeutic antitumor effects of an experimental DNA vaccine encoding human papillomavirus type 16 oncoproteins genetically fused to herpesvirus glycoprotein D. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 17, n. 10, p. 1576-1583, 2010.
- DONNELLY, J. J.; WAHREN, B.; LIU, M. A. DNA vaccines: progress and challenges. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 2, p. 633-639, 2005.
- FRAZER, I. H. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 1, p. 46-55, 2004.
- GLASSPOOL-MALONE, J. et al. Efficient nonviral cutaneous transfection. **Molecular Therapy**, v. 2, n. 2, p. 140-146, 2000.
- GOTHELF, A.; GEHL, J. What you always needed to know about electroporation based DNA vaccines. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 8, n. 11, p. 1694-1702, 2012.
- HELLER, R. et al. Intradermal delivery of interleukin-12 plasmid DNA by *in vivo* electroporation. **DNA and Cell Biology**, v. 20, n. 1, p. 21-26, 2001.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Tipos de câncer**. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/>> Acesso em: 06 set. 2015.
- KAECH, S. M.; WERRY, E. J.; AHMED, R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 4, p. 251-262, 2002.

- KALAT, M. et al. *In vivo* plasmid electroporation induces tumor antigen-specific CD8⁺ T-cell responses and delays tumor growth in a syngeneic mouse melanoma model. **Cancer Research**, v. 62, n. 19, p. 5489-5494, 2002.
- KENTER, G. G. et al. Vaccination against HPV-16 oncoproteins for vulvar intraepithelial neoplasia. **New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 19, p. 1838-1847, 2009.
- KIM, T. J. et al. Clearance of persistent HPV infection and cervical lesion by therapeutic DNA vaccine in CIN3 patients. **Nature Communications**, v. 5, 2014.
- KIRNBAUER, R. et al. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 24, p. 12180-12184, 1992.
- KROGER, C. J.; ALEXANDER-MILLER, M. A. Dose-dependent modulation of CD8 and functional avidity as a result of peptide encounter. **Immunology**, v. 122, n. 2, p. 167-178, 2007.
- KUTZLER, M. A.; WEINER, D. B. DNA vaccines: ready for prime time?. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, n. 10, p. 776-788, 2008.
- LAMOLINARA, A. et al. Intradermal DNA Electroporation Induces Cellular and Humoral Immune Response and Confers Protection against HER2/neu Tumor. **Journal of Immunology Research**, v. 2015, 2015.
- LASARO, M. O. et al. Anti-tumor DNA vaccines based on the expression of human papillomavirus-16 E6/E7 oncoproteins genetically fused with the glycoprotein D from herpes simplex virus-1. **Microbes and Infection**, v. 7, n. 15, p. 1541-1550, 2005.
- LEBLANC, R. et al. Markedly enhanced immunogenicity of a Pfs25 DNA-based malaria transmission-blocking vaccine by *in vivo* electroporation. **Vaccine**, v. 26, n. 2, p. 185-192, 2008.
- LIN, H.-H. et al. The macrophage F4/80 receptor is required for the induction of antigen-specific efferent regulatory T cells in peripheral tolerance. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 201, n. 10, p. 1615-1625, 2005.
- LIN, K. et al. Therapeutic HPV DNA vaccines. **Immunologic Research**, v. 47, n. 1-3, p. 8, 2010.
- LIN, K.-Y. et al. Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. **Cancer Research**, v. 56, n. 1, p. 21-26, 1996.
- LIU, L. et al. Age-dependent impairment of HIF-1 α expression in diabetic mice: Correction with electroporation-facilitated gene therapy increases wound healing, angiogenesis, and circulating angiogenic cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 217, n. 2, p. 319-327, 2008.
- LØVÅS, T.-O. et al. DNA Vaccines: MHC II-Targeted Vaccine Protein Produced by Transfected Muscle Fibres Induces a Local Inflammatory Cell Infiltrate in Mice. 2014.

- LUXEMBOURG, A. et al. Enhancement of immune responses to an HBV DNA vaccine by electroporation. **Vaccine**, v. 24, n. 21, p. 4490-4493, 2006.
- MALDONADO, L. et al. Intramuscular therapeutic vaccination targeting HPV16 induces T cell responses that localize in mucosal lesions. **Science Translational Medicine**, v. 6, n. 221, p. 221ra13-221ra13, 2014.
- MCKNIGHT, A. J.; GORDON, S. The EGF-TM7 family: unusual structures at the leukocyte surface. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 63, n. 3, p. 271-280, 1998.
- MIR, L. M. et al. High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 8, p. 4262-4267, 1999.
- MÖLLER, M. G. et al. Electrochemotherapy as an adjunct or alternative to other treatments for unresectable or in-transit melanoma. 2009.
- MUÑOZ, N. et al. HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine**, v. 24, p. S1-S10, 2006.
- NAKAGAWA, M. et al. Persistence of human papillomavirus type 16 infection is associated with lack of cytotoxic T lymphocyte response to the E6 antigens. **Journal of Infectious Diseases**, v. 182, n. 2, p. 595-598, 2000.
- NAKAGAWA, M. et al. Time course of humoral and cell-mediated immune responses to human papillomavirus type 16 in infected women. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 4, p. 877-882, 2002.
- NICOLAS, J.-F.; GUY, B. Intradermal, epidermal and transcutaneous vaccination: from immunology to clinical practice,” **Expert Review of Vaccines**, vol. 7, no. 8, pp. 1201–1214, 2008.
- NYSTROÖM, J. et al. Improving on the ability of endogenous hepatitis B core antigen to prime cytotoxic T lymphocytes. **Journal of Infectious Diseases**, v. 201, n. 12, p. 1867-1879, 2010.
- ÖHLSCHLÄGER, P. et al. The combination of TLR-9 adjuvantation and electroporation-mediated delivery enhances *in vivo* antitumor responses after vaccination with HPV-16 E7 encoding DNA. **International Journal of Cancer**, v. 128, n. 2, p. 473-481, 2011.
- PARKIN, D. M. et al. Global cancer statistics, 2002. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 55, n. 2, p. 74-108, 2005.
- PEACHMAN, K. K.; RAO, M.; ALVING, C. R. Immunization with DNA through the skin. **Methods**, v. 31, n. 3, p. 232-242, 2003.
- PEGHINI, B. C. et al. Local cytokine profiles of patients with cervical intraepithelial and invasive neoplasia. **Human Immunology**, v. 73, n. 9, p. 920-926, 2012.
- PENG, B. et al. Electric pulses applied prior to intramuscular DNA vaccination greatly improve the vaccine immunogenicity. **Vaccine**, v. 25, n. 11, p. 2064-2073, 2007.
- PUDNEY, V. A. et al. DNA vaccination with T-cell epitopes encoded within Ab molecules induces high-avidity anti-tumor CD8+ T cells. **European Journal of Immunology**, v. 40, n. 3, p. 899-910, 2010.

- ROOS, A.-K. et al. Optimization of skin electroporation in mice to increase tolerability of DNA vaccine delivery to patients. **Molecular Therapy**, v. 17, n. 9, p. 1637-1642, 2009.
- ROOS, A-K. et al. Skin electroporation: effects on transgene expression, DNA persistence and local tissue environment. **PloS One**, v. 4, n. 9, p. e7226, 2009.
- SANDBERG, J. K. et al. T cell tolerance based on avidity thresholds rather than complete deletion allows maintenance of maximal repertoire diversity. **The Journal of Immunology**, v. 165, n. 1, p. 25-33, 2000.
- SCIORTINO, M. T. et al. Involvement of HVEM receptor in activation of nuclear factor κ B by herpes simplex virus 1 glycoprotein D. **Cellular Microbiology**, v. 10, n. 11, p. 2297-2311, 2008.
- SHIROTA, H. et al. Potential of transfected muscle cells to contribute to DNA vaccine immunogenicity. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 1, p. 329-336, 2007.
- STEINBERG, M. W.; CHEUNG, T. C.; WARE, C. F. The signaling networks of the herpesvirus entry mediator (TNFRSF14) in immune regulation. **Immunological Reviews**, v. 244, n. 1, p. 169-187, 2011.
- SUN, Y. et al. Intravaginal HPV DNA vaccination with electroporation induces local CD8⁺ T-cell immune responses and antitumor effects against cervicovaginal tumors. **Gene Therapy**, 2015.
- TIMARES, L. et al. Drug-inducible, dendritic cell-based genetic immunization. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 11, p. 5483-5490, 2003.
- TRIMBLE, C. et al. Comparison of the CD8⁺ T cell responses and antitumor effects generated by DNA vaccine administered through gene gun, biojector, and syringe. **Vaccine**, v. 21, n. 25, p. 4036-4042, 2003.
- TRIMBLE, C. L. et al. A phase I trial of a human papillomavirus DNA vaccine for HPV16+ cervical intraepithelial neoplasia 2/3. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 1, p. 361-367, 2009.
- VANDERMEULEN, G. et al. The site of administration influences both the type and the magnitude of the immune response induced by DNA vaccine electroporation. **Vaccine**, 2015.
- VILLA, L. L. Vaccines against papillomavirus infections and disease. **Revista Chilena de Infectologia**, v. 23, n. 2, p. 157-63, 2006.
- WALBOOMERS, J. M. M et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **The Journal of Pathology**, v. 189, n. 1, p. 12-19, 1999.
- WERNES, B. A.; LEVINE, A. J.; HOWLEY, P. M. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. **Science**, v. 248, n. 4951, p. 76-79, 1990.
- WHERRY, E. J.; AHMED, R. Memory CD8 T-cell differentiation during viral infection. **Journal of Virology**, v. 78, n. 11, p. 5535-5545, 2004.
- WIDERA, G. et al. Increased DNA vaccine delivery and immunogenicity by electroporation *in vivo*. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 9, p. 4635-4640, 2000.

WU, T.-C. Therapeutic human papillomavirus DNA vaccination strategies to control cervical cancer. **European Journal of Immunology**, v. 37, n. 2, p. 310-314, 2007.

ZHAO, Y. L. et al. Induction of cytotoxic T-lymphocytes by electroporation-enhanced needle-free skin immunization. **Vaccine**, v. 24, n. 9, p. 1282-1290, 2006.

ZUCHELLI, S. et al. Enhancing B-and T-cell immune response to a hepatitis C virus E2 DNA vaccine by intramuscular electrical gene transfer. **Journal of Virology**, v. 74, n. 24, p. 11598-11607, 2000.