

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

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.

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 conseqüentemente 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.

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.