JAMILE RAMOS DA SILVA

CONTROLE DA IMUNOSSUPRESSÃO COMO ESTRATÉGIA PARA POTENCIALIZAR OS EFEITOS DE UMA VACINA DE DNA CONTRA TUMORES INDUZIDOS PELO 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
2016

Jamile Ramos da Silva

Controle da imunossupressão como estratégia para potencializar os efeitos de uma vacina de DNA contra tumores induzidos pelo 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.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Luís Carlos de Souza Ferreira

Co-orientação: Mariana de Oliveira Diniz

Versão Corrigida. A Versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Bioblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Dissertações e Teses da USP (BDTD).

São Paulo
2016

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

Silva, Jamile Ramos da.
Controle da imunossupressão como estratégia para potencializar os efeitos de uma vacina de DNA contra tumores induzidos pelo HPV-16 / Jamile Ramos da Silva. -- São Paulo, 2016.

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

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

Versão do título para o inglês: Control of immunosuppression as strategy to enhance the effects of DNA vaccine against tumors induced.

1. Câncer 2. Vacina terapêutica 3. Gencitabina 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/SBIB0120/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Jamile Ramos da Silva

Titulo da Dissertação/Tese: Controle da imunossupressão como estratégia para potencializar os efeitos de uma vacina de DNA contra tumores induzidos pelo HPV-16.

Orientador: Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a **...../...../.....**, considerou o(a) candidato(a):

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

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

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 **92** nas fls. **22** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Luís Carlos de Souza Ferreira,** Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Avaliação dos efeitos da co-administração de um plasmídeo que codifica o receptor de IL-10 na resposta imunológica induzida por uma vacina de DNA contra tumores induzidos por HPV*" do qual participam o(s) aluno(s) **Natiely Silva Sales, Luana Raposo de Melo Moraes Aps, Bruna Maldonado, Jamile Ramos da Silva** e os Pós-Doutorando **Carina Buzzo de Lima, Laís Helena Teixeira Merlin de Andrade,** 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 **18.08.2014, com validade de 4 anos**.

São Paulo, 19 de agosto de 2014.

Prof. Dr. ANDERSON DE SÁ NUNES
Vice- Coordenador- CEUA- ICB/USP

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

Aos pacientes,
que este trabalho possa contribuir na
busca de alternativas de controle do
câncer.

Aos meus pais,
Ângela e Oscar,

E aos meus irmãos,
Tainan, Carol e Guilherme.

Com imenso carinho.

AGRADECIMENTOS

À Deus, criador do universo, por ser a base de tudo na minha vida e tornar os meus sonhos reais. Por ser o meu sustento, refúgio, minha força, amparo e consolo, por suprir todas as minhas necessidades e mostrar o caminho nas horas incertas. Mas acima de tudo, por me fazer acreditar que “Tudo é possível naquele que crê no Senhor”.

Aos meus pais Ângela e Oscar, ou mainha e painho, minha eterna gratidão. Vocês que sempre me incentivaram, acreditaram em mim quando nem eu mais acreditava, pelo amor incondicional, por me educarem para a vida e principalmente por moldar o meu caráter. Obrigada por abrir mão dos seus planos para me fazer chegar até aqui, pelas orações de todos os dias, preocupações, lágrimas e sorrisos, por conviverem com a saudade de todos os dias. Aos meus irmãos Tainan, Carolaine e Guilherme, pelo carinho de todos os dias, sorrisos, afetos, ligações, por vibrarem com minhas conquistas e sempre se orgulharem de mim. AMO VOCÊS.

Aos meus tios Suzana e Euclides, por abrirem as portas da sua casa para mim, se preocuparem e cuidarem de mim todos os dias como verdadeiros pais. E a toda minha família que torce por mim sempre.

Ao Neto, pelo carinho, companheirismo e amor dedicado todos os dias, por me incentivar e acreditar sempre no meu potencial.

Ao meu orientador, Luís Carlos, que eu admiro muito, por sempre estar à disposição, participando dos pontos mais importantes desta pesquisa e por contribuir no meu desenvolvimento científico. Obrigada por me proporcionar essa oportunidade.

À quem considero minha mãe-jovem, Mariana Diniz, a qual prezo muito, peça chave nesse trabalho. Obrigada pela oportunidade, confiança depositada em mim, idéias inteligentes, conselhos (pessoais e profissionais), orientações, paciência, dedicação, amor ao trabalho, por todo zelo e ensinamentos de forma tão humana e tão humilde. E principalmente por estar SEMPRE disposta a ajudar, independentemente de estar na França, Viena, Fortaleza ou se passar das 23:00 horas. Minha imensa gratidão.

Às “marianetes”: Natiely, que foi a primeira a me ensinar todos os procedimentos do laboratório. Obrigada pela ajuda de sempre, amizade, risadas, cafés, apelidos, sorrisos e orações. E Mariângela, pelos longos anos comigo, compartilhando ensinamentos pessoais e científicos, apoio nos experimentos e companheirismo. Às HPVetes, Luana, Bruna, Patrícia, Carol, Roberta e as que não estão mais no laboratório: Laís e Carina. Obrigada pela parceria nos experimentos, discussões científicas, correções de textos, pela imensa ajuda em todos os aspectos deste trabalho e por todos os momentos de descontração. Obrigada por sempre estarem ao meu lado.

Aos amigos do LDV, Natiely, Ângela, Lennon, Rubens, Sara, Robert, Ewerton, Helic, Dalva, Patrícia, pelas altas risadas, amizades além da USP, cafés, por me ensinarem técnicas, ajudarem em experimentos e compartilhar tantos momentos de saudades da Bahia. E aos demais integrantes no LDV, Prof Rita, Eduardo, Mônica, Samuel, Denicar, Marco, Tácita, Alexia, Karine, Rafael I.C., Cariri, Wilson, Rafael, Milene, Mari Cintra, Marcinha e Camila, atuais ou não, mas que contribuíram diretamente com a realização desse trabalho. Obrigada pela parceria e pela oportunidade de aprender e ensinar que tive com todos vocês.

Ao Eduardo Gimenes e Carolina pelo excelente apoio técnico que oferecem a este grupo de pesquisa, e que tanto contribui para o avanço dos trabalhos. À Dra. Maria Elizabete Sbrogio de Almeida pelos ensinamentos no manuseio dos camundongos e pelo imenso carinho, a cada visita, a todos do laboratório.

Aos funcionários dos biotérios dos Departamentos de Microbiologia e Parasitologia: Daniela, Juliane, Luís, Anderson, Maria do Carmo e Carlos, pela atenção e competência no manejo dos camundongos. Ao serviço de biblioteca e a todos os funcionários e ex-funcionários da USP com os quais tive o prazer de conviver até aqui, em especial as secretárias do Departamento de Pós-Graduação, Gisele e Caçiara. Sem vocês esse trabalho não estaria concluído.

Ao Lucas Marques, por abrir portas na minha vida profissional, me indicar como aluna e por confiar em mim. Ao Robson Amaro, amigo e antigo orientador, pelos ensinamentos para a vida, por me incentivar sempre a seguir em frente e acreditar que posso ir mais além do que eu imagino. Aos meus antigos professores, do maternal (minha mãe) à pós-graduação, por me proporcionar o conhecimento,

abrir portas na minha vida. Principalmente porque, mesmo muitas vezes em condições precárias de ensino (salas multiseriadas, com dificuldade no acesso físico, infra-estrutura e recursos), me fizeram sonhar e acreditar que era possível estudar em uma Universidade, e chegar na USP.

Às agências de financiamento FAPESP, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

A todos que colaboraram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

OBRIGADA.

Este trabalho foi realizado sob orientação do Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira, co-orientação da Drª Mariana de Oliveira Diniz, desenvolvido no Centro de Vacinas e Terapia Gênica (CEVAT – GENE 4), no Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, nº do processo: 2014/11073-1).

[...] Quando você tem um propósito a cumprir e um sonho para seguir, Ele abre seus olhos e o chama pelo nome... E mesmo que ninguém mais saiba, com certeza, Deus sabe.

Autor desconhecido

RESUMO

SILVA, J. R. **Controle da imunossupressão como estratégia para potencializar os efeitos de uma vacina de DNA contra tumores induzidos pelo HPV-16.** 2016. 87 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

O câncer cervical representa a terceira causa de morte por câncer em mulheres e está associado a infecções persistentes pelo Vírus do Papiloma Humano (HPV) em mais de 99% dos casos. Evidências sólidas mostram que a expansão de Células Mielóides Supressoras (MDSC) e fatores solúveis como a interleucina IL-10 são importantes mediadores da evasão tumoral à resposta imunológica contra tumores, que limita a eficácia de imunoterapias. Dada a importância epidemiológica dos tumores induzidos por HPV e a necessidade eminente do desenvolvimento de imunoterapias ativas contra essas lesões, desenvolvemos durante os últimos 12 anos, uma estratégia vacinal terapêutica baseada em DNA. Esta vacina codifica a proteína E7 do HPV-16 fusionada à glicoproteína D (gD) do Vírus Herpes Simplex do tipo 1 (HSV-1), denominada pgDE7h. O presente trabalho propôs a investigação de estratégias que restringem a imunossupressão, baseadas em um plasmídeo que codifica o receptor solúvel da citocina IL-10 (pIL10R) e da quimioterapia com gencitabina, na potencialização da vacina pgDE7h para controlar o crescimento de tumores que expressam as proteínas E6 e E7 do HPV-16 em modelo murino (células TC-1). Foi possível observar um atraso no crescimento do tumoral a partir da combinação da vacina com o pIL-10R. Adicionalmente, a utilização da eletroporação como método de entrega dos plasmídeos aumentou a proteção terapêutica para 90% e 60% quando os animais foram imunizados 5 ou 14 dias após o desafio, respectivamente. A combinação dos plasmídeos foi ainda capaz de elevar o número de linfócitos T $CD8^+$ E7-específicos ativados, encontrados sistemicamente e no sítio tumoral. No consócio da imunização com a pgDE7h à gencitabina, foi possível observar um efeito sinérgico dessa associação, que aumentou a proteção antitumoral de 20% para 100% de animais livres de tumor, concomitante ao controle da expansão de populações imunossupressoras no baço. Além disso, a quimio-imunoterapia administrada até 14 dias após o desafio com as células tumorais mostrou-se protetora em modelo de recidivas, simuladas por meio de transplantes subsequentes de células tumorais. Na busca de um protocolo vacinal com maior viabilidade clínica, combinamos a coadministração dos plasmídeos pgDE7h e pIL-10R com o tratamento com gencitabina. Esta combinação terapêutica mostrou-se mais eficiente, onde se observou um aumento robusto da ativação de linfócitos T $CD8^+$ E7-espefíficos, com regressão completa de tumores pré-estabelecidos. Em suma, esses resultados evidenciam que a associação de abordagens terapêuticas pode superar barreiras imunológicas presentes no ambiente tumoral e aumentar as chances de sucesso clínico do tratamento proposto.

Palavras-chave: Câncer. Vacina terapêutica. Gencitabina.

ABSTRACT

SILVA, J. R. **Control of immunosuppression as strategy to enhance the effects of a DNA vaccine against tumors induced by HPV-16.** 2016. 87 p. Masters thesis (Microbiology). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Cervical cancer represents the third cause of cancer death among women, which is associated with persistent Human Papilloma Virus (HPV) infection in more than 99% of cases. Solid evidences show that the expansion of Myeloid-derived Suppressor Cells (MDSC) and soluble factors, such as IL-10, are important mediators of immune evasion mechanisms expressed by tumor cells, that limits the efficacy of immunotherapeutic approaches. Given the epidemiological importance of HPV-induced tumors and the crucial importance of developing active immunotherapies against neoplasias, during the past 12 years, we have been developing a DNA-based therapeutic vaccine strategy encoding the HPV-16 E7 protein fused to the Herpes Simplex Virus type 1 (HSV-1) glycoprotein D (gD), named pgDE7h. This work aimed to investigate the potential role of immunossupression restriction using a plasmid encoding the soluble IL-10 receptor (pIL10R) and the chemotherapeutic drug gemcitabine to enhance in enhancing the pgDE7h vaccine potency in the control of tumors expressing HPV-16 E6 and E7 proteins in a murine model (TC-1 cells). It was possible to observe a tumor growth delay after combining the vaccine with pIL-10R. Additionally, the use of electroporation as a plasmid delivery method provided a therapeutic protection of 90% and 60% when the animals were immunized 5 or 14 days after challenge, respectively. The combination of plasmids was also capable to increase substantially the numbers of activatedE7-specific $CD8^+$ T lymphocytes both systemically and at the tumor site. When pgDE7h immunization was combined to chemotherapy, we observed a synergistic effect, which increased the antitumor protection from 20% to 100% and promoted the control of immunosuppressive cell populations in the spleen. It was possible to maintain the high antitumour protective effects of the chemo-immunotherapy when the animals were immunized 14 days after tumor cell challenge and tumor relapses after subsequent challenges with tumor cells. To search a vaccine protocol with greater applicability in a clinical setting, we combined co-administration of pgDE7h and pIL-10R and gemcitabine treatment. Our data showed that the combined treatment induced a robust increase in the activation of $CD8^+$ T lymphocytes and a complete regression of pre-established tumors. All together, these results show that the combination of therapeutic approaches can overcome immunological barriers present in the tumor environment and increase the chances of clinical success of the propose therapeutic treatment.

Keywords: Cancer. Therapeutic vaccine. Gemcitabine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Microambiente tumoral e mecanismo de citotoxicidade e escape imunológico 25

Figura 2 – Representação esquemática do mecanismo de interação da citocina IL-10 com o seu receptor 26

Figura 3 – Ensaio de proteção terapêutica de camundongos C57BL/6 desafiados com células TC-1 e imunizados três dias depois com a coadministração da vacina pgDE7h ao pIL-10R 40

Figura 4 – Ensaio de proteção terapêutica de camundongos C57BL/6 desafiados com células TC-1 e imunizados cinco dias depois com a coadministração da vacina pgDE7h ao pIL-10R 41

Figura 5 – Efeito da resposta de linfócitos e ensaio de proteção terapêutica de camundongos desafiados com células TC-1 e imunizados com a vacina pgDE7h associada ao pIL-10R pelo método de eletroporação 43

Figura 6 – Efeito do espaçamento temporal entre o desafio e a imunização com a vacina pgDE7h associada ao pIL-10R pelo método de eletroporação na resposta de linfócitos e proteção antitumoral terapêutica 45

Figura 7 – Ativação de linfócitos T $CD8^+$ E7-específicos após vacinação com a vacina pgDE7h associada ao pIL-10R pelo método de eletroporação 46

Figura 8 – Ativação de linfócitos T $CD8^+$ E7-específicos polifuncionais após vacinação com a vacina pgDE7h associada ao pIL-10R pelo método da eletroporação 47

Figura 9 – Caracterização de populações celulares imunossupressoras presentes no baço de animais desafiados com células TC-1 e coadministrados com pgDE7h e pIL-10R entregues por eletroporação 48

Figura 10 – Determinação da infiltração de linfócitos T $CD8^+$ E7-específicos para o sítio tumoral de animais desafiados com células TC-1 e coadministrados com pgDE7h e pIL-10R entregues por eletroporação 49

Figura 11 – Ensaio de proteção terapêutica de camundongos C57BL/6 desafiados com células TC-1 e imunizados com a vacina pgDE7h combinado ao tratamento com gencitabina (GEN) 51

Figura 12 – Ativação de linfócitos T $CD8^+$ E7-específicos após vacinação com pgDE7h em associação com a quimioterapia com gencitabina presente no baço 52

Figura 13 – A imunização com a vacina pgDE7h em combinação com gencitabina controla a expansão de células mielóides supressoras no baço .. 53

Figura 14 – A imunização com a vacina pgDE7h em combinação com gencitabina controla a expansão de células T regulatórias no baço 54

Figura 15 – Ensaio de proteção terapêutica de camundongos imunizados com a vacina pgDE7h combinado ao tratamento com gencitabina (GEN) iniciando o tratamento dez dias após o desafio.....55

Figura 16 – Ensaio de proteção terapêutica de camundongos imunizados com a vacina pgDE7h combinado ao tratamento com gencitabina (GEN) iniciando o tratamento 14 dias após o desafio.....57

Figura 17 – Efeito antitumoral terapêutico induzido pela imunização com a vacina pgDE7h associados a gencitabina após redesafio com células TC-1....58

Figura 18 – A coadministração da vacina pgDE7h com o pIL10R associada à gencitabina induz um aumento da ativação de linfócitos T CD8+ E7-específicos 60

Figura 19 – A coadministração da vacina pgDE7h com o pIL10R associada ao gencitabina controla a expansão de células imunossupressoras.....61

Figura 20 – Avaliação da infiltração de linfócitos T $CD8^+$ E7-específicos e células mielóides supressoras no ambiente tumoral de animais imunizados com a coadministração da vacina pgDE7h e o pIL10R associado à gencitabina 63

Figura 21 – Ensaio de proteção terapêutica de camundongos imunizados com a coadministração da vacina pgDE7h e o pIL10R associado à gencitabina.....65

LISTA DE ABREVIATURAS

ACK	*Ammonium-Chloride-Potassium*
APC	*Antigen presenting cell* (célula apresentadora de antígeno)
BCL-2	B-cell lymphoma 2 (linfoma de células B)
BTLA	*B and T lymphocyte attenuator* (atenuador de linfócitos B e T)
CA-USA	Cambrige, United State Americ (Cambride, Estados Unidos da América)
CD	*Cluster of differentiation* (grupo de diferenciação)
CO_2	Dióxido de carbono
CRT	Calreticulina
CTLA4	*Cytotoxic T Lymphocyte antigen-4* (antígeno 4 de linfócitos T citotóxicos).
DCs	*Dendritc cells* (células dendríticas)
DNA	*Desoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucléico)
E	*Early protein* (proteína de expressão precoce)
EDTA	*Ethylenediaminitetraacetic acid* (Ácido etileno diamino tetra acético)
gD	Glicoproteína D
GEM	Gencitabina
HPV	*Human papilloma virus* (vírus do papiloma humano)
HSP	*Heat shock protein* (proteína de choque térmico)
HSV	*Herpes simplex virus* (vírus herpes simplex)
HVEM	*Herpesvirus entry mediator* (mediador de entrada do vírus herpes)
IFN-γ	Interferon-γ
IL	Interleucina
IL-10R	Receptor de interleucina 10
i.m.	Imunização intramuscular
INCA	Instituto Nacional do Câncer
iNOS	*Inducible nitric oxide synthase* (óxido nítrico sintase induzível)
i.p.	Intraperitoneal
Jak	*Janus Kinase* 2
L	*Late protein* (proteína de expressão tardia)
LB	Meio Luria-Bertani

M_2	Macrofágos de polaridade 2
MDSC	*Myeloid-derived suppressor cell* (células supressoras derivada da linhagem mieloíde)
MHC	*Major histocompatibility complex* (complexo principal de histocompatibilidade)
NF-kB	*Nuclear factor kappa B* (fator nuclear kappa B)
NK	*Natural killer cells*
PBS	*Phosphatase buffered saline* (tampão salina fosfato)
PD-1	Proteína de morte celular programada 1
PDL-1	Ligante da proteína de morte celular programada 1
PGE	Prostaglandina E
pH	Potencial de hidrogênio
pRb	Proteína retinoblastoma
RNA	R*ibonucleic acid* (ácido ribonucléico)
S/E	Sem estímulo
SFB	Soro fetal bovino
STAT3	*Signal transducer and activator of transcription 3* (tradutor de sinal e ativador da transcrição 3).
TCR	Receptor de célula T
TGF	Transforming Growth Factor (fator de transformação do crescimento)
Th	*T help* (T auxiliar)
TNF-α	*Tumor necrosis factor alpha* (fator de necrose tumoral)
T reg	Linfócitos T regulatórios
TYK2	*Tyrosine Kinase* 2 (Tirosina quinase 2)
UK	*United Kingdom* (Reino Unido)
VEGF	*Vascular endothelial growth factor* (fator de crescimento endotelial vascular)
VLPs	*Virus like particles* (partículas semelhantes a vírus)

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
®	marca registrada
ng	nanogramas (10^{-9} grama)
µg	micrograma (10^{-6} grama)
µl	microlitro (10^{-6} Litro)
nm	nanômetro (10^{-9} metros)
µm	micrometro (10^{-6} metros)
mm	milímetro (10^{-3} metros)
g	grama
mg	miligrama
Kg	kilograma
M	molar
mL	mililitro (10^{-3} Litro)
ms	milissegundo (10^{-3} segundos)
ºC	graus Celsius
g	força gravitacional
V	voltagem
D	diâmetro
mm^3	milimetros cúbicos
RPM	rotação por minuto

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 20
1.1 O vírus HPV 20
1.2 Porque estudar o câncer induzido por HPV? 20
1.3 Como o HPV causa câncer? 21
1.4 Estratégias de controle do vírus ou do câncer 22
1.5 Como desenvolver uma vacina terapêutica para tumores induzidos por HPV? 23
1.6 A IL-10 e o contexto tumoral 25
1.7 A vacina pgDE7h como estratégia vacinal para controle de tumores induzidos por HPV e medidas para potencializar o seu efeito antitumoral terapêutico 28
2 OBJETIVOS 31
2.1 Objetivo geral 31
2.2 Objetivos específicos 31
3 MATERIAL E MÉTODOS 32
3.1 Vetores vacinais 32
3.2 Linhagens celulares 32
3.3 Desafio com células tumorais e protocolo de imunização 33
3.4 Acompanhamento do tumor 34
3.5 Determinação de células T $CD8^+$ produtoras de citocinas 35
3.6 Caracterização das populações de células imunossupressoras 35
3.7 Análises de linfócitos T $CD8^+$ infiltrantes no tumor 36
3.8 Tratamento estatístico 36
4 RESULTADOS 38
4.1 Determinação da potência terapêutica de uma vacina de DNA direcionada ao controle de tumores associados ao HPV (pgDE7h) coadministrada com um plasmídeo que codifica o receptor de IL-10 (pIL-10R) 39
4.1.1 Avaliação do efeito antitumoral terapêutico mediada pela coadministração do plasmídeo pIL-10R ao plasmídeo vacinal pgDE7h 39
4.1.2 Avaliação do efeito antitumoral terapêutico mediada pela coadministração do plasmídeo que expressa o receptor de IL-10 ao plasmídeo vacinal pgDE7h associada à eletroporação como método de entrega 42
4.1.3 Impacto da coadministração do pIL-10R ao plasmídeo vacinal pgDE7h entregue por eletroporação na resposta celular e na infiltração de células para o sítio tumoral 45

4.2 Efeito do potencial terapêutico da vacina pgDE7h em associação à quimioterapia com gencitabina.....50

4.2.1 Avaliação do efeito antitumoral terapêutico da vacina pgDE7h em combinação com a quimioterapia com gencitabina 50

4.2.2 Avaliação da resposta celular e controle de células imunossupressoras induzidos pela vacinação com pgDE7h associada à gencitabina 51

4.2.3 Avaliação do espaçamento temporal entre o desafio com células TC-1 e a administração da combinação da vacina pgDE7h com o quimioterápico gencitabina 54

4.3 Aumento da potência vacinal terapêutica por meio de terapias combinadas a partir da associação da vacina pgDE7h ao pIL-10R e ao tratamento com gencitabina 59

4.3.1 Caracterização da resposta celular induzida pela imunoterapia combinada 59

4.3.2 Caracterização do efeito da imunoterapia combinada no controle de células imunossupressoras 61

4.3.3 Determinação das populações celulares infiltrantes no sitio tumoral 62

4.3.4 Avaliação do efeito antitumoral terapêutico induzido pela imunoterapia combinada.....63

5 DISCUSSÃO 66

6 CONCLUSÕES 74

REFERÊNCIAS.....75

1 INTRODUÇÃO

1.1 O vírus HPV

O Vírus do Papiloma Humano (HPV) é um vírus de DNA circular dupla fita, não-envelopado, com simetria do capsídeo icosaédrica. Esse vírus tem capacidade de infectar as camadas mais basais do epitélio estratificado, que dificilmente é monitorado pelo sistema imune do hospedeiro. O seu genoma possui cerca de 8.000 pares de bases e é composto por genes que codificam as proteínas de expressão precoce: E1, E2, E4, E5, E6 e E7 e duas proteínas de expressão tardias: L1 e L2. As proteínas precoces estão envolvidas com o ciclo celular viral, controlando a replicação do DNA viral (E1 e E2), transcrição do RNA viral (E2), reorganização do citoesqueleto (E4) e transformação celular (E5, E6 e E7). Enquanto as proteínas tardias L1 e L2 são componentes estruturais que constituem o capsídeo viral (ZUR HAUSEN, 2002).

Mais de 200 tipos de HPV foram identificados até o momento, sendo que alguns apresentam tropismo pela região anogenital, que podem ser classificados de acordo com seu potencial oncogênico (KOCJAN et al., 2015). Os tipos virais HPV-6 e -11 fazem parte do grupo de baixo risco e são conhecidos por causarem lesões benignas de baixo grau, representando cerca de 90% dos casos de verrugas genitais. Por outro lado, os tipos de alto risco estão relacionados ao desenvolvimento de lesões de alto grau e neoplasias, em que HPV-16, -18, -31 e -45 representam os principais tipos virais associados (GARLAND et al., 2009). Particularmente, o HPV-16 e o HPV-18 são os mais frequentes entre os tipos virais com potencial oncogênico, sendo responsáveis, em conjunto, por mais de 80% dos casos de câncer cervical e outros tipos de câncer causados por HPV (PIROG et al., 2014).

1.2 Porque estudar o câncer induzido por HPV?

A relação entre o HPV e o câncer está bem estabelecida, e este vírus é responsável por um terço dos casos de tumores associados a agentes infecciosos (DE MARTEL et al., 2012). Infecções persistentes por HPV estão associadas a cerca

de 99,8% dos casos de câncer cervical, que representa o terceiro tipo de câncer mais comum em mulheres (SCHIFFMAN et al., 2007). Segundo o Instituto do Nacional do Câncer (INCA, 2016), no Brasil o câncer cervical é a quarta causa de morte por câncer em mulheres, com uma estimativa de cerca de 16.340 novos casos e aproximadamente 5.430 mortes por ano. No Brasil, 66% dos casos são diagnosticados no estágio invasivo da doença, a fase mais agressiva. Além disso, na última década, a frequência de outras neoplasias etiologicamente relacionadas ao HPV tem aumentando significativamente em homens e mulheres, incluindo tumores de vulva, vagina, ânus, pênis e, sobretudo, carcinomas de cabeça e pescoço (DE SANJOSÉ; BRUNI; ALEMANY, 2014).

1.3 Como o HPV causa câncer?

Os tumores associados ao HPV são resultantes de alterações genéticas causadas pela integração genômica e subsequente expressão aumentada de duas oncoproteínas virais, E6 e E7. Infecções persistentes por genótipos de alto risco favorecem uma instabilidade genômica com a passagem da forma epissomal do DNA viral para a integração ao genoma do hospedeiro (HAN; SIN, 2013). O descontrole da maturação normal das partículas virais no epitélio cervical tende a progredir para o estado pré-canceroso de neoplasia intra-epitelial cervical (NIC). Uma vez não tratadas, podem evoluir para lesões de alto grau maligno e atingir as camadas superiores do epitélio, dando origem carcinoma cervical *in situ* (BASER et al., 2014). Quando ocorre a integração do DNA viral ao genoma do hospedeiro, a maioria dos genes do HPV é perdida. Nesses casos, há a supressão dos genes virais da regulação, tais como E2, E4, E5, L1 e L2. A inativação de E2, que é responsável pela repressão da transcrição de E6 e E7, leva a expressão constitutiva dessas oncoproteínas pela célula hospedeira. Assim, as proteínas E6 e E7 agem na alteração do ciclo celular através da degradação de p53 e interação com retinoblastoma (pRb) respectivamente. A p53 é um fator de transcrição envolvido na apoptose e parada do ciclo celular e a pRb ativa genes envolvidos na síntese de DNA e progressão do ciclo celular. As modificações da ação dessas proteínas, resultantes de genes supressores de tumores, induzem a malignização da célula e a manutenção deste estado (ALP AVCI, 2012; MÜNGER; HOWLEY, 2002). Com base na sua importância e na expressão constante de E6 e E7 nas células tumorais,

essas oncoproteínas são excelentes alvos para terapias de tumores associados ao HPV.

1.4 Estratégias de controle do vírus ou do câncer

Com a intenção de evitar futuras infecções pelos vírus e prevenir o câncer a longo prazo, foram desenvolvidas vacinas preventivas contra o HPV que se encontram disponíveis no mercado. Essas vacinas são compostas pela proteína L1 do capsídeo viral que espontaneamente formam partículas que se assemelham ao vírus, conhecidas como VLPs (do inglês, *Viral-Like Particles*) (CHEN; NI; LIU, 2011; KIRNBAUER et al., 1992). Essas partículas mostraram-se altamente imunogênicas e induziram resposta de anticorpos neutralizantes capaz de evitar infecções por vírus HPV em humanos (EINSTEIN et al., 2009). A vacina quadrivalente, da empresa Merck Sharp & Dohme (nome comercial Gardasil) confere proteção contra HPV-6, -11, -16 e -18; a vacina bivalente, da empresa GlaxoSmithKline (nome comercial Cervarix) confere proteção contra HPV-16 e -18. Ambas as vacinas profiláticas abrangem os tipos mais predominantes de HPV de alto risco, enquanto que a quadrivalente tem também como alvo, a prevenção de verrugas genitais associadas aos tipos virais não oncogênicos.

Embora as vacinas profiláticas, capazes de desencadear a produção de anticorpos contra as partículas virais, forneçam alta proteção contra os tipos de HPV cobertos pelas vacinas, elas não são amplamente distribuídas e não beneficiam pessoas previamente expostas aos vírus. Os países asiáticos, regiões da África, América Central e do Sul, nos quais há uma alta prevalência desses tipos de tumores, tem dificuldade para incluir estas vacinas em seus programas nacionais públicos de imunização em função de seu custo elevado (WIGLE; COAST; WATSON-JONES, 2013). Além disso, seriam necessários mais de 20 anos para que um plano de imunização mundial consiga reduzir os índices de morte causados por câncer de colo de útero, devido ao longo período entre a infecção e o estabelecimento de lesões malignas (WIGLE; COAST; WATSON-JONES, 2013).

O tratamento utilizado para o câncer cervical envolve cirurgia, radioterapia e quimioterapias ou a combinação destes. Além da morbidade iatrogênica, esses tratamentos são dispendiosos, traumáticos e não agem especificamente sobre as células tumorais. Adicionalmente, muitos pacientes desenvolvem resistência às

drogas, o que diminui a taxa de sobrevida global (WHANG; FILIPPOVA; DUERKSEN-HUGHES, 2015). De acordo com dados de 2014 do Instituto *Cancer Research UK*, cerca de 70% das mulheres apresentam sobrevida de pelo menos cinco anos, com prognóstico dependente do estágio no qual foi diagnosticada a neoplasia. Em média, o tratamento pode custar nove mil dólares por paciente, o que limita o uso desses serviços em países em desenvolvimento (KRUZIKAS et al., 2012). Portanto, é desejável a viabilização de novos tratamentos menos invasivos e mais eficazes, como o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que possam ser associadas ao tratamento convencional contra tumores induzidos por HPV.

1.5 Como desenvolver uma vacina terapêutica para tumores induzidos por HPV?

As proteínas E6 e E7, apesar de estarem presentes nas células tumorais, não estimulam naturalmente uma resposta imunológica citotóxica eficiente. Isso acontece por serem expressas em um contexto onde diversos mecanismos de escape imunológico desencadeiam um quadro de tolerância antigênica (SASAGAWA; TAKAGI; MAKINODA, 2012). Vacinas terapêuticas capazes de restabelecer a imunogenicidade dessas proteínas são altamente promissoras e necessárias na terapia contra o câncer. Tais vacinas devem ser direcionadas às células apresentadoras de antígeno, com o objetivo de favorecer a entrega do antígeno alvo e, assim, aumentar a eficiência da ativação celular durante a apresentação de epítopos, principalmente pelas células dendríticas. Estas proteínas contêm regiões antigênicas que podem ser apresentadas via MHC de classe I ou II e induzir uma potente resposta imunológica. A ação antitumoral dessas vacinas deve privilegiar a indução de uma resposta citotóxica capaz de reconhecer especificamente e matar as células transformadas pelo vírus (KANODIA; DA SILVA; KAST, 2008).

Alguns ensaios clínicos com vacinas terapêuticas contra tumores ou lesões precursoras induzidas por HPV foram realizados com vacinas baseadas em proteína recombinante, peptídeos ou vacinas de DNA. Os testes mais avançados concentram-se em vacinas baseadas em peptídeos longos ou DNA. Foi

demonstrado que vacinas de DNA podem ser empregadas na imunoterapia do câncer do colo de útero, através da fusão de genes das oncoproteínas de HPV a genes de proteínas com propriedades imunomoduladoras para ativação de respostas citotóxicas T $CD8^+$ específicas (HUNG et al., 2007; KIM et al., 2004). Em relação às vacinas de DNA, duas estratégias estão voltadas para aumentar a imunogenicidade de antígenos do HPV-16. Para isso, o gene que codifica a proteína E7 foi fusionado à proteína de choque térmico HSP70 de *Mycobacterium tuberculosis* ou à CRT (calreticulina) que produz uma proteína híbrida altamente imunogênica (ALVAREZ et al., 2016; TRIMBLE et al., 2009). Outras formulações visam melhorar a entrega do DNA. A vacina VGX3100 codifica regiões consenso das proteínas E6 e E7 dos HPV-16 e -18 e é associada à eletroporação *in vivo* como método de administração (TRIMBLE et al., 2015). Já a vacina de DNA ZYC101a, codifica epitopos HLA-A2 específicos de E6 e E7 dos HPV-16 e -18 e utiliza DNA plasmidial microencapsulado como sistema de entrega (GARCIA et al., 2004). De forma geral, os ensaios clínicos de vacinas terapêuticas demonstraram a geração de respostas específicas contra antígenos de HPV, como anticorpos, células T $CD4^+$ ou T $CD8^+$. Contudo nenhuma das estratégias vacinais empregadas até o momento apresentaram resultados clínicos satisfatórios para promover sua aprovação para uso em humanos até o momento.

Ao contrário do esperado, as vacinas terapêuticas testadas apresentaram resultados clínicos inferiores aos obtidos em fase pré-clinica (MAK; EVANIEW; GHERT, 2014). O contexto imunossupressor desencadeado pelos tumores dificulta a ação dessas vacinas e a regressão completa das lesões ainda precisa ser demonstrada. Sendo assim, o grande desafio das terapias antitumorais baseada em vacinas está em superar a resposta imunossupressora gerada pelo tumor e ativar uma resposta celular específica e eficaz. Células imunossupressoras são recrutadas mediante a secreção de fatores solúveis pelas células tumorais, que migram para o tumor e bloqueiam as funções das células T (WHITESIDE, 2008). Em muitos casos, a geração de um perfil celular imunossupressor está relacionada ao aumento da produção de IL-10, que age em duas vias principais: na expansão de Células Supressoras Derivadas da Linhagem Mielóide (MDSCs) ou de células T regulatórias (Treg) (SONG et al., 2011b; UMANSKY; SEVKO, 2013). Assim, a indução de células supressoras cria um ambiente favorável à progressão do tumor mesmo com ativação

de resposta celular T CD8$^+$ específica por meio de mecanismos diversos como mostrado na Figura 1.

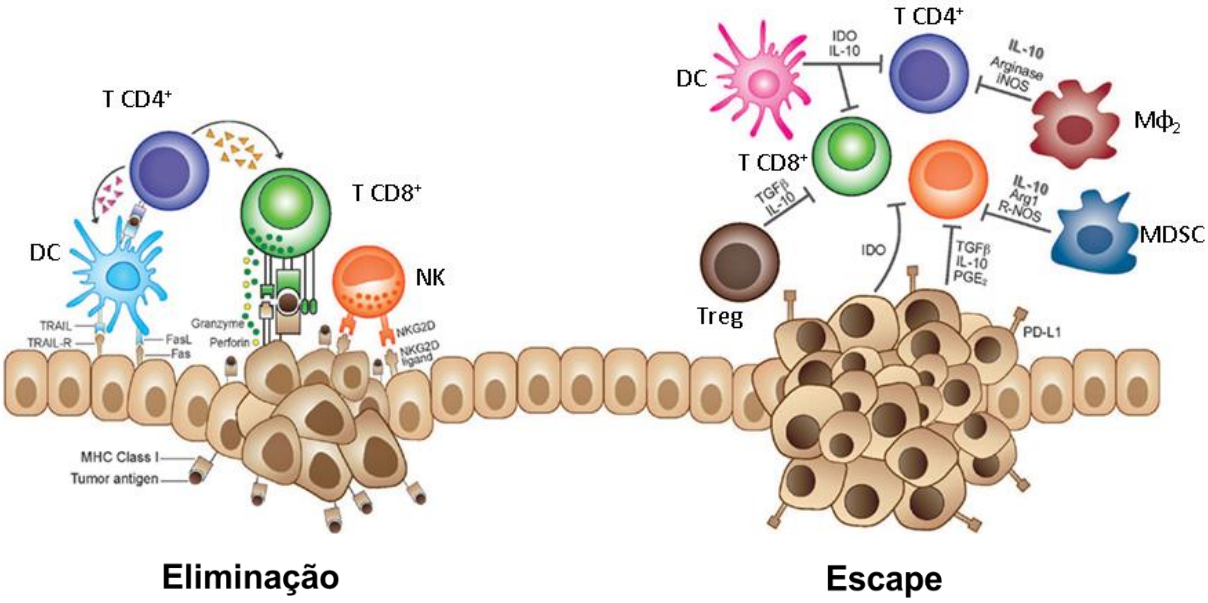

Figura 1 – Microambiente tumoral e mecanismo de citotoxicidade e escape imunológico
Durante a fase de eliminação do tumor, células efetoras como linfócitos T CD8$^+$, células NK, com auxílio de células dendríticas e eventualmente células T CD4$^+$ são capazes de reconhecer os antígenos tumorais eliminar as células neoplásicas. Esta morte depende do reconhecimento de receptores expressos na superfície das células como o complexo TCR-MHC. As células tumorais são capazes de subverter a resposta imune e escapar da vigilância do sistema imunológico, a partir de citocinas que recrutam células supressoras, tais como Treg, MDSC, células dendríticas imaturas e macrófagos M2. As células dendríticas podem causar anergia das células T, devido à falta de moléculas co-estimuladoras e expressão da enzima imunomoduladora indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO). Macrófagos M2 e MDSC podem inibir as respostas das células T através de uma variedade de mecanismos, incluindo o sequestro de nutrientes através da arginase, a geração de espécies reativas de oxigénio (ROS), o óxido nítrico (NO), IL-10, bem como a interferência na migração de células para o tumor. A constante liberação de citocinas como IL-10 causa supressão e anergia de linfócitos T citotóxicos impedindo sua ação antitumoral. Além disso, células tumorais regulam negativamente a expressão de moléculas MHC e aumentam a expressão moléculas inibidoras de linfócitos, tais como PD-L1. Fonte: Adaptado, MONJAZEB et al., 2013.

1.6 A IL-10 e o contexto tumoral

O microambiente tumoral é formado pelas interações entre as células neoplásicas em proliferação, estroma tumoral, vasos sanguíneos, células infiltrantes (inflamatórias e regulatórias) e mediadores químicos do hospedeiro (WHITESIDE, 2008). As redes de sinalizações modulam eventos celulares e moleculares para um perfil que promove o crescimento do tumor, resistência às defesas imunológicas e atenuação da eficácia terapêutica. A citocina IL-10 está presente em diferentes vias imunossupressoras, podendo agir distintamente na modulação da resposta (SATO

et al., 2011). A atuação da IL-10 depende da ligação com o seu receptor, o IL-10R, que é um membro da classe II da família de receptores de citocinas, e composto por tetrâmeros complexos de duas diferentes cadeias: IL-10R1 com 322 aminoácidos e IL-10R2 formado por 62 aminoácidos (PLETNEV et al., 2005). A ligação da IL-10 à porção IL-10R1 induz uma alteração conformacional e a fosforilação de tirosina quinase associada ao receptor, o que permite a sua dimerização com IL-10R2, com consequente sinalização e transdução em células-alvo (RILEY et al., 1999). Uma vez fosforilados, estes resíduos de tirosina atuam como regiões de ancoragem temporárias para o fator de transcrição latente, que ativa STAT3 e a transcrição de genes correspondentes com efeitos anti-inflamatórios (BRAUN; FRIBOURG; SEALFON, 2013).

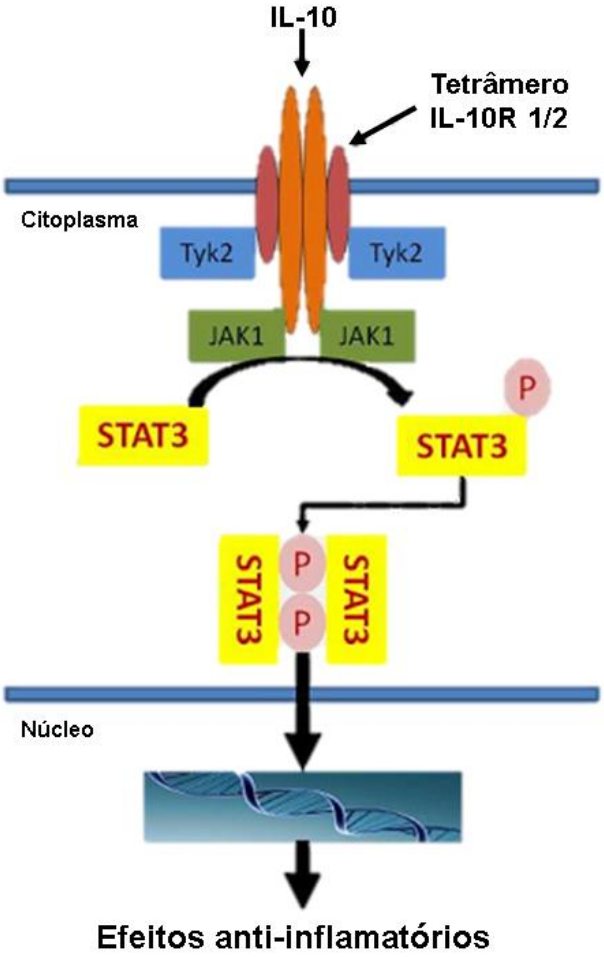

Figura 2 – Representação esquemática do mecanismo de interação da citocina IL-10 com o seu receptor
Após a ligação da IL-10 em seu receptor, é iniciada uma via de sinalização intracelular envolvendo STAT3 como fator de translocação nuclear que induz a ativação de genes que codifica especificamente para fatores anti-inflamatórios. Fonte: Adaptado, FIORANELLI; ROCCIA, 2014.

Muitas células tem a capacidade de produzir IL-10, incluindo células T regulatórias, células B, macrófagos, mastócitos, eosinófilos, células dendríticas, assim como células neoplásicas (DENNIS et al., 2013). Foi demonstrado que essa citocina é altamente expressa em lesões pré-malignas do colo de útero, o que está correlacionado com uma maior predisposição a desenvolver esse carcinoma uterino (SYRJÄNEN et al., 2009). O aumento da expressão de IL-10 está relacionado com a progressão e o grau da lesão. A proteína E2 do HPV é capaz de induzir o aumento da expressão dos níveis de RNA mensageiro de IL-10 pela ligação à região reguladora desse gene. Além disso, na presença dessa citocina, há o aumento da atividade oncogênica da proteína E6 que atua no crescimento do tumor (MADRIGAL et al., 1997; WANG et al., 2013). Neste mesmo cenário, a produção de IL-10 é capaz de aumentar a população de células Treg que também são produtoras dessa citocina. Com isso, a IL-10 contribui para a expressão sustentada de Foxp3, TGF-β e receptor de TGF-β por Tregs ativadas, estabilizando o fenótipo e funções supressoras dessas células (CURIEL, 2007). Células Treg existem naturalmente em baixos níveis, e são responsáveis por controlar tanto a resposta imune inata, como a adaptativa. Em um contexto tumoral, essas células são recrutadas, expandidas e ativadas. Adicionalmente, células T $CD4^+$ podem ser alteradas para um perfil regulatório que expressa Foxp3, sendo chamadas de Treg induzíveis (WHITESIDE, 2012). Através de mecanismos dependentes do contato célula-célula ou secreção de IL-10 e TGF-β essas células inibem a ativação de células T com capacidade antitumoral (MUMM; OFT, 2013). Também com o intuito de bloquear a resposta antitumoral, fatores solúveis produzidos pelo tumor atuam de diferentes formas. VEGF, IL-10 e IL-6, levam a ativação constitutiva da STAT3, um ponto crítico para expressão de citocinas anti-inflamatórias que controla a infiltração de células imunes para o tumor (CURIEL, 2007; HEUSINKVELD; VAN DER BURG, 2011). Além disso, VEGF, TGF-β, IL-10, IL-13 e IL-6 recrutam células MDSC para o ambiente tumoral. As MDSC através da produção de arginase-1 e ativação de óxido nítrico sintase induzida (iNOS) bloqueiam as funções de linfócitos T efetores (SEVKO; UMANSKY, 2013).

1.7 A vacina pgDE7h como estratégia vacinal para controle de tumores induzidos por HPV e medidas para potencializar o seu efeito antitumoral terapêutico

Durante os últimos 12 anos nosso grupo tem se dedicado ao desenvolvimento de duas estratégias vacinais terapêuticas contra tumores induzidos por HPV, uma baseada em DNA e outra em proteína recombinante, que tem como produto uma proteína híbrida, resultado da fusão da glicoproteína D (gD) do Vírus Herpes Simplex do tipo 1 (HSV-1) a oncoproteínas do HPV-16. A proteína gD, presente na vacina pgDE7h, possui propriedades imunomoduladoras, pois se liga ao Mediador de Entrada do Vírus Herpes (HVEM) e compete com o mesmo sítio de ligação do BTLA. A ligação de BTLA ao receptor HVEM induz um sinal inibitório para células B e T (COMPAAN et al., 2005). Entretanto, a interação entre gD e HVEM impede a ligação do BTLA e aumenta a sobrevivência de células dendríticas mediada pela ativação de NFκB (CHEUNG et al., 2009).

Para a vacina de DNA pgDE7h, foi realizada a otimização na sequência de códons para o sistema de expressão de mamíferos, com o intuito de aumentar os níveis de expressão antigênica e, com isso, aprimorar os efeitos da vacina. Células da linhagem tumoral TC-1, transformadas com as proteínas E6 e E7 do HPV-16, foram utilizadas nos testes como modelo de desafio tumoral. A vacina pgDE7h desenvolvida foi capaz de ativar células $TCD8^+$ E7-específicas e gerar proteção antitumoral em 40% dos camundongos tratados terapeuticamente (DINIZ et al., 2010; DINIZ; FERREIRA, 2011; LASARO et al., 2005). A formulação foi aprimorada utilizando diferentes estratégias: coadministração de plasmídeos que codificam citocinas, imunização pela via intradérmica com o *gene gun*, ou administração da vacina associada à eletroporação *in vivo*, que gerou, em todos os casos, um aumento expressivo do efeito terapêutico antitumoral (DINIZ et al., 2013; SALES, et al., resultados submetidos à publicação). As abordagens avaliadas em associação à vacina pgDE7h foram capazes de induzir proteção terapêutica completa quando a imunização foi realizada em até três dias após o desafio. Contudo, em estágios mais avançados do desenvolvimento do tumor, muitas dessas estratégias não foram suficientes para impedir o crescimento tumoral. Diante da potencialidade do antígeno vacinal desenvolvido pelo nosso grupo, e da necessidade de viabilizar a abordagem terapêutica para uso em humanos, com maiores chances de sucesso clinico, devem ser consideradas abordagens voltadas para o controle de

mecanismos de imunossupressão presentes no microambiente tumoral, que possam potencializar e melhorar a eficácia da vacina em estágios de câncer mais avançados.

Com intuito de neutralizar a IL-10 *in vivo* no tratamento de melanoma, um grupo de pesquisadores construiu um plasmídeo que codifica a região extracelular solúvel do receptor de IL-10 (pIL-10R). Animais tratados com esse plasmídeo mostraram tempo de sobrevida prolongado e manutenção de uma resposta pró-inflamatória protetora (MARCHI et al., 2011). A coadministração do vetor que codifica o receptor de IL-10 representa uma alternativa para potencializar o efeito terapêutico da pgDE7h contra tumores que expressam oncoproteínas virais.

A combinação da imunoterapia com estratégias utilizadas na clínica, como quimioterápicos que modulam o ambiente tumoral supressor, representam outras possibilidades de potencialização dos efeitos das vacinas terapêuticas. Drogas quimioterápicas anticâncer são capazes de induzir a morte de células neoplásicas que permitem a liberação de antígenos tumorais. A exposição das oncoproteínas virais torna esses antígenos acessíveis para captação por células apresentadoras de antígenos e leva à sua ativação e à indução de imunidade antitumoral (SMYTH et al., 2016). Além disso, alguns quimioterápicos possuem propriedades adicionais, como por exemplo, apresentar um papel ativo na inibição da proliferação de células imunossupressoras. Nesse sentido, o quimioterápico gencitabina (2’2’-difluoro 2’desocitidina, dFdC), um análogo da citidina, desenvolvido a partir da citosina arabinosa, é usado como tratamento quimioterápico para uma ampla variedade de tumores. Para que sua ação aconteça, é necessário que haja absorção e fosforilação intracelular em monofosfato, difosfato e trifosfato de gencitabina. O efeito tóxico se dá pela incorporação da droga fosforilada aos filamentos de DNA, o que acarreta na inibição de sua síntese. Em ensaios *in vitro* foi comprovado que o quimoterápico promove redução da síntese de DNA e bloqueio do ciclo celular na fase G1 (MINI et al., 2006; UENO; KIYOSAWA; KANIWA, 2007).

Outras evidências demonstram que a gencitabina também atua diretamente na indução de apoptose a partir de um sistema de vigilância que detecta a presença do fármaco (FULDA, 2009). Tal fato tem emergido como um dos principais mecanismos pelo qual o quimioterápico promove o controle da resposta supressora induzida pelo tumor. O fármaco pode ativar a proteína Bax pró-apoptótica (Bcl-2 associada à

proteína X) em MDSCs, e subsequentemente ocasionar a desestabilização do lisossomo dessas células com liberação da protease enzimatica catepsina B. A atividade dessa protease está relacionada com a ativação do inflamassoma, e consequentemente produção e liberação de citocinas imunomoduladoras (SHURIN, 2013). Dessa forma, nossa hipótese é que a gencitabina possa ser um importante adjuvante no tratamento do câncer cervical, principalmente no que concerne à diminuição de células mielóides supressoras no microambiente tumoral. Frente a esse contexto, nenhum trabalho até o momento estudou a associação da gencitabina à imunoterapia contra tumores induzidos por HPV.

Tendo em vista as diferentes abordagens terapêuticas apresentadas anteriormente e a partir do conhecimento dos mecanismos moleculares responsáveis pelo escape imunológico tumoral considera-se racional, uma imunoterapia que seja capaz de englobar o desenvolvimento de uma resposta imunológico antitumoral eficiente, associada à inibição da resposta imunossupressora desencadeada pelo tumor. A presente dissertação propôs então expandir os estudos realizados com a vacina de DNA desenvolvida no laboratório, dedicando-se a investigar sua atividade em um contexto imunossupressor, no qual se concentra a maioria das falhas dos tratamentos antitumorais atualmente em estudo pela comunidade científica. O trabalho, além de inédito, apresenta alta relevância para a sociedade no desenvolvimento de terapias mais seguras e eficientes, particularmente a pacientes infectados pelo HPV que desenvolveram carcinomas associadas ao vírus.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

A presente dissertação de mestrado tem como objetivo principal avaliar os efeitos adjuvantes de estratégias que controlam a imunossupressão desencadeada por tumores que expressam antígenos de HPV-16 em associação à vacina pgDE7h. Neste sentido, foram realizados estudos em três frentes principais:

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar, em modelo murino, o efeito da coadministração de um plasmídeo que codifica o receptor solúvel da citocina IL-10 na potencialização da vacina pgDE7h;

- Investigar o impacto do controle de populações imunossupressoras mediante o uso da quimioterapia com gencitabina, nos efeitos antitumorais induzidos pela vacina pgDE7h;

- Analisar o efeito da coadministração da vacina pgDE7h com o plasmídeo pIL-10R em associação à quimioterapia no controle de tumores que expressam antígenos de HPV-16.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Vetores vacinais

O plasmídeo que expressa a proteína E7 de HPV-16 fusionada à gD de HSV-1 (pgDE7h) foi construído após clonagem do gene sintético que codifica a proteína híbrida gDE7 nos sítios de *Pst*I e *Bgl*II do plasmídeo pUMVC3 (Aldevron, EUA) que possui o gene que codifica resistência à canamicina e promotor de citomegalovírus (CMV). A sequência codificadora de gDE7 foi sintetizada com otimização de códons para o código genético humano. Além disso, na sequência da E7 presente no gene sintético foram realizadas duas mutações pontuais que nocauteiam sua interação com a proteína pRb (DINIZ et al., 2010). O plasmídeo codifica o receptor de IL-10 (PCDNA3-sIL-10R) foi gentilmente cedido pela Prof[a] Elaine Rodrigues (UNIFESP). Para esse plasmídeo, a porção extracelular solúvel do receptor de IL-10 murino (sIL - 10R) que correspondente aos aminoácidos 1-189 foi subclonada no sítio *Not*I do vetor pcDNA3 (Invitrogen) (MARCHI et al., 2011). A obtenção dos plasmídeos para as imunizações foi realizada através de propagações em larga escala a partir de linhagens de *Escherichia coli* DH5α transformadas com os diferentes vetores em meio Luria-Bertani (LB) suplementado com ampicilina (100 µg/mL) ou canamicina (50 µg/mL) (Sigma), seguido da purificação dos plasmídeos a partir do kit de purificação de plasmídeos de Giga Prep (QIAGEN Endo Free Plasmid Giga, QIAGEN), de acordo as instruções do fabricante. As amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro a 260nm e confirmadas por inspeção visual em gel de agarose 0,8% (Invitrogen) após digestão com as enzimas de restrição de clonagem no vetor (Fermentas). Os plasmídeos foram mantidos a -20 ºC até o momento de uso.

3.2 Linhagens celulares

A linhagem celular tumoral TC-1 (LIN et al., 1996) é derivada de células primárias do epitélio pulmonar de C57BL/6 transformadas com c-Has-ras e os genes de E6 e E7 do HPV-16 (gentilmente cedida pelo Dr. T.C. Wu, Universidade Johns Hopkins, EUA). As células TC-1 foram cultivadas em garrafas de plástico (Corning) em meio RPMI (Gbico) suplementado com 50 U/mL penicilina/streptomicina, 10% de

soro fetal bovino (SFB) (Vitrocell, Campinas, São Paulo, Brasil) e mantidas a 37 ºC e 5% de CO_2, até atingirem 80% de confluência. No dia do desafio tumoral as células foram lavadas com solução PBS pH 7,4 e tratadas com Tripsina EDTA (Vitrocell, Campinas, São Paulo, Brasil). Em seguida, as células foram suspensas em meio RPMI contendo 10% de SFB para inativação da tripsina. As células foram centrifugadas a 600g e suspensas em meio RPMI sem SFB, na concentração apropriada para inoculação suspensas em um volume de 100 µL por animal.

3.3 Desafio com células tumorais e protocolo de imunização

Os experimentos de imunização foram realizados com camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 com idade entre 7-8 semanas adquiridos do biotério de Camundongos Isogênicos do Departamento de Parasitologia do ICB-II da USP e manuseados segundo as normas estabelecidas pela comissão de ética desse instituto. Os animais foram desafiados com as células TC-1 por via subcutânea na concentração de 7,5 x 10^4/animal suspensas em 100 µL de meio RPMI e inoculadas em uma região dorso-lateral direita do animal, ou com 7,5 x 10^5 células/animal para os experimentos de nos quais os animais receberam um segundo desafio. Entre 3-14 dias após o desafio, foram iniciados os ensaios de imunizações para avaliar o efeito de regressão de tumores estabelecidos. A imunização foi feita pela via intramuscular convencional com 50 µg de DNA/dose de cada plasmídeo diluído em 100 µl de PBS e inoculados do músculo tibial anterior de cada pata em um volume de 50 µl por pata.

Nos experimentos realizados para avaliação do efeito terapêutico da vacina de DNA pgDE7h mediante a coadministração do plasmídeo que codifica o receptor de IL-10 (pIL-10R), os animais foram divididos em quatro grupos: grupo PBS, imunizado apenas com solução veículo PBS; grupo pIL-10R o qual recebeu o plasmídeo que codifica a porção extracelular solúvel do receptor de IL-10 murino; grupo pgDE7h e o grupo pgDE7h + pIl-10R. A administração da primeira dose vacinal foi realizada 3 e 5 dias depois do desafio com as células tumorais. As imunizações foram feitas com uma dose de 50 µg de pgDE7h, combinada à 50 µg de pIL-10R variando de uma a duas doses, com cinco dias de intervalo entre cada imunização.

A formulação vacinal também foi testada pela via intramuscular seguida da eletroporação como método de entrega do DNA com o uso de 5 µg de pgDE7h combinada a 1 ou 2 doses de 50 µg/dose de pIl-10R com cinco dias de intervalo após a primeira dose. Para esse ensaio, a vacina foi administrada em um volume de 50ul por dose, administrada pela via intramuscular em apenas uma das patas. Nesse processo, foi utilizado o eletrodo CUY560-5-0.5, 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 seis pulsos elétricos de 130 V cada, com duração de 450 ms. Os pulsos elétricos foram entregues utilizando o NEPA21 Super Eletroporador (NepaGeneCo.,Ltd.; Chiba, Japão).

Para execução dos testes de proteção tumoral com a vacina de DNA associada à quimioterapia, os animais foram imunizados 5, 10 ou 14 dias após o desafio. A imunização foi realizada com 50 µg de pgDE7h pela via intramuscular convencional e em seguida submetidos a tratamentos por via intraperitoneal 80 mg/kg de cloridato de gencitabina (GEMZAR, Eli Lilly, Indianapolis, IL), diluídos em um volume de 100 µl de salina apirogênica. Os animais receberam uma segunda dose da vacina e do tratamento com a quimioterapia em um intervalo de sete dias após a primeira imunização.

Alternativamente, foram feitos ensaios associando a coadministração dos plasmídeos pgDE7h e pIL-10R entregues por eletroporação seguindo o mesmo protocolo estabelecido anteriormente associados a uma dose do tratamento com cloridrato de gencitabina. Para isso, os animais foram imunizados 14 dias após o desafio.

3.4 Acompanhamento do tumor

O acompanhamento da evolução dos tumores foi feito três vezes a cada semana e a sobrevivência foi avaliada por um período mínimo de 60 dias. Os tumores, quando presentes, foram medidos com o auxílio de um paquímetro. Para o cálculo de volume tumoral, foram mensurados o diâmetro menor (d) e o diâmetro maior (D) do tumor, e calculado o volume de acordo a fórmula $D \times d^2/2$. Para avaliação da

sobrevivência dos animais, aqueles que apresentaram tumores maiores que 500 mm^3 foram eutanasiados.

3.5 Determinação de células T $CD8^+$ produtoras de citocinas

As amostras de sangue periférico (PBMC) ou baço foram recolhidas 14 dias após a administração da vacina para os ensaios posteriores utilizando o sistema de citometria de fluxo. As células foram tratadas com tampão de lise ACK (BioSource International) para romper hemácias e centrifugadas a 600 g por 5 minutos e ressuspendidas em meio RPMI. Nos ensaios de determinação de citocina intracelular, as células foram incubadas a uma concentração de 10^6 células/poço por 12 horas a 37 ºC, 5% CO_2 em placa de fundo côncavo de 96 poços (Corning) em 200 µl de meio RPMI completo na presença de Brefeldina A (1µg/poço) (GolgiPlug; BD Biosciences), citocina IL-2 (1ng/poço) na ausência ou presença do peptídeo específico de E7 (aminoácidos 49-57; RAHYNIVTF; 300 ng/poço). Em alguns experimentos, anti-CD107a conjugado a Ficoeritrina (PE), 10 µg/ml de monensina (GolgiStop; BD Biosciences) e 2 µg/ml de CD28 (BD Biosciences) foram adicionados durante o estímulo *in vitro*. Após as lavagens, as células foram incubadas com anticorpo anti-$CD8^+$ conjugado a BV605 ou BB515 (BD Bioscience) por 30 minutos a 4 ºC. As células foram lavadas com PBS 2% SFB e fixadas com tampão contendo paraformaldeído a 4%. Em seguida, as células foram permeabilizadas com Cytofix /Cytoperm (BD Biosciences) e incubadas no mesmo tampão com anticorpo anti-IFN-γ PE, anti- IFN-γ Alexa 700 e anti TNF-α PeCy-7 (BD Bioscience) por 30 minutos a 4 ºC. Após as lavagens, as células foram suspensas em PBS 2% SFB. Após as marcações, as células foram adquiridas em citômetro de fluxo LSRFortessa® (BD Bioscience). Os dados foram analisados com o auxílio do programa FlowJo para a determinação das porcentagens de células.

3.6 Caracterização das populações de células imunossupressoras

Baços de camundongos imunizados foram excisados 14 dias após as imunizações e tratados com tampão de lise ACK (BioSource International) para romper hemácias, centrifugados a 600 g por 5 minutos e suspensas em meio RPMI

2% de SFB. Alternativamente, amostras de tumor foram seccionadas e maceradas seguida de digestão enzimática com 1 mg/mL de colagenase (Roche) por 1 hora a 37 ºC. Em seguida, as células foram lavadas e filtradas em filtro de 70 µm (Easy strainer Greiner Bio One) e suspensas em PBS 2% SFB. Para determinação de células mielóides supressoras, a marcação extracelular foi feita com a utilização de anticorpos monoclonais anti-CD11b conjugado a fluoresceína (FITC) ou BB421, anti-Gr1 conjugado a PE (BD Bioscience), incubadas por 30 minutos a 4 ºC. Para os ensaios de análise de células regulatórias, as células foram marcadas com anti-CD4 conjugado ao BV605 e anti CD25 BB515 durante 20 minutos à 4 ºC. Após a permeabilização com Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) por 1 hora minutos a 4 ºC, as células marcadas com anticorpos anti-FoxP3 conjugado ao BV421 (BD Biosciences) por 30 minutos a 4 ºC seguida de lavagem e suspensas em PBS 2% SFB. As células foram examinadas em citometria de fluxo com auxílio do aparelho LSRFortessa® (BD Bioscience) e analisadas no programa FlowJo para a determinação das porcentagens de células $CD11b^+/GR\text{-}1^+$ ou células $CD4^+CD25^{high}$ $FoxP3^+$.

3.7 Análises de linfócitos T $CD8^+$ infiltrantes no tumor

Amostras de tumor foram seccionadas e maceradas seguida de digestão enzimática com 1 mg/mL de colagenase (Roche) por 1 hora a 37 ºC. Em seguida, as células foram lavadas e filtradas em filtro de 70 µm (Easy strainer Greiner Bio One) e suspensas em PBS 2% SFB. A marcação extracelular foi feita com dextrâmero de MHC classe I carregando o peptídeo RAHYNIVTF de E7 conjugado com aloficocianina (APC) (Immudex) por 40 minutos a 4 ºC. Em seguida as células foram marcadas com anti-CD8 BB515 e incubadas por 20 minutos a 4 ºC. Em seguida, as células foram lavadas e suspensas em PBS 2% e adquiridas em citometria de fluxo utilizando o aparelho LSRFortessa™ (BD Bioscience) e analisadas no programa FlowJo para a determinação das porcentagens de células $Dextrâmero^+/CD8^+$ sobe o total de células $CD8^+$.

3.8 Tratamento estatístico

As analises estatísticas foram feitas utilizando o programa GraphPad-Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA-USA). Foi empregado o teste paramétrico *One* ou *Two Way* ANOVA seguindo do teste múltiplo de comparação Bonferroni ou o teste *t-Student* para a comparação de amostras pareadas. Para as análises de sobrevivência foi empregado o teste de Log-rank seguido de pós teste Mantel Cox. Os valores para $p<0.05$ foi considerado estatisticamente significativo com um intervalo de confiança de 95%.

4 RESULTADOS

Diversas plataformas vêm sendo utilizadas no desenvolvimento de vacinas terapêuticas contra tumores. Vacinas de DNA podem ser empregadas na imunoterapia do câncer do colo de útero, por meio da fusão de genes das oncoproteínas de HPV a genes de proteínas com propriedades imunomoduladoras para ativação de respostas citotóxicas alvo-específicas (DINIZ et al., 2010). Testes em modelo murino mostraram que a vacina terapêutica pgDE7h, desenvolvida pelo nosso grupo, é capaz de ativar células T $CD8^+$ E7-específicas e gerar proteção antitumoral em camundongos tratados terapeuticamente. No entanto, em protocolos mais restritivos, a imunização com a vacina pgDE7h sozinha, não é suficiente para controlar o crescimento do tumor. Uma dose de 50 µg da vacina pgDE7h administrada pela via intramuscular até três dias após o desafio tumoral é capaz de conferir proteção terapêutica parcial, mantendo no máximo 50% dos animais livres de tumores, (DINIZ et al., 2013) sendo, por isso, a dose escolhida para os experimentos do presente trabalho. A redução da eficácia da vacina terapêutica em controlar tumores em estágios mais avançados, está particularmente associada a diferentes mecanismos imunossupressores desencadeados pelo tumor que permitem a evasão do sistema imunológico e que, portanto, devem ser superados por estratégias vacinais terapêuticas (LEPIQUE; RABACHINI; VILLA, 2009).

O presente estudo teve como objetivo a investigação da capacidade de métodos que atuam na resposta imunossupressora para potencializar os efeitos antitumorais da vacina de DNA, pgDE7h. Para melhor organização dos resultados a serem descritos, o trabalho realizado está apresentado em três partes. Na primeira parte, um plasmídeo que codifica o receptor de IL-10 (pIL-10R) foi coadministrado ao plasmídeo vacinal pgDE7h com o intuito de se observar o efeito da redução da citocina IL-10 na resposta terapêutica contra tumores. Na segunda parte, avaliamos o efeito da quimioterapia com gencitabina na resposta induzida pela vacina pgDE7h e a capacidade dessa associação em controlar populações imunossupressoras. A terceira e última parte envolveu o estudo do potencial terapêutico induzido pela vacina pgDE7h combinada ao pIL-10R e à gencitabina no controle de tumores associados ao HPV-16.

4.1 Determinação da potência terapêutica de uma vacina de DNA direcionada ao controle de tumores associados ao HPV (pgDE7h) coadministrada com um plasmídeo que codifica o receptor de IL-10 (pIL-10R)

Uma das abordagens para neutralizar a IL-10 *in vivo* é a utilização de plasmídeos que tenham a capacidade de sequestrar essa citocina produzida pelo organismo. Para o tratamento de melanoma, a administração do plasmídeo que codifica o receptor de IL-10 foi capaz de controlar o desenvolvimento do tumor e induzir a proteção terapêutica de 50% dos animais (MARCHI et al., 2011). Contudo, essa abordagem em combinação com vacinas terapêuticas ainda não foi avaliada. Para isso, avaliamos a vacina pgDE7 associada ao pIL-10R no controle de tumores induzidos por HPV-16.

4.1.1 Avaliação do efeito antitumoral terapêutico mediada pela coadministração do plasmídeo pIL-10R ao plasmídeo vacinal pgDE7h

Foram realizados testes de ensaio de proteção terapêutica em camundongos desafiados com 7,5 x 10^4 células TC-1. Três dias após, os animais foram imunizados com 50 µg de pgDE7h associado a uma ou duas doses de 50 µg de pIL-10R, com intervalo de cinco dias entre as doses pela via intramuscular (Figura 3A). Após 14 dias da primeira dose, os animais foram avaliados quanto à presença de linfócitos T $CD8^+$ E7-específicos ativados. Os grupos que receberam pgDE7h sozinha ou em associação ao pIL-10R, mostraram médias estatisticamente similares às frequências de ativação de linfócitos T $CD8^+$ produtores de IFN-γ E7-específicos (aproximadamente 1%) (Figura 3B). Observou-se que os grupos imunizados com a combinação dos plasmídeos, que recebeu uma ou duas doses de pIL-10R, demonstraram um melhor controle do crescimento tumoral em relação aos grupos não tratados ou imunizados apenas com a vacina pgDE7h (Figura 3C). Entretanto, o grupo que recebeu duas doses de pIL-10R apresentou um maior atraso no crescimento do volume tumoral, com diferença significativa em relação ao grupo que recebeu uma dose apenas, e obteve tumores com menor volume. A combinação vacinal não impactou na sobrevivência dos animais em comparação com o grupo imunizado apenas com a vacina pgDE7h, que apresentou 60% de sobrevivência (Figura 3D). Contudo, a associação de uma ou duas doses de pIL-10R gerou um

aumento na proteção antitumoral em relação ao tratamento com a vacina pgDE7h sozinha, resultando em 60% de animais livres de tumores (Figura 3E).

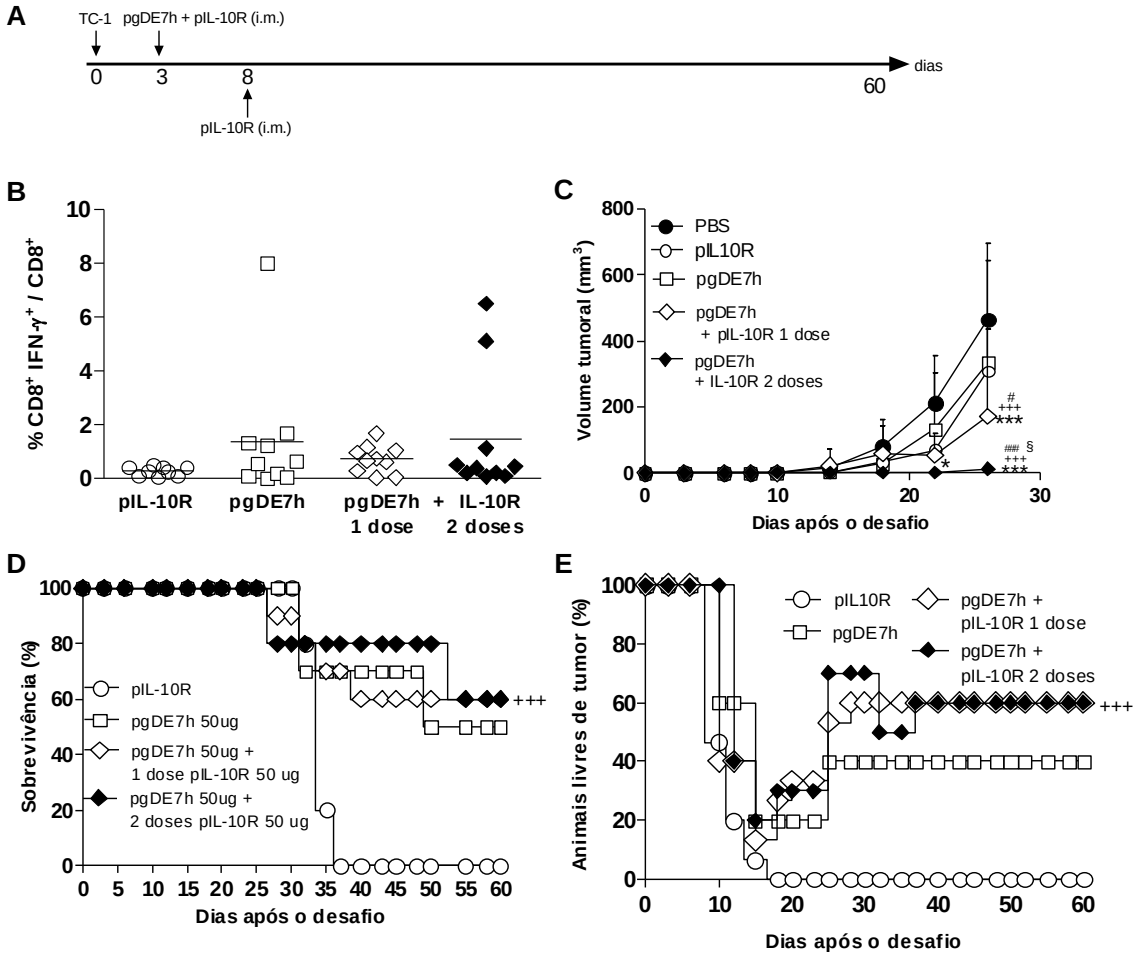

Figura 3 – Ensaio de proteção terapêutica de camundongos C57BL/6 desafiados com células TC-1 e imunizados três dias depois com a coadministração da vacina pgDE7h ao pIL-10R
Três dias após o desafio, os animais foram submetidos à imunização com uma dose de 50 µg de pgDE7h (i.m.) combinado, ou não, a uma dose ou duas doses de 50 µg de pIL-10R administradas pela via i.m., seguindo um intervalo de cinco dias entre as doses. Alternativamente, grupos de animais foram imunizados apenas com duas doses de pIL-10R seguido pelo mesmo protocolo. (A) Esquema de imunização. (B) Porcentagem de linfócitos T $CD8^+$ E7-específicos produtores de IFN-γ mensurados a partir de células de sangue periférico coletadas 14 dias após a segunda dose vacinal e estimuladas *in vitro* com peptídeo MHC classe I restrito derivado de E7. Os valores das células não estimuladas foram abaixo de 0.2% (ANOVA, post test: Bonferroni). (C) Acompanhamento do volume tumoral ao logo do tempo (ANOVA Two Way). (D) Acompanhamento da sobrevivência dos animais por 60 dias. (E) Porcentagem de animais livres de tumores ao longo do período de acompanhamento. (Log-rank – Mantel Cox). (*) *vs* PBS, (+) *vs* pIL-10R, (#) *vs* pgDE7h 50 µg, (§) *vs* pgDE7h + pIL10R 1 dose. Os dados representam três experimentos independentes. (n=10), (*) $p<0.05$ (**) $p<0.01$, (***) $p<0.001$).

Com o intuito de verificar a possível contribuição do plasmídeo pIL-10R na resposta contra tumores em estágio de crescimento mais avançado, o tratamento com a combinação vacinal foi avaliado mais tardiamente após a inoculação das

células TC-1. Para esse experimento, os animais foram imunizados cinco dias após o desafio, com uma dose de 50 µg de pgDE7h associado a duas doses de 50 µg de pIL-10R no mesmo dia e cinco dias após a primeira dose pela via i.m. (Figura 4A). A associação dos dois plasmídeos promoveu um aumento da frequência de linfócitos T $CD8^+$ E7-específicos produtores de IFN-γ, embora não tenha sido observada diferença estatística (Figura 4B). A combinação do plasmídeo pIL-10R à vacina pgDE7h demonstrou maior controle do crescimento tumoral quando comparados aos animais não tratados ou imunizados apenas com a vacina pgDE7h (Figura 4C). Em relação à sobrevivência dos animais, o tratamento proporcionou um aumento de 40 para 60%, comparando os grupos tratados com a vacina pgDE7h ou a combinação pgDE7h+pIL-10R, respectivamente, mas não houve diferença estatística. (Figura 4D). Considerando esses grupos, os dados demonstraram ainda que a imunização apenas com a vacina pgDE7h não foi capaz de manter animais livres de tumores nesse protocolo, enquanto 40% dos animais não desenvolveram tumores durante o período avaliado quando os dois plasmídeos foram combinados (Figura 4E).

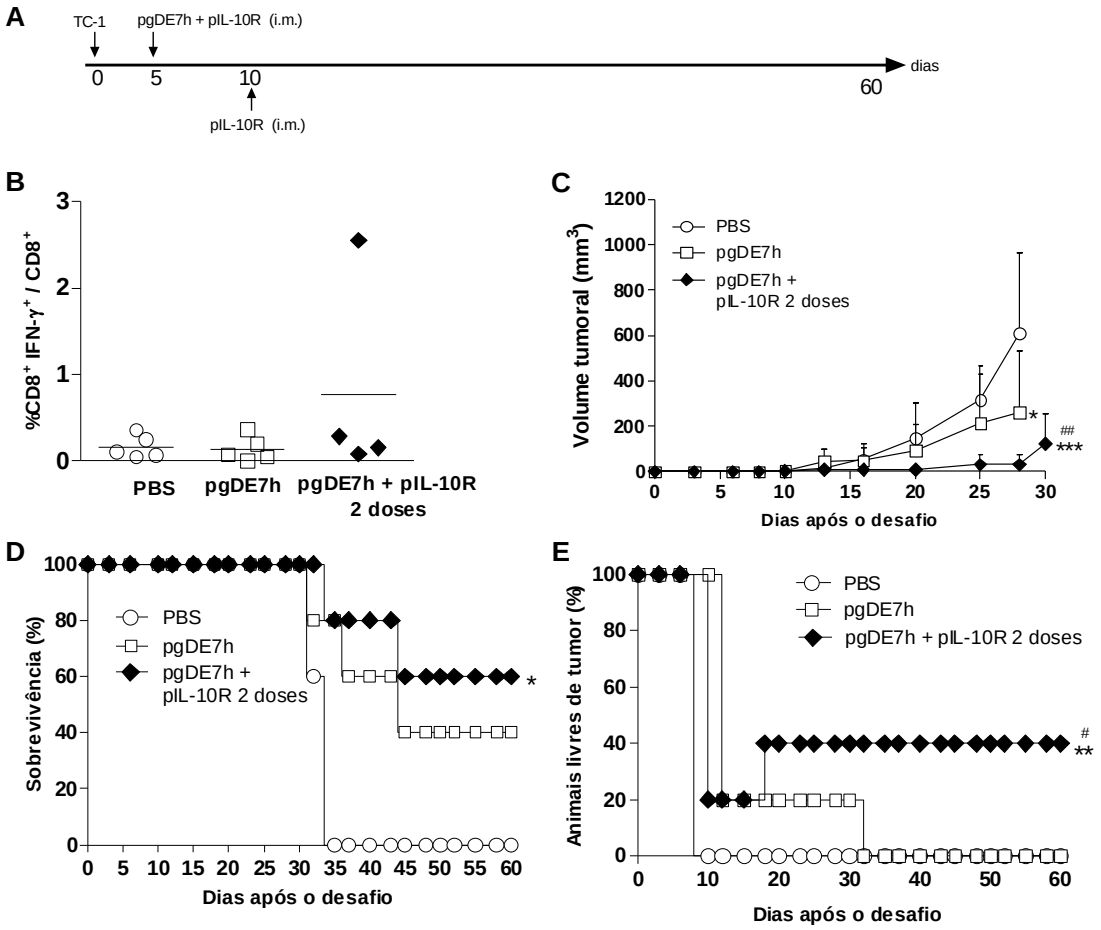

Figura 4 – Ensaio de proteção terapêutica de camundongos C57BL/6 desafiados com células

TC-1 e imunizados cinco dias depois com a coadministração da vacina pgDE7h ao pIL-10R
Cinco dias após o desafio, os animais foram submetidos à imunização com uma dose de 50 µg do pgDE7h (i.m.) combinado, ou não, a duas doses de 50 µg de pIL-10R administrado pela via i.m. em um intervalo de cinco dias entre as doses. (A) Esquema de imunização. (B) Porcentagem de linfócitos T $CD8^+$ E7-específicos produtores de IFN-γ mensurados a partir de células de sangue periférico coletadas 14 dias após a segunda dose vacinal e estimuladas *in vitro* com peptídeo MHC classe I restrito derivado de E7. Os valores das células não estimuladas foram abaixo de 0.2% (ANOVA, post test: Bonferroni) (C) Acompanhamento do volume tumoral ao longo do tempo. (Two Way ANOVA) (D) Acompanhamento da sobrevivência dos animais por 60 dias. (E) Porcentagem de animais livres de tumores ao longo do período de acompanhamento.(Log-rank – Mantel Cox). (*) *vs* PBS, (#) *vs* pgDE7h 50 µg. (n=5). (*) $p<0.05$ (**) $p<0.01$, (***) $p<0.001$).

4.1.2 Avaliação do efeito antitumoral terapêutico mediada pela coadministração do plasmídeo que expressa o receptor de IL-10 ao plasmídeo vacinal pgDE7h associada à eletroporação como método de entrega

Baseados nos resultados anteriores, a imunização pela via i.m. apresentou um controle tumoral sutil quando avaliado com o intervalo de cinco dias entre o desafio e a imunização. Como forma de melhorar a transfecção de células com as vacinas de DNA, para obter maior quantidade do antígeno codificado pelo plasmídeo e consequentemente, potencializar seu efeito terapêutico, utilizou-se a eletroporação para a entrega das vacinas. Esse método contribui de forma mais expressiva na indução da resposta imunológica, com a necessidade de inoculação de quantidades menores de DNA. Para tanto, escolhemos a dose de 5 µg do plasmídeo pgDE7h, correspondendo a uma dose subótima da vacina, baseados em trabalhos anteriores do nosso grupo (Sales *et al*., dados submetidos à publicação). Como tentativa de encontrar um efeito mais evidente no controle da IL-10, foi utilizada a dose de 50 µg do pIL-10R avaliado no regime vacinal de dose única ou de duas doses com intervalo de cinco dias.

Camundongos desafiados com as células tumorais foram imunizados após 5 dias com uma mistura de 5 µg de pgDE7h e 50 µg de pIL-10R seguida de eletroporação. Adicionalmente, uma segunda imunização com 50 µg de pIL-10R foi aplicada em alguns animais, pelo mesmo método de administração (Figura 5A). Os resultados demonstraram que os animais imunizados com a combinação vacinal ou apenas com a vacina pgDE7h foram capazes de induzir resposta de células T $CD8^+$ produtoras de IFN-γ (Figura 5B). No entanto, a combinação dos dois plasmídeos associados à eletroporação demonstrou um melhor controle do crescimento do tumor quando comparados aos animais não tratados ou imunizados apenas com a

vacina pgDE7h (Figura 5C). A sobrevivência dos animais nos diferentes grupos foi semelhante e não apresentou diferenças estatísticas, uma vez que a eletroporação induziu em ambos os grupos um aumento na sobrevivência, mesmo quando utilizados apenas 5 µg de DNA para a vacina pgDE7h vacinados 5 dias após o desafio (Figura 5D). Foi possível observar que a combinação de uma ou duas doses do plasmídeo pIL-10R foi capaz de promover um aumento de 50% para 90% e 70%, respectivamente, no número de animais livres de tumores em relação à vacina de DNA pgDE7h sozinha (Figura 5E). Não houve diferenças estatísticas entre os protocolos administrados com uma ou duas doses de pIL-10R dentre todos os parâmetros avaliados.

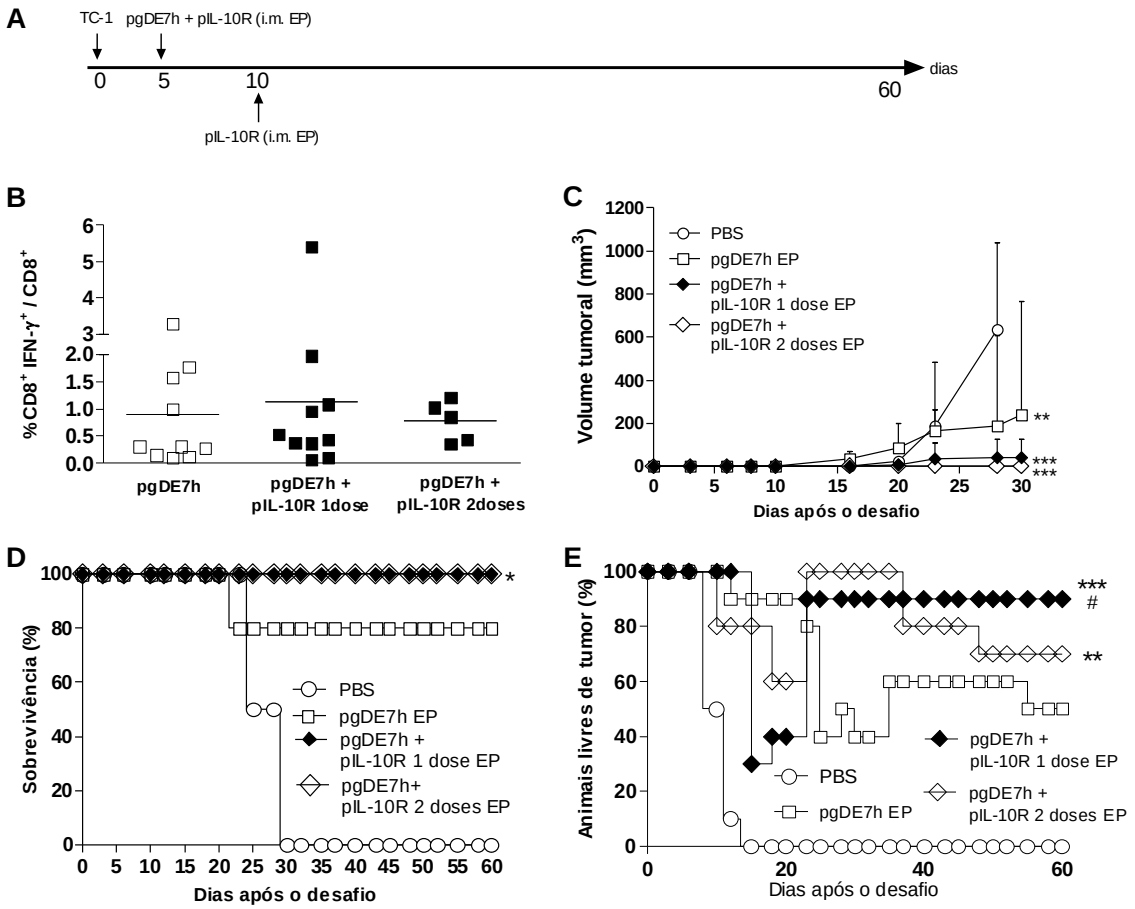

Figura 5 – Efeito da resposta de linfócitos e ensaio de proteção terapêutica de camundongos desafiados com células TC-1 e imunizados com a vacina pgDE7h associada ao pIL-10R pelo método de eletroporação

Os animais desafiados receberam 5 dias após o desafio, uma dose de 5 µg de pgDE7h associada, ou não, a uma ou duas doses de 50 µg de pIL-10R. O intervalo entre o a primeira e a segunda dose foi de cinco dias. A imunização foi administrada pela via intramuscular associada à eletroporação (A) Esquema de protocolo vacinal. (B) Porcentagem de linfócitos T $CD8^+$ E7-específicos produtores de IFN-γ mensurados a partir de células de sangue periférico coletadas 14 dias após a segunda dose vacinal e estimuladas *in vitro* com peptídeo MHC classe I restrito derivado de E7. As células não estimuladas apresentaram porcentagens abaixo de 0.2%. (ANOVA, post test: Bonferroni) (C) Medição

do volume tumoral ao longo do tempo. (Two Way ANOVA) (D) Acompanhamento da sobrevivência dos animais por 60 dias. (E) Porcentagem de animais livre de tumor durante o período de acompanhamento (Log-rank – Mantel Cox). (*) *vs* PBS, (#) *vs* pgDE7h 50 µg. Os dados representam dois experimentos independentes. (n=10). (*) $p<0.05$ (**) $p<0.01$, (***) $p<0.001$).

Com o objetivo de avaliar a capacidade da combinação vacinal em promover a regressão em tumores já estabelecidos, o intervalo entre o desafio e a imunização foi aumentado e testado dentro do mesmo regime vacinal. O protocolo foi iniciado quando os tumores se encontravam palpáveis (volume de cerca de 1 mm^3). Com isso, os animais desafiados com TC-1, foram imunizados após 14 dias com 5 µg de pgDE7h e 50 µg de pIL-10R por eletroporação. Um grupo de animais recebeu uma segunda imunização com 50 µg de pIL-10R seguida de eletroporação como método de entrega (Figura 6A). A associação dos dois plasmídeos administrados com eletroporação induziu um aumento robusto na resposta de linfócitos T $CD8^+$ produtores de IFN-γ específicos para a proteína E7 em comparação com a vacina sozinha (Figura 6B). Observou-se ainda que a combinação vacinal permitiu um melhor controle do crescimento do volume tumoral, fato não evidenciado quando os animais foram imunizados apenas com um dos plasmídeos (Figura 6C). A associação dos plasmídeos pIL-10R com a vacina pgDE7h por eletroporação aumentou em 20% tanto a taxa de sobrevivência (Figura 6D) como o número de animais livres de tumor (Figura 6E) em comparação com o tratamento com a vacina sozinha, mas não houve diferença estatística entre esses grupos. A administração de três doses do pIL-10R em cominação com pgDE7h não apresentou diferenças significativas em comparação com grupo que recebeu duas doses de receptor associadas à vacina (dados não mostrados).

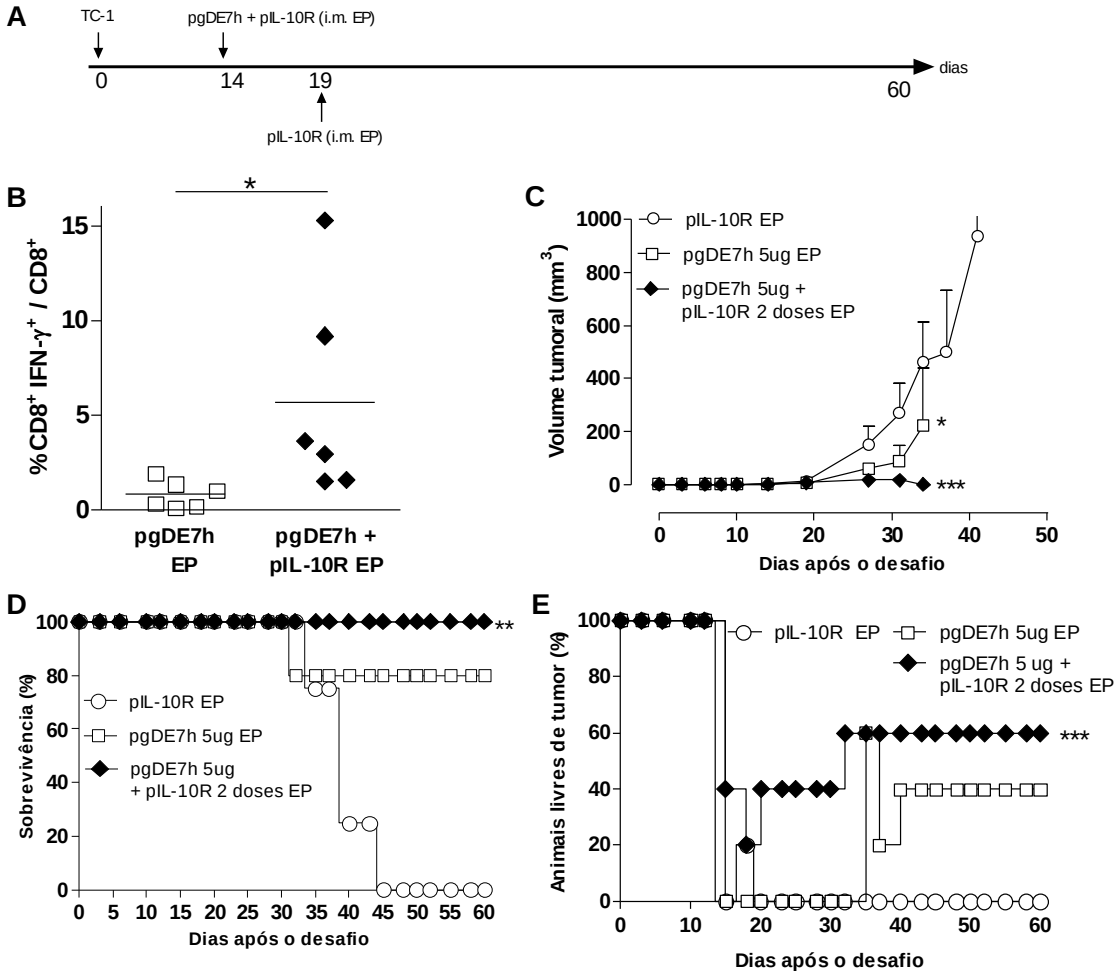

Figura 6 – Efeito do espaçamento temporal entre o desafio e a imunização com a vacina pgDE7h associada ao pIL-10R pelo método de eletroporação na resposta de linfócitos e proteção antitumoral terapêutica

Os animais desafiados receberam 14 dias após o desafio, uma dose de 5 µg de pgDE7h associada, ou não, a duas doses de 50 µg de pIL-10R. O intervalo entre o a primeira e a segunda dose foi de cinco dias. A imunização foi administrada pela via intramuscular associada à eletroporação (A) Esquema de protocolo vacinal. (B) Porcentagem de linfócitos T $CD8^+$ E7-específicos produtores de IFN-γ mensurados a partir de células de sangue periférico coletadas 14 dias após a segunda dose vacinal e estimuladas *in vitro* com peptídeo MHC classe I restrito derivado de E7. As células não estimuladas apresentaram porcentagens abaixo de 0.2%. (t-Student) (C) Efeito da imunização sobre o volume tumoral. (Two Way ANOVA) (D) Acompanhamento da sobrevivência dos animais por 60 dias. (E) Porcentagem de animais livres de tumor. (Log-rank – Mantel Cox). (*) *vs* PBS. Os dados representam dois experimentos independentes. (n=10). (*) p<0,05, (**) p<0.01, (***) p<0,001.

4.1.3 Impacto da coadministração do pIL-10R ao plasmídeo vacinal pgDE7h entregue por eletroporação na resposta celular e na infiltração de células para o sítio tumoral

O desenvolvimento de uma resposta antitumoral por uma vacina terapêutica está relacionado com a indução de linfócitos capazes de reconhecer os antígenos tumorais e desenvolver uma resposta celular citotóxica. Sob essa perspectiva,

investigamos os mecanismos relacionados com a proteção terapêutica promovida pela associação da vacina pgDE7h ao pIL-10R entregues por eletroporação. Para tanto, seguimos o protocolo estabelecido anteriormente no qual os animais foram desafiados com as células TC-1 e imunizados após 14 dias com 5 µg de pgDE7h e 50 µg de pIl-10R por eletroporação. A segunda dose foi administrada cinco dias depois com 50 µg de pIL-10R pelo mesmo método de administração (Figura 6A).

Inicialmente, avaliamos o impacto da formulação vacinal na ativação de linfócitos TCD8$^+$ E7-específicos a partir da produção de IFN-γ em células do baço de animais tratados com os diferentes protocolos. De fato, a imunização com a combinação plasmidial utilizando a eletroporação, induziu um aumento significativo na frequência de linfócitos T CD8$^+$ ativados com capacidade de reconhecer os antígenos tumorais (Figura 7). Foi possível perceber que houve um moderado efeito na ativação de linfócitos quando os animais foram imunizados apenas com a vacina pgDE7h. Em contrapartida, a associação dos dois plasmídeos permite observar um real impacto na resposta em animais com tumores estabelecidos.

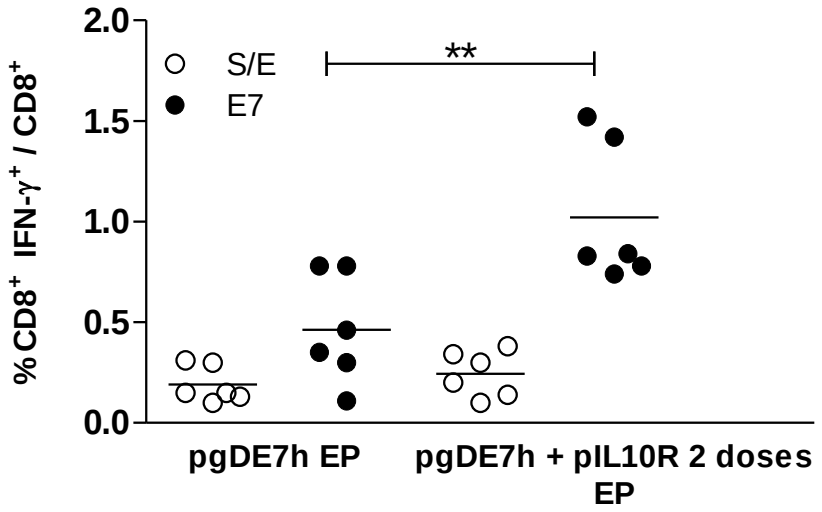

Figura 7 – Ativação de linfócitos T CD8$^+$ E7-específicos após vacinação com a vacina pgDE7h associada ao pIL-10R pelo método de eletroporação
Quatorze dias após o desafio com as células tumorais, os animais foram imunizados com 5 µg de pgDE7h associado, ou não, a duas doses de 50 µg de pIL-10R por eletroporação. Quatorze dias depois da primeira dose, foi avaliada a porcentagem de células T CD8$^+$ produtoras de IFN-γ presentes no baço. As células foram estimuladas com o peptídeo E7$^{(49-57)}$ MHC classe I restrito ou mantidas sem estímulo (S/E). (ANOVA, post test: Bonferroni), (n=6). (**) p<0,01.

Em seguida, analisamos a capacidade de linfócitos T $CD8^+$ ativados pela imunização em expressar outras moléculas e citocinas além de IFN-γ, o que indicaria uma polifuncionalidade dos linfócitos na sua função efetora. As células T $CD8^+$ ativadas (capazes de expressar IFN-γ) induzidas pela vacinação apenas com pgDE7h tiveram baixos níveis de expressão de CD107a, molécula envolvida com a degranulação de linfócitos citotóxicos, ou de TNF-α (Figura 8 A e B). Em contraste, a coadministração da vacina com o receptor de IL-10 causou um pronunciado aumento na produção simultânea de IFN-γ e CD107a ou de IFN-γ e TNF-α (Figura 8 A e B). Dessa forma, é possível perceber que a associação do pIL-10R à vacina pgDE7h além de aumentar significativamente a frequência de linfócitos T $CD8^+$ IFN-γ^+, foi capaz de induzir um perfil polifuncional dos linfócitos. Outras moléculas como IL-2, granzimas e perforinas apresentaram índices indetectáveis nesse ensaio (dados não mostrados).

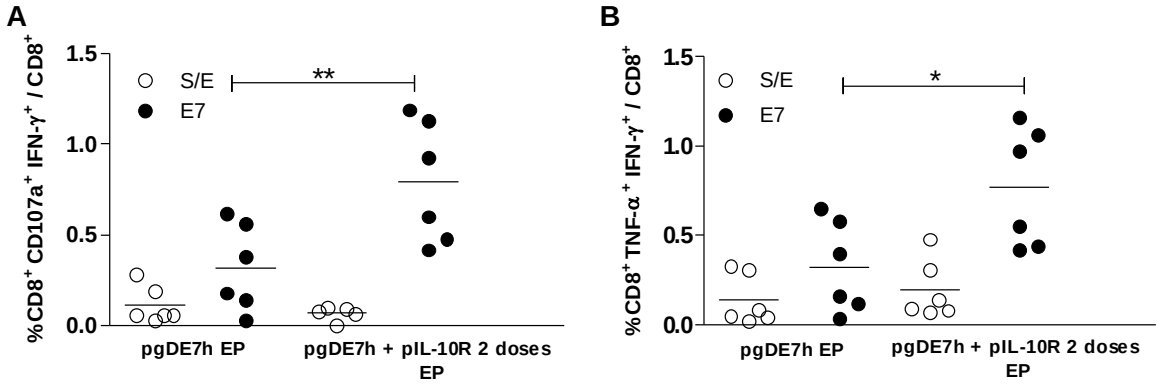

Figura 8 – Ativação de linfócitos T $CD8^+$ E7-específicos polifuncionais após vacinação com a vacina pgDE7h associada ao pIL-10R pelo método da eletroporação
Quatorze dias após o desafio com células tumorais os animais foram imunizados com 5 µg de pgDE7h associado, ou não, a duas doses de 50 µg de pIL-10R por eletroporação. Quatorze dias depois da primeira dose, foi avaliada por citometria de fluxo a porcentagem de células T $CD8^+$ capazes de expressar simultaneamente $CD107a^+$ e IFN-γ ou IFN-γ e TNF-α presentes no baço. As células foram incubadas com o peptídeo $E7^{(49-57)}$ MHC classe I restrito ou mantidas sem estímulo (S/E). (A) Porcentagem de células $CD8^+$ $CD107a^+$ IFN-γ sobre o total de células $CD8^+$. (B) Porcentagem de células $CD8^+$ TNF-α $^+$ IFN-γ sobre o total de células $CD8^+$ (ANOVA, post test: Bonferroni), (n=6). (*) $p<0,05$; (**) $p<0,01$.

O estabelecimento de mecanismos de imunossupressão durante o desenvolvimento do tumor é comum entre diversos tipos de câncer e está relacionado com a inativação de respostas antitumorais mediadas por células T, permitindo a proliferação e a sobrevivência das células tumorais. Frequentemente, a

expansão de células mielóides supressoras no baço está relacionada a um quadro de imunossupressão, que entre outras ações pode inibir a ativação de células T. As células MDSC compreendem subpopulações distintas de células indiferenciadas que expressam principalmente os antígenos Gr-1 e CD11b na superfície celular. Nesse sentido, buscamos caracterizar as populações de células MDSC ou de linfócito T $CD4^+$ com um perfil regulatório caracterizados pela expressão aumentada da molécula CD25 e do fator de transcrição FoxP3, que estavam presentes no baço de animais desafiados com as células tumorais e tratados com os diferentes protocolos. Os dados mostram que a imunização com a vacina pgDE7h associada ao pIL-10R auxiliou no controle da expansão das células mielóides supressoras no baço, resposta que não é eficientemente inibida em todos os animais do grupo imunizado apenas com o pgDE7h, embora não houve diferença estatística (Figura 9A). Em contraste, para a maioria dos animais não foi observada a expansão de células T regulatórias no baço de camundongos imunizados associados, ou não, ao pIL-10R durante período avaliado (Figura 9B). É interessante ressaltar que apenas um animal não conseguiu inibir o aumento da frequência dessas células, que pode estar associado à inibição do efeito antitumoral visto em alguns animais desse grupo, como demonstrado anteriormente.

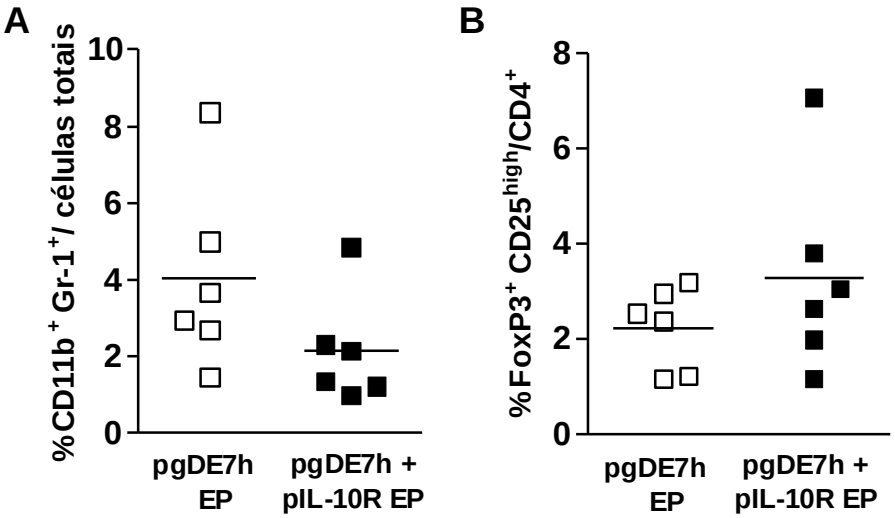

Figura 9 – Caracterização de populações celulares imunossupressoras presentes no baço de animais desafiados com células TC-1 e coadministrados com pgDE7h e pIL-10R entregues por eletroporação

Quatorze dias após o desafio com células tumorais, os animais foram imunizados com 5 µg de pgDE7h associado, ou não, a duas doses de 50 µg de pIL-10R por eletroporação. Quatorze dias depois da primeira dose, células do baço foram coletadas, marcadas e analisadas por citometria de fluxo. (A) Frequência de células positivas para os anticorpos anti-CD11b e anti-Gr-1. (B)

Frequencia de células positivas para os anticorpos anti-CD4, anti-CD25 e marcação intracelular do fator de transcrição FoxP3. (ANOVA, post test: Bonferroni), (n=5).

Um dos parâmetros imunológicos de maior relevância no desenvolvimento de abordagens imunoterapêuticas contra o câncer é a capacidade de induzir a infiltração de células T citotóxicas para o sítio tumoral. Nesse sentido, procuramos detectar a presença de linfócitos T $CD8^+$ presentes no tumor de animais imunizados por citometria de fluxo. Os dados revelaram que a associação do pIL-10R com a vacina pgDE7h induziu um aumento de 10x no influxo de células T $CD8^+$ para o sítio tumoral comparados com o grupo que recebeu apenas pgDE7h (Figura 10A). De forma relevante, grande parte dos linfócitos T $CD8^+$ presentes no microambiente tumoral foi capaz de reconhecer o antígeno E7 presente nas células tumorais (Figura 10B). Nota-se que o bloqueio da citocina IL-10, favorecido pelo pIL-10R, permitiu migração dos linfócitos T $CD8^+$ E7-específicos para o tumor.

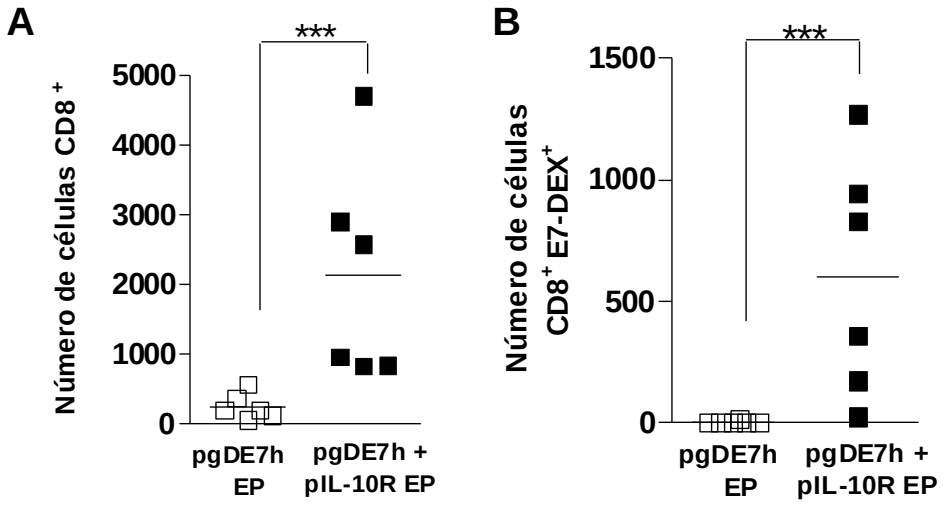

Figura 10 – Determinação da infiltração de linfócitos T $CD8^+$ E7-específicos para o sítio tumoral de animais desafiados com células TC-1 e coadministrados com pgDE7h e pIL-10R entregues por eletroporação

Quatorze dias após o desafio com células tumorais, os animais foram imunizados com 5 µg de pgDE7h associado, ou não, a duas doses de 50 µg de pIL-10R por eletroporação. Quatorze dias depois da primeira dose, foram coletados o tumor dos animais, processados e as células marcadas para análise quanto a presença de Linfócitos T $CD8^+$ E7-específicos. (A) Número de células T $CD8^+$ infiltradas no sitio do tumor. (B) Número de células T $CD8^+$ E7-específicas marcadas com dextrâmero de MHC-I contendo o peptídeo CD8-específico para a proteína E7 (RAHYNIVTF). (*t-Student*), (n=6). (***) $p<0.001$

4.2 Efeito do potencial terapêutico da vacina pgDE7h em associação à quimioterapia com gencitabina

Durante a progressão do câncer, as células tumorais podem desencadear vários mecanismos para evitar o reconhecimento imunológico e a sua destruição. Nesse sentido, os efeitos das vacinas terapêuticas também podem ser potencializados por meio da combinação com agentes quimioterápicos frequentemente incluídos nos regimes de tratamentos contra câncer para condicionar um meio propício à modulação imunológica. Nesse segundo capítulo, buscou-se melhor explorar os efeitos do fármaco gencitabina em associação com a vacina pgDE7h na resposta protetora terapêutica a tumores formados por células TC-1.

4.2.1 Avaliação do efeito antitumoral terapêutico da vacina pgDE7h em combinação com a quimioterapia com gencitabina

Inicialmente, foi avaliado se a administração do quimioterápico gencitabina proporcionava um incremento no efeito terapêutico da vacina pgDE7h. Para isso, cinco dias após o desafio com células TC-1, camundongos C57BL/6 foram tratados com duas doses de 80 mg/kg de cloridato de gencitabina (GEN) em combinação com duas doses 50 µg de pgDE7h em um intervalo de 7 dias entre as doses (Figura 11A). Quatorze dias após a segunda dose, foi monitorado o número de linfócitos T $CD8^+$ produtores de IFN-γ e observada a progressão tumoral durante 60 dias. Em relação à resposta celular E7-específica, a combinação de gencitabina com a vacina foi capaz de aumentar a resposta de células T $CD8^+$ em relação ao grupo PBS, mas não em relação ao grupo que recebeu apenas a vacina pgDE7h (Figura 11B). O grupo imunizado com a vacina pgDE7h combinada ao quimioterápico, bem como os animais que receberam os tratamentos separadamente, foram capazes de controlar o crescimento tumoral inicialmente (Figura 11C). Entretanto, ao final do período de acompanhamento, foi possível notar que a vacina pgDE7h ou a quimioterapia sozinha prolongou parcialmente o período de sobrevida dos animais, mas não conseguiu impedir a formação de tumores. Em contrapartida, a associação da quimio-imunoterapia foi capaz de aumentar significativamente a sobrevivência dos animais e gerou total proteção terapêutica a tumores induzidos por células TC-1 (Figura 11 D e E) que mostrou um efeito sinérgico da combinação imunoterápica.

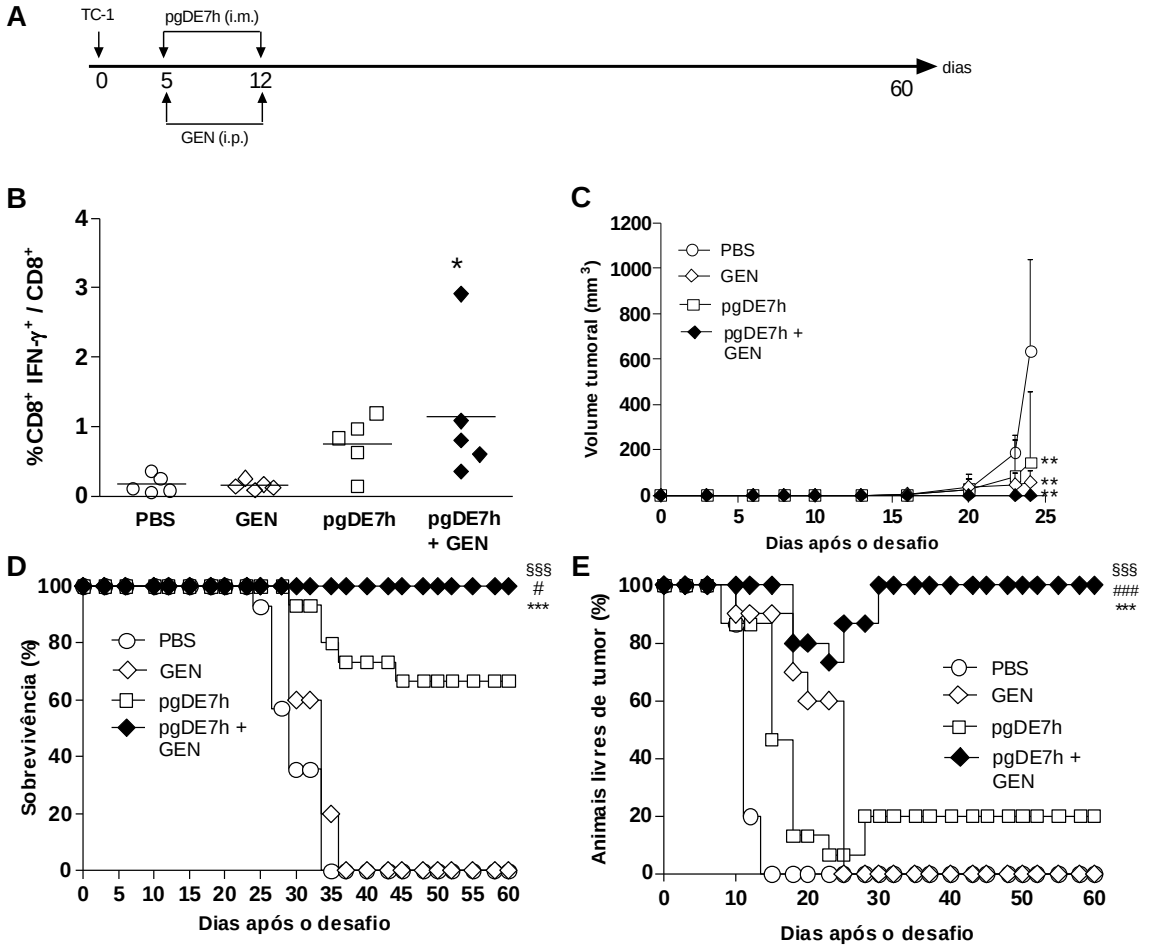

Figura 11 – Ensaio de proteção terapêutica de camundongos C57BL/6 desafiados com células TC-1 e imunizados com a vacina pgDE7h combinado ao tratamento com gencitabina (GEN) Cinco dias após o desafio, os animais foram submetidos à imunização com duas doses de 50 µg de pgDE7h (i.m.) associados ao tratamento com 80 mg/kg de gencitabina administrada pela via i.p. em um intervalo de 7 dias entre cada dose (A) Esquema de imunização. (B) Porcentagem de linfócitos T $CD8^+$ E7-específicos produtores de IFN-γ mensurados a partir de células de sangue periférico coletado 14 dias após a segunda dose vacinal e estimulados *in vitro* com peptídeo MHC classe I restrito derivado de E7. Os valores das células não estimuladas mantiveram-se abaixo de 0.2% (ANOVA, post test: Bonferroni) (C) Volume tumoral ao longo do tempo (Two Way ANOVA) (D) Acompanhamento da sobrevivência dos animais por 60 dias. (E) Porcentagem de animais livres de tumores ao longo do período de acompanhamento. (Log-rank – Mantel Cox). (*) *vs* PBS, (#) *vs* pgDE7h 50 µg, (§) *vs* GEN. Os dados representam três experimentos independentes. (n=15), (*) $p<0.05$ (**) $p<0.01$, (***) $p<0.001$).

4.2.2 Avaliação da resposta celular e controle de células imunossupressoras induzidos pela vacinação com pgDE7h associada à gencitabina

Evidências obtidas em trabalhos anteriores do nosso grupo, demonstraram que o principal efeito protetor gerado pela vacina pgDE7h ocorre devido à ativação de linfócitos T $CD8^+$ capazes de reconhecer especificamente a oncoproteína E7 presente em células tumorais. A partir dos resultados de proteção tumoral obtidos no presente trabalho, procuramos explorar a ativação de linfócitos T $CD8^+$ E7-

específicos pelo tratamento em outro sítio anatômico. Para isso, camundongos imunizados com a vacina pgDE7h, combinada ou não ao quimioterápico, tiveram o baço coletado 14 dias após a última dose. Ambos os grupos de animais tiveram médias estatisticamente similares (em torno de 1%) no número de linfócitos T $CD8^+$ produtores de IFN-γ E7-específicos (Figura 12). É possível observar que a ativação de linfócitos T $CD8^+$ é um efeito da vacinação com a pgDE7h e não é aumentada com a quimioterapia para esse regime vacinal.

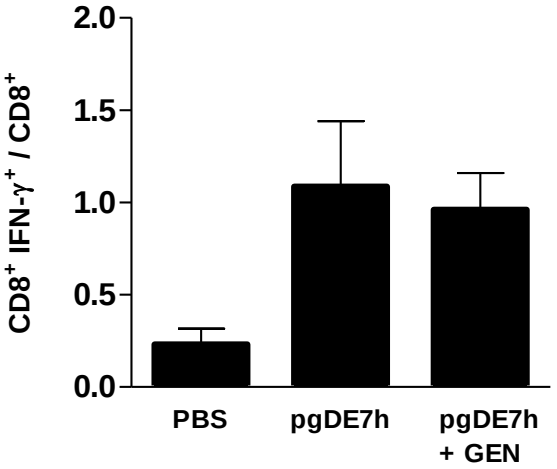

Figura 12 – Ativação de linfócitos T $CD8^+$ E7-específicos após vacinação com pgDE7h em associação com a quimioterapia com gencitabina presente no baço
Cinco dias após o desafio, os animais foram submetidos à imunização com duas doses de 50 µg de pgDE7h (i.m.) associados, ou não, ao tratamento com 80 mg/kg de gencitabina administrada pela via i.p. em um intervalo de 7 dias entre cada dose. Figura representativa da porcentagem de células T $CD8^+$ produtoras de IFN-γ em esplenócitos coletados 14 dias após a última imunização. As células foram estimuladas com o peptídeo $E7^{(49-57)}$. Os valores das células não estimuladas são inferiores a 0.2%. (ANOVA, post test: Bonferroni), (n=5).

Com o objetivo de identificar os mecanismos que contribuem para a potencialização do efeito antitumoral protetor observado pela associação da quimioterapia com a vacina pgDE7h, buscamos investigar a presença de populações celulares imunossupressoras, que estão relacionadas com a progressão tumoral. Determinamos então, a frequência dessas células em baços de camundongos imunizados e tratados ou não com gencitabina 14 dias após a segunda dose. Os resultados obtidos nessa análise mostraram que, como esperado, os animais não tratados apresentam uma maior frequência das células MDSC em comparação aos animais que não foram desafiados (*naïve*). Contudo, animais que receberam o tratamento com a vacina combinada à quimioterapia são capazes de controlar a

expansão dessas células no baço, com médias semelhantes aos animais *naïve*. O grupo imunizado somente com a vacina pgDE7h, embora tenha demonstrado um aumento da frequência das células MDSC, não apresentou diferença estatística entre os grupos PBS ou tratado com gencitabina (Figura 13).

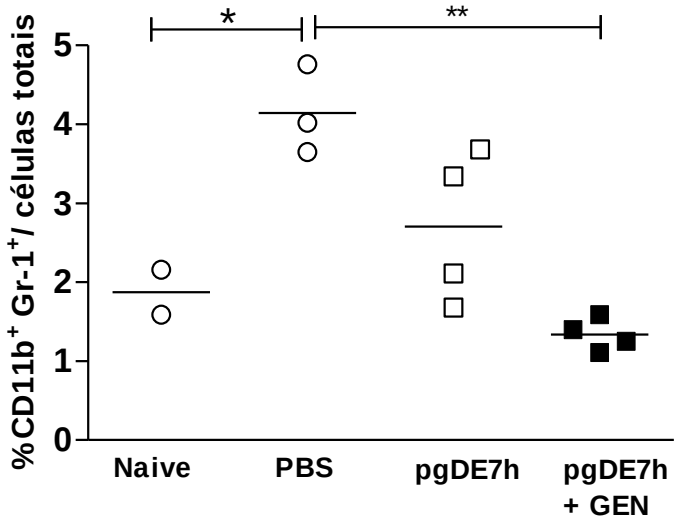

Figura 13 – A imunização com a vacina pgDE7h em combinação com gencitabina controla a expansão de células mielóides supressoras no baço
Cinco dias após o desafio, os animais foram submetidos à imunização com duas doses de 50 µg de pgDE7h (i.m.) associados, ou não, ao tratamento com 80 mg/kg de gencitabina administrada pela via i.p. em um intervalo de 7 dias entre cada dose. Quatorze dias após a segunda dose, células do baço foram coletadas e marcadas com anticorpos anti-CD11b e anti-Gr-1. Representação gráfica da frequência das MDSCs. (ANOVA, post test: Bonferroni), (n=2-4). * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

Em continuidade aos nossos achados em relação às células mielóides supressoras, fomos à busca de outra população de células com importância no desenvolvimento de um ambiente imunossupressor. Sendo assim, avaliamos a frequência de linfócitos T $CD4^+$ com perfil regulatório. Nesse ensaio, camundongos imunizados com duas doses da vacina pgDE7h em combinação com a quimioterapia com gencitabina tiveram os esplenócitos coletados e analisados *ex-vivo* quanto à presença de linfócitos T regulatórios. Os animais que não receberam nenhuma terapia tiveram um aumento da frequência de células T regulatórias presentes no baço. O grupo que foi imunizado apenas com a vacina pgDE7h, não foi capaz de controlar a expansão dessas células, indicando que a vacina sozinha não inibe o desencadeamento de um quadro imunossupressor. Por outro lado, a combinação da quimioterapia com a vacina foi capaz de controlar a expansão das células

regulatórias com níveis semelhantes aos animais que não foram desafiados (Figura 14).

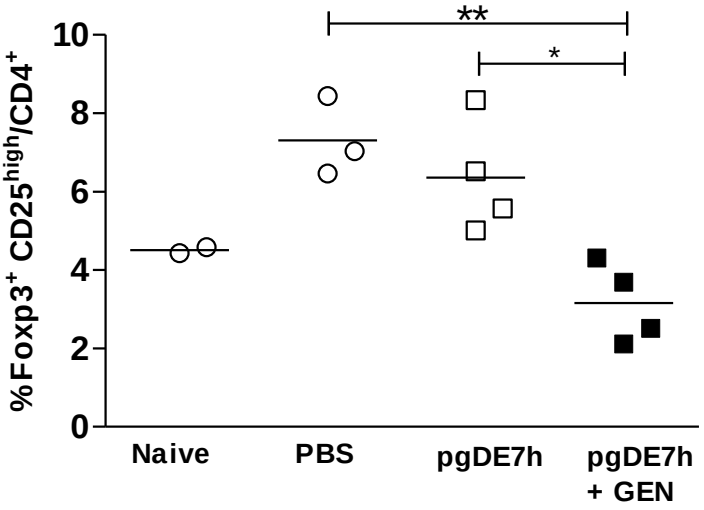

Figura 14 – A imunização com a vacina pgDE7h em combinação com gencitabina controla a expansão de células T regulatórias no baço
Cinco dias após o desafio, os animais foram submetidos à imunização com duas doses de 50 µg de pgDE7h (i.m.) associados, ou não, ao tratamento com 80 mg/kg de gencitabina administrada pela via i.p. em um intervalo de 7 dias entre cada dose. Quatorze dias após a segunda dose, células do baço foram coletadas e marcadas com anticorpos anti-CD4, anti-CD25 e marcação intracelular do fator de transcrição FoxP3. As células foram analisadas em citometria de fluxo. Frequência das populações $FoxP3^+$ com alta expressão de CD25, dentro da população de células $CD4^+$. (ANOVA, post test: Bonferroni), (n=2-4). *p< 0.05, ** p<0.01.

4.2.3 Avaliação do espaçamento temporal entre o desafio com células TC-1 e a administração da combinação da vacina pgDE7h com o quimioterápico gencitabina

O estágio clínico avançado de pacientes com câncer é o principal fator que dificulta o sucesso das vacinas antitumorais. Com o objetivo de testar a associação do tratamento quimioterápico e a vacina pgDE7h mais tardiamente após o desafio tumoral, quando uma resposta imunossupressora começa a ser estabelecida e se torna mais difícil controlar o crescimento do tumor, propusemos avaliar se o mesmo regime vacinal estabelecido anteriormente seria capaz de conferir proteção terapêutica em animas com tumores estabelecidos. Para isso, 10 dias após o desafio, os animais foram imunizados com duas doses de 50 µg de pgDE7h pela via i.m. e tratados com duas doses 80 mg/kg de cloridrato de gencitabina pela via i.p. em um intervalo de sete dias entre as doses (Figura 15A). A imunização apenas com o pgDE7h resultou na sobrevivência de apenas 30% dos animais e não impediu o

estabelecimento dos tumores (Figura 15 B e C). Já a combinação da quimioterapia com a vacina pgDE7h foi capaz de promover um aumento significativo da sobrevivência dos animais, bem como induzir regressão tumoral completa em 80% animais (figura 15 B e C).

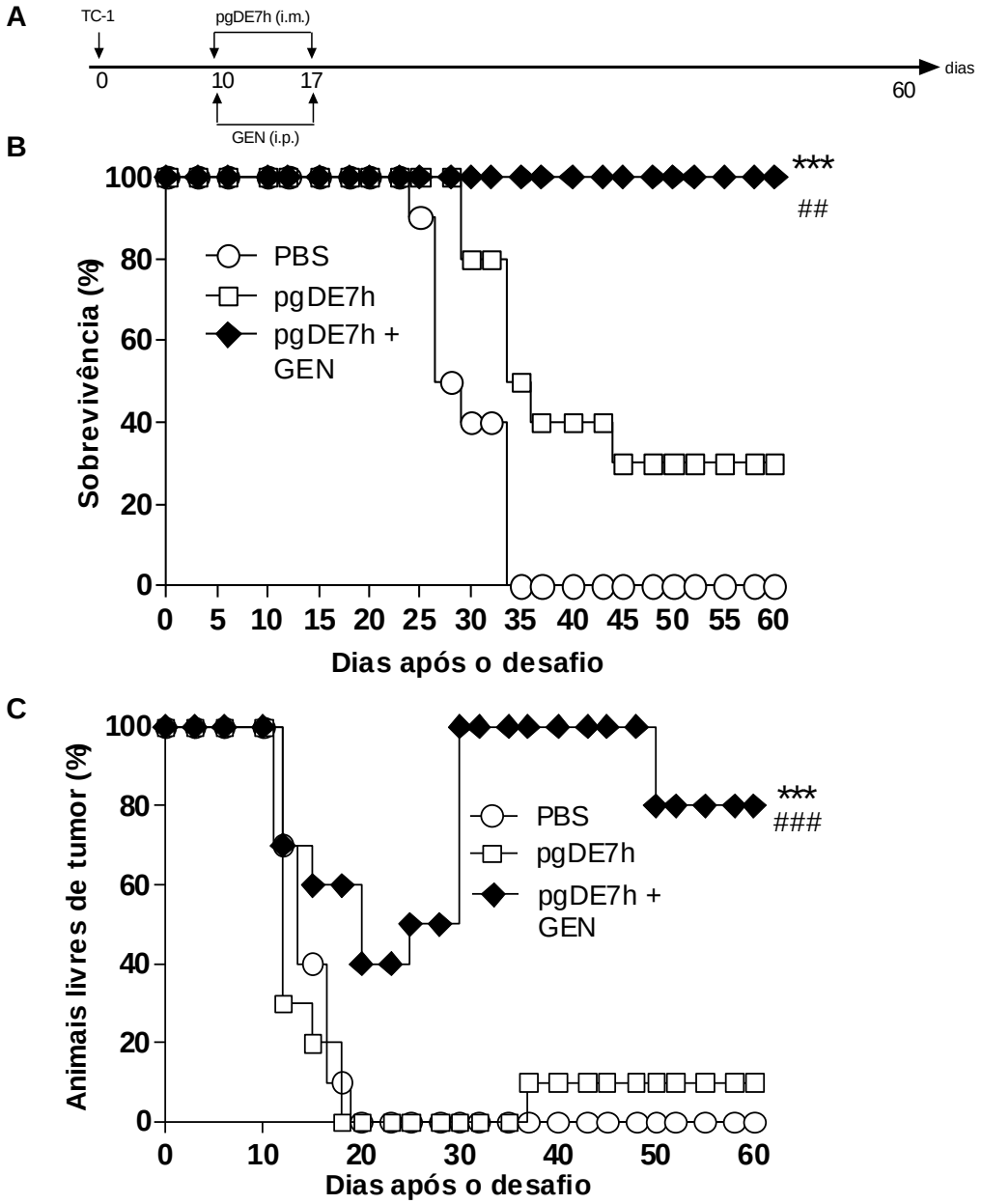

Figura 15 – Ensaio de proteção terapêutica de camundongos imunizados com a vacina pgDE7h combinado ao tratamento com gencitabina (GEN) iniciando o tratamento dez dias após o desafio

Dez dias após o desafio com as células TC-1, os animais foram submetidos à imunização com duas doses de 50 µg de pgDE7h (i.m.) associados, ou não, ao tratamento com duas doses de 80 mg/kg de gencitabina administrada pela (i.p.) em um intervalo de 7 dias entre as doses (A) Esquema de imunização (B) Acompanhamento da sobrevivência dos animais por 60 dias. (C) Porcentagem de animais livres de tumor. (Log-rank – Mantel Cox). (*) *vs* PBS, (#) *vs* pgDE7h 50 µg. Os dados representam dois experimentos independentes, (n=10). (**) $p<0.01$, (***) $p<0.001$.

Com o objetivo de avaliar a combinação quimio-imunoterápica em um regime vacinal ainda mais restritivo, o tratamento foi administrado 14 dias após o implante das células tumorais, quando o tumor se apresentava palpável (1 mm^3) (Figura 16A). Os animais imunizados apenas com duas doses da vacina pgDE7h apresentaram 40% de sobrevivência, mas não foram capazes de impedir o crescimento dos tumores (Figura 16 B e C). Os animais tratados com gencitabina em associação com a vacina pgDE7h foram capazes de aumentar a sobrevivência para 100% e induzir regressão completa dos tumores em 80% dos animais, mantendo a potência imunoterápica observada anteriormente (Figura 16 B e C).

Após 60 dias de acompanhamento, foi possível observar que a coadministração da vacina com a quimioterapia manteve os animais livres de tumores quando a imunoterapia foi iniciada 5, 10 ou 14 dias após o desafio. Como forma de avaliar o potencial terapêutico da formulação em proteger de recidivas, os animais protegidos foram submetidos a um segundo desafio com uma quantidade de células TC-1 dez vezes maior ($7,5 \times 10^5$ células/animal) 60 dias após o primeiro implante de células. Os camundongos foram acompanhados por mais 40 dias, e se mantiveram 100% livres de tumor ao final do período de acompanhamento, demostrando a eficácia da potência imunoterápica para todos os protocolos testados (Figura 17).

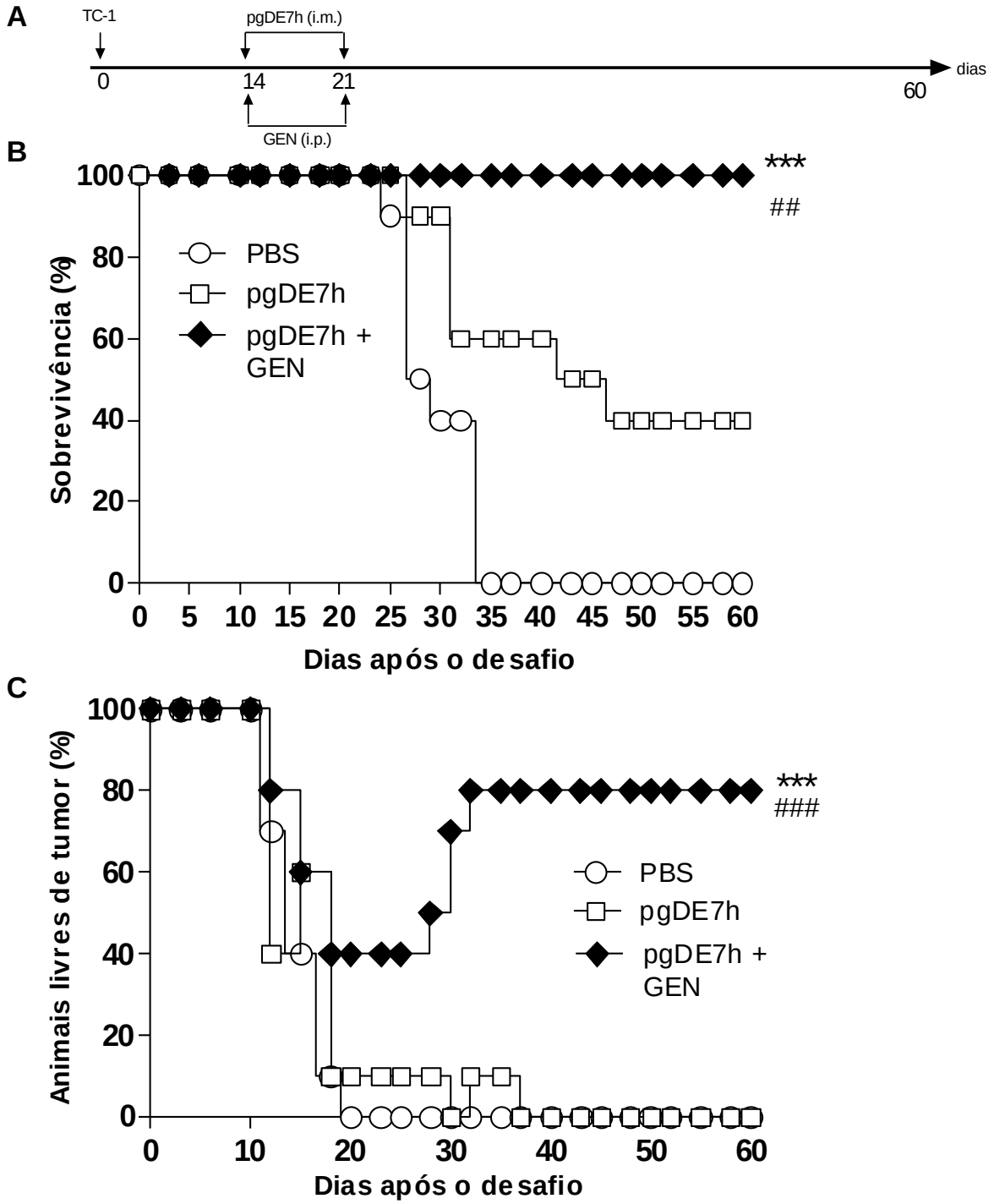

Figura 16 – Ensaio de proteção terapêutica de camundongos imunizados com a vacina pgDE7h combinado ao tratamento com gencitabina (GEN) iniciando o tratamento 14 dias após o desafio

Quatorze dias após o desafio com as células TC-1, os animais foram submetidos à imunização com duas doses de 50 µg de pgDE7h (i.m.) associados, ou não, ao tratamento com duas doses de 80 mg/kg de gencitabina administrada pela (i.p.) em um intervalo de 7 dias entre cada dose (A) Esquema de imunização (B) Acompanhamento da sobrevivência dos animais por 60 dias. (C) Porcentagem de animais livres de tumor. (Log-rank – Mantel Cox). (*) *vs* PBS, (#) *vs* pgDE7h 50 µg. Os dados representam dois experimentos independentes, (n=10). (**) $p<0.01$, (***) $p<0.001$.

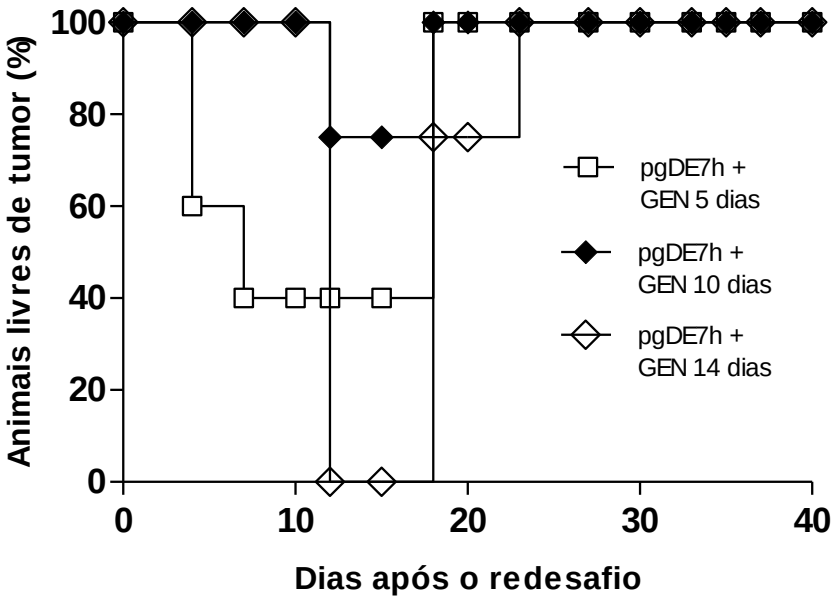

Figura 17 – Efeito antitumoral terapêutico induzido pela imunização com a vacina pgDE7h associados a gencitabina após redesafio com células TC-1
Camundongos C57BL/6 foram desafiados com 7,5 x 10^4 células/animal e imunizados com duas doses de pgDE7h associada a duas doses do tratamento com 80 mg/kg de gencitabina em diferentes intervalos entre o desafio e o início do protocolo de imunização (5, 10 ou 14 dias). Sessenta dias após a primeira inoculação com as células TC-1, os animais receberam um segundo desafio de células de tumorais com uma quantidade de células 10 vezes maior. O gráfico representa a porcentagem de animais livres de tumor, (n=5).

4.3 Aumento da potência vacinal terapêutica por meio de terapias combinadas a partir da associação da vacina pgDE7h ao pIL-10R e ao tratamento com gencitabina

O controle do câncer de colo do útero avançado exige métodos combinados como vacinas e outras modalidades terapêuticas que visam melhorar os efeitos antitumorais e diminuir a toxicidade e a resistência de fármacos quimioterápicos. Tais métodos devem agir em diferentes alvos que atuem não somente no tumor, mas também controlando a imunossupressão desencadeada, permitindo uma melhor eficácia clínica.

Nesse panorama, buscamos estabelecer um protocolo vacinal com maior viabilidade e eficácia clinica. Para isso, buscamos utilizar uma menor quantidade de DNA, por meio da utilização de métodos de entrega que aumentam a imunogenicidade de vacinas de DNA em humanos. Além disso, visamos diminuir as doses da quimioterapia, mas mantendo um protocolo restritivo com o tratamento sendo administrado em animais com tumores já palpáveis. Sendo assim, combinamos os melhores protocolos encontrados com o uso da coadministração dos plasmídeos vacinais pgDE7h e pIL-10R e a associação da vacina pgDE7h com o quimioterápico gencitabina. Baseados nos resultados anteriores, optamos por administrar uma dose única do agente quimioterápico, para obter um resultado sub-ótimo da associação da vacina pgDE7h com a quimioterapia. Nesse último capítulo, apresentamos os dados obtidos com essa proposta, que demonstram resultados promissores para o uso de terapias combinadas que atuem em diferentes alvos terapêuticos.

4.3.1 Caracterização da resposta celular induzida pela imunoterapia combinada

Nossos achados anteriores mostraram que a associação da vacina pgDE7h com o plasmídeo pIL-10R ou com a quimioterapia com gencitabina promove o aumento do número de linfócitos ativados. Então, buscamos avaliar se a combinação da vacinação com a pgDE7h e o plasmídeo pIL-10R em associação com a gencitabina promovia um aumento ainda maior da potência vacinal. Para isso, camundongos desafiados com 7,5 x 10^4 células TC-1/animal, foram imunizados no décimo quarto dia com uma mistura de 5 µg de pgDE7h e 50 µg de pIL-10R utilizando a eletroporação pela via i.m.. Nesse mesmo dia, os animais foram tratados

com 80 mg/kg de gencitabina pela via i.p.. Cinco dias após a 1ª dose, uma segunda imunização com 50 µg de pIL-10R foi aplicada nos animais (Figura 18A). A imunização com a vacina pgDE7h coadministrada com o pIL-10R e gencitabina induziu uma alta frequência de linfócitos T $CD8^+$ produtores de IFN-γ, com diferenças significativas em relação aos animais imunizados com a vacina isoladamente ou associada à gencitabina. Esse resultado mostra que a combinação dos três métodos imunoterapêuticos induz melhor ativação dessas células em comparação à imunização apenas com a vacina de DNA ou à imunização associada com o pIL-10R ou ainda com tratamento quimioterápico isoladamente (Figura 18B).

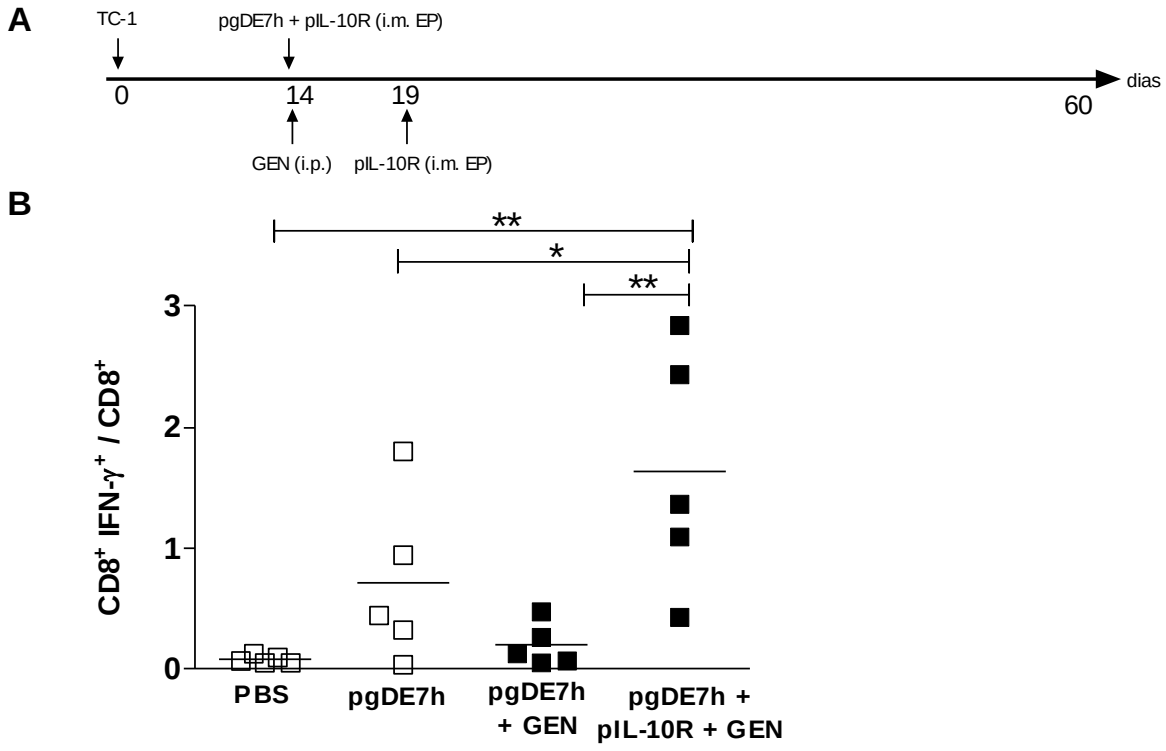

Figura 18 – A coadministração da vacina pgDE7h com o pIL10R associada à gencitabina induz um aumento da ativação de linfócitos T CD8+ E7-específicos
Quatorze dias após o desafio, os animais foram submetidos à imunização com 5 µg de pgDE7h combinado, ou não, com 50 µg de pIL-10R por eletroporação pela via i.m.. Cinco dias após a 1ª dose, foi administrada uma segunda imunização com 50 µg de pIL-10R. Alguns animais receberam 80 mg/kg de gencitabina pela via i.p. juntamente com a primeira dose vacinal. Quatorze dias após a primeira dose, amostras de PBMC foram coletadas e estimuladas com o peptídeo $E7^{(49-57)}$. Porcentagem de células T $CD8^+$ produtoras de IFN-γ. Os valores das células não estimuladas foram inferiores a 0.2%. (ANOVA, post test: Bonferroni), (n=5). (*) $p<0.05$, (**) $p<0.01$.

4.3.2 Caracterização do efeito da imunoterapia combinada no controle de células imunossupressoras

A partir do efeito positivo na ativação de linfócitos T CD8$^+$ E7-específicos, passamos a explorar o efeito dos métodos combinados sob as populações imunossupressoras, seguindo o protocolo acima descrito. Baço de animais submetidos a diferentes protocolos terapêuticos foram analisados quanto à frequência de células mielóides supressora e T regulatórias. Foi possível observar que a frequência das células mielóides supressoras eram menores nos animais tratados com gencitabina e imunizados com a combinação plasmideal comparadas ao grupo não tratado ou imunizado apenas com a vacina pgDE7h. Contudo, não houve diferença estatística quanto à presença de células mielóides supressoras presentes no baço dos animais tratados e imunizados em relação aos animais que receberam somente a vacina pgDE7h ou o grupo tratado com PBS (figura 19A). Além disso, apenas quando os animais foram tratados com os três métodos imunoterapêuticos houve o controle da expansão de células T regulatórias, demonstrando que a imunização apenas com a vacina pgDE7h ou associada a uma dose da quimioterapia, não é suficiente para impedir o aumento da frequência dessa população de células (Figura 19B).

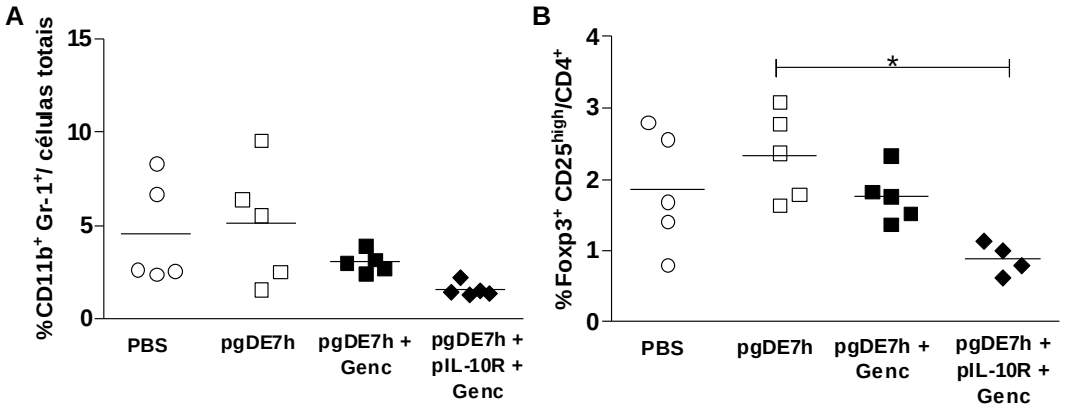

Figura 19 – A coadministração da vacina pgDE7h com o pIL10R associada ao gencitabina controla a expansão de células imunossupressoras
Quatorze dias após o desafio, os animais foram submetidos à imunização com 5µg de pgDE7h combinado, ou não, com 50µg de pIL-10R por eletroporação pela via i.m.. Cinco dias após a 1ª dose, foi administrada uma segunda imunização com 50 µg de pIL-10R. Alguns animais receberam 80 mg/kg de gencitabina pela via i.p. juntamente com a primeira dose vacinal. Quatorze dias após a primeira dose, os esplenócitos foram coletadas marcados para analise quanto à presença de células mielóides supressoras (antiCD11b e anti-Gr-1) e linfócitos T regulatórios (anti-CD4, anti-CD25 e marcação intracelular do fator de transcrição FoxP3). As células foram analisadas em citometria de fluxo e representado no gráfico: (A) Frequência das populações de células MDSC; (B) Frequência da população FoxP3$^+$ com alta expressão de CD25, dentro da população de células CD4$^+$. (ANOVA, post test: Bonferroni), (n=5). (*) $p<0.05$.

4.3.3 Determinação das populações celulares infiltrantes no sitio tumoral

Investigamos também as populações de células infiltrantes no tumor dos animais imunizados e tratados com os métodos combinatórios. Grupos de animais foram eutanasiados no décimo quarto dia após a primeira dose vacinal e tiveram o tumor retirado para analises das células presente no sitio tumoral. No momento do ensaio, a maioria dos animais do grupo tratado com os três métodos imunoterapêuticos, já havia regredido totalmente os tumores. Por isso, analisamos apenas aqueles animais que ainda apresentavam tumor. Inicialmente, buscou-se determinar se havia a presença de linfócitos específicos para a proteína E7 no sitio tumoral. Como esperado, no tumor de animais do grupo PBS, não houve migração de linfócitos T $CD8^+$ E7-específicos para o ambiente tumoral. O tamanho do tumor desses animais no momento do ensaio que eram maiores em comparação com os grupos tratados (dados não mostrados). O grupo imunizado apenas com a pgDE7h foi capaz de induzir uma migração de linfócitos T $CD8^+$ E7-específicos em apenas em alguns animais. Por outro lado, apenas 60% dos animais imunizados com a vacina pgDE7h e tratados com a quimioterapia apresentavam tumores. Entretanto, entre os animais com tumor desse grupo, não houve migração de linfócitos T $CD8^+$ E7-específicos no sitio tumoral. Já a combinação dos três métodos imunoterapêuticos, mesmo nos animais que havia a presença do tumor, foi possível detectar a migração de linfócitos T $CD8^+$ E7-específicos no ambiente tumoral dos animais (Figura 20A).

Adicionalmente, analisamos a presença de populações de células imunossupressoras que pudessem bloquear o efeito da resposta citotóxica no ambiente tumoral. Não foi detectada a presença de células T $CD4^+$ com um perfil regulatório nesses animais (dados não mostrados). Contudo foi possível identificar a um aumento do número de células mielóides supressoras no tumor dos animais do grupo PBS, e na maioria dos animais imunizados apenas com a vacina pgDE7h. Isso mostra que apesar de haver uma migração de linfócitos T $CD8^+$ E7-específicos para o ambiente tumoral (Figura 20A) a vacina sozinha não conseguiu controlar a infiltração de células supressoras no sitio do tumor (Figura 20B). Os animais imunizados com a vacina e tratados com a quimioterapia controlaram parcialmente a infiltração de células mielóides presentes no tumor. Todavia, quando os três métodos são associados, os animais foram capazes de melhor controlar a presença das MDSC no tumor (Figura 20B).

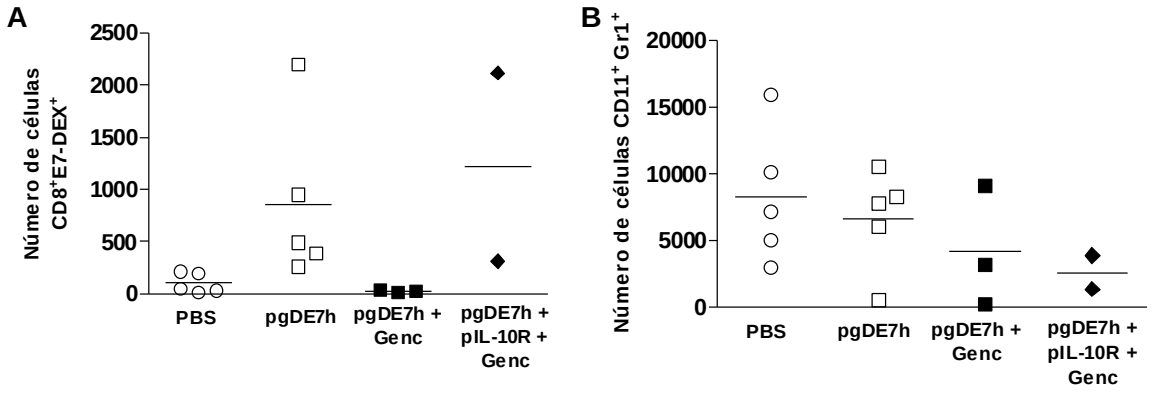

Figura 20 – Avaliação da infiltração de linfócitos T CD8$^+$ E7-específicos e células mielóides supressoras no ambiente tumoral de animais imunizados com a coadministração da vacina pgDE7h e o pIL10R associado à gencitabina
Quatorze dias após o desafio, os animais foram submetidos à imunização com 5 µg de pgDE7h combinado, ou não, com 50 µg de pIL-10R por eletroporação pela via i.m.. Cinco dias após a 1ª dose, foi administrada uma segunda imunização com 50 µg de pIL-10R. Alguns animais receberam 80 mg/kg de gencitabina pela via i.p. juntamente com a primeira dose vacinal. Quatorze dias após a primeira dose, foram coletadas o tumor dos animais, macerados e digeridos com colagengase e marcados para análise quanto à presença de linfócitos T CD8$^+$ E7-específicos, células mielóides supressoras (anti-CD11b e anti-Gr-1). As células foram analisadas em citometria de fluxo e representado no gráfico: (A) Número absoluto de células CD8$^+$ marcadas com dextrâmero de MHC-I contendo o peptídeo CD8-específico da proteína E7 (RAHYNIVTF). (B) Número absoluto de células MDSC; (ANOVA, post test: Bonferroni), (n=5).

4.3.4 Avaliação do efeito antitumoral terapêutico induzido pela imunoterapia combinada

Diante dos resultados promissores encontrados na análise da resposta celular induzida pela abordagem imunoterapêutica combinada, explorou-se então o efeito antitumoral terapêutico promovido pela vacina pgDE7h em associação ao pIL-10R e à gencitabina. Para tanto, seguimos o protocolo estabelecido anteriormente, na qual camundongos desafiados com 7,5 x 10^4 células TC-1/animal, foram imunizados no décimo quarto dia com uma mistura de 5 µg de pgDE7h e 50 µg de pIl-10R seguida de eletroporação pela via i.m.. Em seguida, os animais foram tratados com 80 mg/kg de gencitabina pela via i.p.. Cinco dias após a 1ª dose, uma segunda imunização com 50 µg de pIL-10R foi aplicada nos animais, seguida do mesmo método de administração (Figura 21A). Como esperado, a imunização com a vacina pgDE7h administrada com a eletroporação foi capaz de prologar a sobrevivência de 60% dos animais comparados com o grupo tratados com PBS. Quando a vacina foi administrada em conjunto com uma ou duas abordagens (pIL-10R, gencitabina ou pIL-10R + gencitabina), foi possível aumentar a sobrevivência dos animais para

100% (Figura 21B). Entretanto, apesar de aumentar a sobrevivência dos animais, a imunização apenas com a vacina ou combina com apenas uma estratégia adicional (pIL-10R ou gencitabina) resultou em 40 ou 60% de animais livres de tumores respectivamente, e não foram suficientes para impedir totalmente o crescimento dos tumores. Quando as três terapias foram combinadas, todos os animais foram capazes de regredir totalmente os tumores formados pelas células TC-1, demonstrou-se uma estratégia altamente promissora (Figura 21C).

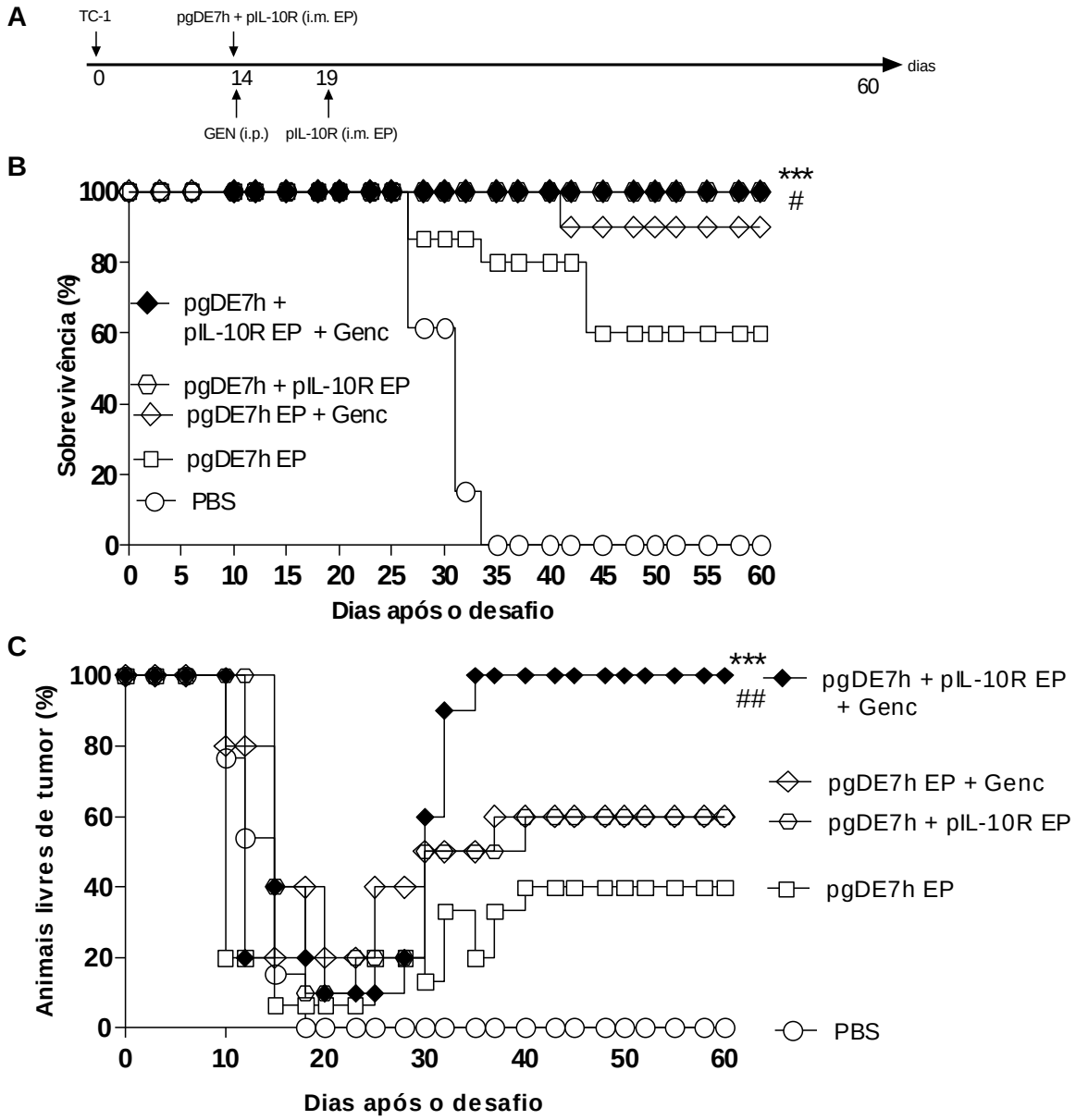

Figura 21 – Ensaio de proteção terapêutica de camundongos imunizados com a coadministração da vacina pgDE7h e o pIL10R associado à gencitabina

Quatorze dias após o desafio, os animais foram submetidos à imunização com 5 µg de pgDE7h associado, ou não, a 50 µg de pIL-10R seguida de eletroporação pela via i.m. ou ao tratamento com 80 mg/kg de gencitabina pela via i.p.. Um grupo recebeu a combinação dos três tratamentos. Cinco dias após a 1ª dose, foi administrada uma segunda imunização com 50 µg de pIl-10R pela via i.m. associada à eletroporação. (A) Esquema de imunização (B) Acompanhamento da sobrevivência dos animais por 60 dias. (C) Porcentagem de animais livres de tumor. (Log-rank – Mantel Cox). (*) *vs* PBS, (#) *vs* pgDE7h 50 µg. Os dados representam dois experimentos independentes, (n=10). (*) p<0,05, (**) p<0.01, (***) p<0.001.

5 DISCUSSÃO

A presente dissertação de mestrado buscou a evolução de uma abordagem terapêutica previamente desenvolvida em nosso laboratório para tratamento de tumores induzidos por HPV-16, atingindo melhorias significativas que visam aumentar sua eficácia clínica. Os dados aqui apresentados apontam métodos capazes de potencializar a vacina terapêutica pgDE7h por meio de terapias voltadas ao controle de mecanismos de imunossupressão. Os resultados incluem observações que vão de um atraso no crescimento tumoral à regressão total de tumores, com clara correlação com o aumento significativo do número de linfócitos T E7-específicos ativados sistêmicos e presentes no sítio tumoral, a partir da associação da pgDE7h com um plasmídeo capaz de sequestrar a citocina IL-10. Implicações semelhantes foram encontradas na conjugação da vacina à quimioterapia com gencitabina, cujo efeito sinérgico dessa associação, gerou resultados mais robustos no que se refere à resposta antitumoral. O controle de populações imunossupressoras sistêmicas aqui alcançado por meio da combinação com a quimioterapia, demonstrou a importância de terapias que bloqueiam essa via para o efeito de tratamentos imunoterapêuticos antitumorais. Como um diferencial, esse trabalho demonstrou a regressão completa de tumores estabelecidos com a utilização do tratamento com gencitabina seguido pela vacina pgDE7h associado ao pIL-10R. O nosso trabalho sugere que estratégias combinatórias com diferentes alvos podem converter o microambiente do tumor em um estado permissivo para o tratamento vacinal terapêutico.

A vacina pgDE7h foi desenvolvida com intuito de aumentar a imunogenicidade da oncoproteína E7 de HPV-16, constitutivamente expressa em tumores induzidos por esse vírus. Os resultados alcançados com uma versão anterior da vacina (DINIZ; FERREIRA, 2011), induziram atividade antitumoral significativa avaliada pelo implante de células TC-1, quando a vacina foi administrada no mesmo dia ou em até três dias após o desafio. Todavia, essa vacina ainda não se mostra capaz de promover total regressão de tumores com o aumento do intervalo entre o desafio e a vacinação. Ensaios clínicos com vacinas antitumorais são frequentemente testados em pacientes em estágio de câncer

avançado, nos quais prevalece uma condição imunossupressora que dificulta o sucesso das terapias (BORYSIEWICZ et al., 1996; PETIT et al., 2014). Esse fator, levou à concepção de uma nova formulação composta pelo plasmídeo pgDE7h associada a adjuvantes vacinais capazes de atingir o ambiente imunossupressor, e consequentemente, evidenciar o efeito antitumoral terapêutico da vacina. Para isso, associamos a vacina ao pIL-10R e ao gencitabina que já foram apontados em outros trabalhos como técnicas promissoras para o controle tumoral de melanoma e câncer de pâncreas, respectivamente (BAUER et al., 2014; MARCHI et al., 2011).

Estratégias terapêuticas que controlam mecanismos supressores vêm sendo avaliadas em modelo animal em combinação com abordagens que induzem resposta citotóxica. Níveis elevados de IL-10 são frequentemente encontrados em pacientes com câncer cervical e altamente expressos *in vitro* em células HeLa e SiHa (AZAR et al., 2004; CHUANG et al., 2012). Alguns estudos revelam que a expressão de IL-10 em amostras de tecidos humanos tende a aumentar durante a progressão do câncer de colo de útero associados ao HPV, sendo considerada um mal prognóstico da doença (AZAR et al., 2004; BERMUDEZ-MORALES et al., 2008; KOBAYASHI et al., 2008).

Citocinas, como a IL-10, podem ser neutralizadas *in vivo* utilizando anticorpos monoclonais, RNA de interferência ou plasmídeos que expressam o seu receptor. A utilização de terapias na forma de DNA é altamente segura, estável, barata e viável para uso em humanos, quando associadas a métodos de entrega como a eletroporação (LEE; DANISHMALIK; SIN, 2015). Além disso, essa abordagem oferece vantagens em relação a administrações repetidas de anticorpos neutralizantes anti-IL-10 que podem apresentar efeitos colaterais prejudiciais como inflamação gastrointestinal crônica (NI et al., 2015). Vários trabalhos já demonstraram a eficácia do bloqueio do receptor de IL-10. O silenciamento gênico de IL-10R em células dendriticas melhorou a função das células na apresentação de antígenos de HPV-16, aumentou a expressão de moléculas co-estimuladoras e resultou no melhor controle do volume tumoral em animais desafiados com células TC-1 (KIM et al., 2011). Além disso, a combinação do silenciamento dos receptores de IL-10 e de TGF-β em células dendríticas elevou significativamente o número de linfócitos T $CD8^+$ E7-específicos com efeitos antitumorais mais acentuados no controle do volume tumoral (AHN et al., 2015). Em concordância com esses

resultados, em nosso trabalho, a captação de IL-10 circulante associado à imunização com a pgDE7h mostrou efeito significativo no controle do crescimento tumoral de camundongos transplantados com células TC-1, mesmo com uma baixa ativação de linfócitos T. Contudo, o aumento do número de doses de pIL-10R não aumentou a sobrevivência dos animais. Isso sugere que outros mediadores possam estar envolvidos na proliferação do tumor.

A utilização clínica de vacinas de DNA requer métodos de entrega adicionais como a eletroporação que contribuir para o aumento do número de células transfectadas, prolonga o tempo de expressão antigênica e possibilita uma potente ativação da resposta imune (GOTHELF; GEHL, 2012). Trabalhos anteriores do nosso grupo mostraram a capacidade da eletroporação em promover o aumento da ativação de células T antígeno-específicas e da resposta contra tumores induzidos por HPV (SALES, et al., trabalho submetido à publicação). De fato, a imunização com a vacina pgDE7h coadministrada com o pIL-10R associada à eletroporação aumentou a magnitude da resposta de células T $CD8^+$ ativadas, o que correlacionou com maiores índices de proteção em relação a vacinação com a pgDE7h sozinha. Esses dados sugerem que a maior potência de ativação dos linfócitos pode estar relacionada com a maior expressão do receptor de IL-10 promovida pela eletroporação. Outros grupos demonstraram que o bloqueio da sinalização IL-10/IL-10R durante a apresentação de antígenos favorece a indução de resposta imune baseada em células T $CD8^+$ mais fortes e o aumento da proteção contra tumores (KIM et al., 2011). No entanto, apesar da combinação plasmidial ter ativação eficiente de células T $CD8^+$ E7-específicas, não necessariamente houve erradicação completa do tumor. Sendo assim, a neutralização de IL-10 *in vivo* contribui para o controle do crescimento tumoral, embora seja necessária a adoção de estratégias adicionais que atuam em mecanismos de evasão do tumor e que potencializam a resposta de células $CD8^+$ para a indução de uma resposta mais robusta contra tumores já estabelecidos.

É relevante destacar que a coadministração do pIL-10R à vacina pgDE7h associada à eletroporação, mesmo administrada 14 dias depois do desafio, aumentou a expressão de IFN-γ/CD107a ou IFN-γ/TNFα simultaneamente por células T $CD8^+$ E7-específicas. A capacidade de induzir resposta de células T $CD8^+$ de caráter polifuncional está relacionada ao controle da progressão do câncer

associado ao HPV em modelos murinos e em pacientes (DE ROSA et al., 2004; KIM et al., 2014; PRECOPIO et al., 2007; RIZZUTO et al., 2009). Ao mesmo tempo, foi sugerido que o desenvolvimento desse tipo de resposta se correlaciona positivamente com a eficácia clínica de vacinas terapêuticas contra lesões cervicais de alto-grau (KIM et al., 2014). De um modo geral, acreditamos que a eficácia do tratamento do câncer, principalmente em estágios mais avançados, requer a atuação em um conjunto de mecanismos imunomoduladores no âmbito de respostas citotóxicas e no controle de respostas desencadeadas pelas células tumorais e o seu microambiente.

A capacidade da combinação dos plasmídeos em promover maior infiltração de células T $CD8^+$ específicas para o sítio tumoral explica a parcial regressão destes tumores observada nesse grupo. Em nossas condições experimentais, a associação do pIL-10R contribuiu positivamente para esse influxo de células, uma vez que resultados similares não foram observados em animais imunizados apenas com a pgDE7h. Evidências como essa foram descritas em outros trabalhos no qual a administração de anti-IL-10R associado a imunização com peptídeo E7 tornou o microambiente tumoral mais acessível para a infiltração de células T $CD8^+$ (CHEN et al., 2016). Por outro lado, outras vias que não envolvem a modulação pela IL-10 podem interferir na função efetora de células T, e levar ao bloqueio da atividade citotóxica no sítio tumoral mesmo quando são eficientemente ativadas sistemicamente. Dessa forma, manipular mecanismos de bloqueio negativo de células T como anti-PD-1/anti-PDL-1, anti-CTLA4, são também alternativas de aumentar a potência de vacinas terapêutica (AHRENDS et al., 2016; DURAISWAMY et al., 2013; MKRTICHYAN et al., 2011). Nesse sentido, a vacina pgDE7h também atua inibindo a supressão de células T por meio da inteiração da gD com o receptor HVEM (COMPAAN et al., 2005).

Como esperado, seguindo o tratamento com pgDE7h+pIL-10R, houve uma progressiva perda de proteção antitumoral total quando a imunização foi iniciada mais tardiamente. O ambiente supressor promovido pelo tumor impede o desenvolvimento de uma resposta imune protetora. Por isso, com aumento do intervalo entre o desafio e a imunização torna-se necessária a incorporação de terapias adicionais que desestabilizem as células neoplásicas e seus mecanismos de evasão. Para aumentar a eficácia de imunoterapias contra tumores, a

quimioterapia é frequentemente incluída nos regimes de tratamento e demonstrou efeitos benéficos em vários estudos clínicos e pré-clínicos (VANNEMAN; DRANOFF, 2012). No presente trabalho, o tratamento apenas com gencitabina não foi suficiente para impedir o desenvolvimento dos tumores formados por células TC-1, mesmo quando administrado precocemente. Nossos resultados estão de acordo com publicações de outros grupos, no qual descreveram que, mesmo após a administração de 240 mg/kg de gencitabina, não houve bloqueio do desenvolvimento dos tumores em animais desafiados com células TC-1 (MIKYŠKOVÁ et al., 2011). Esses dados sustentam a conjectura que a quimioterapia não agiria especificamente sobre as células tumorais, destacando a importância das vacinas terapêuticas nesse contexto.

Resultados clínicos apontam que para o tratamento de câncer de pulmão, os quimioterápicos gencitabina e cisplatina consorciados à imunoterapia promoveu uma maior sobrevida de pacientes livres de progressão tumoral (RUIZ; HUNIS; RAEZ, 2014). Em adenocarcinoma pancreático metastático, os pacientes que receberam o tratamento com gencitabina associados à vacinação baseada em células dendríticas, tiveram uma sobrevida média de 360 dias, um prolongamento substancial em comparação com outros grupos tratados apenas com quimioterapia (KIMURA et al., 2012). Da mesma forma, encontramos em nossos ensaios um efeito impactante da associação da vacina pgDE7h com gencitabina, que apresentou um efeito sinérgico no tratamento de camundongos desafiados com as células TC-1. Corroborando nossos resultados, uma sinergia no tratamento de tumores com a quimioterapia já foi relatada por outros grupos tanto em associação com outros fármacos, quanto em combinação com vacinas terapêuticas (KAN et al., 2015; ZHANG et al., 2015). Todavia, alguns quimioterápicos apresentam efeitos sinérgicos com vacinas terapêuticas por meio de mecanismos distintos daqueles proporcionados pela gencitabina. Como exemplo, a cisplatina pode causar a morte de células neoplásicas e agir diretamente sobre células T $CD8^+$, que sugere um efeito imunoestimulador (BAE et al., 2007). No presente trabalho, a gencitabina não apresentou efeitos sobre a atividade de células T $CD8^+$, o que sugere que o efeito adjuvante do quimioterápico pode estar relacionado ao controle do efeito imunossupressor desencadeado pelo tumor.

Ao longo do trabalho, foi verificado que o tratamento quimio-imunoterápico avaliado exerce um papel no controle da expansão de células imunossupressoras, sobretudo de MDSC. Dados similares são vistos em outros trabalhos que relatam a ação da gencitabina em promover o controle de células mielóides supressoras (DRAGHICIU et al., 2015; MIKYŠKOVÁ et al., 2011). Tem sido sugerido que a gencitabina apresenta um efeito seletivo sobre MDSC, que leva à morte celular por apoptose e necrose *in vivo* e *in vitro,* embora os mecanismos sejam desconhecidos (SUZUKI, 2005). Um estudo do nosso grupo mostrou que o acúmulo de MDSCs está diretamente relacionado com o tamanho do tumor (DINIZ, 2015). Parâmetros investigados nesse trabalho apontam que o tratamento com gencitabina não induziu depleção sistêmica de MDSC, bem como não foi observada diferença na frequência dessas células quando os animais foram tratados com a gencitabina (160 mg/kg) em relação a camundongos não tratados, enquanto portadores de tumor com tamanho similares (dados não mostrados). Entretanto, a determinação de uma ação direta e seletiva de gencitabina sobre MDSC requer estudos adicionais. As MDSC contribuem para o escape imunológico mediado pelo tumor e correlacionam-se negativamente com a sobrevida de pacientes com câncer (DIAZ-MONTERO et al., 2009). Os métodos de controle de MDSC podem ser baseados em prevenção ou diferenciação do amadurecimento das células, bloqueio de expansão e ativação de MDSC, inibição da atividade supressora ou depleção com anticorpos anti-Gr-1 (DRAGHICIU et al., 2015). De fato, a depleção dessas células contribuiu para melhorar o efeito antitumoral das vacinas terapêuticas, mesmo quando o intervalo entre o desafio com células TC-1 e a imunização foi aumentado (DINIZ et al., 2016).

De maneira adicional, a quimioterapia foi capaz de reduzir a proporção de células T regulatórias sistêmicas nos animais. Células T regulatórias desempenham um papel importante na supressão de resposta imune antitumoral desencadeada por vacinas (CURIEL, 2007). Sabe-se que mulheres com câncer cervical apresentam uma polarização de linfócitos T para um perfil regulatório, enquanto mulheres com infecções assintomáticas exibem maiores proporções de linfócitos Th1 (WELTERS et al., 2006). Além disso, estudos de vacinas terapêuticas em modelos animais utilizando as células TC-1 relatam a expansão de linfócitos T regulatórios $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$ e, portanto, terapias de controle dessas células devem ser consideradas (CHUANG et al., 2009; BERRAONDO et al., 2007; VAN DER BURG et

al., 2007). Fármacos quimioterapêuticos afetam as células de crescimento rápido, e, como consequência, causam danos colaterais para as células do sistema imune, como células imunossupressoras que estão em constante proliferação (VANNEMAN; DRANOFF, 2012). Além, da gencitabina, outros quimioterápicos como a ciclofosfamida são diretamente tóxicos para as T regs, e combinados a uma dose baixa de ciclofosfamida com vacinas antitumorais, induzem o controle do tumor em modelos animais para carcinomas induzidos por HPV (PENG et al., 2013). No modelo de implante de células TC-1 no trato genital, a resposta imunossupressora de células T reguladoras e MDSC impediram a ação antitumoral da vacina, o que pode ser revertido com a utilização da cisplatina (BIALKOWSKI et al., 2016). Isso reforça a premissa de que a quimioterapia pode agir como agente imunomossupressor e aumentar substancialmente a atividade de imunoterapia, quando os dois são administrados em combinação.

Nesse estudo, a vacina pgDE7h associada à gencitabina foi capaz de induzir o controle de recorrência tumoral. Tumores recorrentes e metastáticos após quimioterapia são comumente detectados em pacientes com câncer. Portanto, uma modalidade de tratamento de câncer ideal não só deve causar erradicação do tumor, mas também imunidade antitumoral sistêmica duradoura, como encontrado para vacinas de subunidades da E7 conjugada a cisplatina em modelo animal (BAE et al., 2007). Esses resultados indicam que a quimioterapia em combinação com vacinas terapêuticas pode mediar a prevenção de recorrência tumoral através da indução de imunidade antitumoral de longo prazo.

Outro fator que dificulta o sucesso clinico no tratamento de tumores é o aparecimento de resistência a quimioterapia após doses repetidas. Além disso, as células tumorais podem diminuir a expressão de moléculas de MHC de classe I para evitar a detecção a fim de resistir mecanismos citotóxicos mediados por imunoterapias (MARINCOLA et al., 2000). A combinação de vacinas com diferentes alvos terapêuticos pode desestabilizar estes mecanismos de escape e favorecer a destruição do tumor mediada por células T citotóxicas. Para viabilizar a obtenção de melhores resultados em futuros ensaios clínicos, estabelecemos um protocolo com estratégias combinatórias com efeito em tumores estabelecidos e que utiliza apenas uma dose da quimioterapia. A associação dos plasmídeos (pIL-10R + pgDE7h) entregues via eletroporação e combinado ao tratamento com gencitabina conferiu

100% de proteção terapêutica e revela uma alternativa altamente promissora no tratamento antitumoral comparado com qualquer outro regime vacinal avaliado nesse trabalho. Ensaios em modelos animais reforçam o avanço no tratamento de tumores grandes com o uso múltiplo de terapias (MANSILLA et al., 2012; SONG et al., 2011a) e, portanto, o uso de estratégias combinatórias como regimes de prime-boost, agentes imunomoduladores ou outras modalidades terapêuticas, será, provavelmente, a abordagem ideal para a vacinação contra o câncer.

Em conjunto, os dados aqui abordados, representam uma potente e clinicamente traduzível abordagem terapêutica, com base na combinação de múltiplas estratégias capazes de reduzir os mecanismos imunológicos de escape tumoral e aumentar respostas citotóxicas específicas para antígenos tumorais. Por fim, representa uma proposta inédita para o controle de malignidades associadas ao HPV em comparação com qualquer tratamento já encontrado na literatura.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho nos permitem concluir que:

- A associação do plasmídeo pIL-10R à vacina pgDE7h, administrado pela via intramuscular convencional é capaz de controlar o crescimento de tumores que expressam os antígenos do HPV-16, mas não é suficiente para impedir o aparecimento do tumor em estágios mais avançados;
- O pIL-10R coadministrado com a pgDE7h e entregues pelo método da eletroporação aumenta consideravelmente o potencial da vacina pgDE7h, quando a imunização acontece em estágios mais precoce do desenvolvimento tumoral;
- A vacina pgDE7h consorciada ao pIL-10R seguido de eletroporação induz uma robusta resposta de células $TCD8^+$ E7-especificas, polifuncionais, com capacidade de migração para o sítio tumoral, e confere uma regressão tumoral parcial em tumores estabelecidos.
- A associação da quimioterapia com a vacina pgDE7h representa uma alternativa altamente promissora, e atua sinergicamente contra tumores induzidos por HPV tanto no tratamento mais precoce quanto na terapia de tumores estabelecidos;
- A gencitabina tem ação sobre o crescimento do tumor, e consequentemente sob o controle da expansão de células imunossupressoras, o que está relacionado a um efeito potencializado da ação antitumoral promovida pela vacina pgDE7h;
- A quimio-imunoterapia promove uma imunidade de longa duração que protege os animais de recidivas tumorais;
- A combinação dos diferentes métodos foi a melhor estratégia estudada nesse trabalho, capaz de reverter tumores estabelecidos e representa uma alternativa viável no controle de tumores induzidos por HPV-16;
- O nosso trabalho evidencia que a associação de abordagens terapêuticas com diferentes alvos pode converter o microambiente do tumor em um estado permissivo para o tratamento vacinal terapêutico.

REFERÊNCIAS*

AHN, Y. H.; HONG, S. O.; KIM, J. H.; NOH, K. H.; SONG, K. H.; LEE, Y. H.; JEON, J. H.; KIM, D. W.; SEO, J. H.; KIM, T. W. The siRNA cocktail targeting interleukin 10 receptor and transforming growth factor-?? receptor on dendritic cells potentiates tumour antigen-specific CD8+ T cell immunity. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 181, n. 1, p. 164–178, 2015.

AHRENDS, T.; BABA A, N.; XIAO, Y.; YAGITA, H.; VAN EENENNAAM, H.; BORST, J. CD27 Agonism Plus PD-1 Blockade Recapitulates CD4+ T-cell Help in Therapeutic Anticancer Vaccination. **Cancer Research**, v. 76, n. 10, p. 2921–2931, 2016. Disponível em: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-15-3130>.

ALP AVCI, G. Genomic organization and proteins of human papillomavirus. **Mikrobiyoloji bülteni,** v. 46, n. 3, p. 507–515, jul. 2012. Disponível em: <http://europepmc.org/abstract/med/22951665>. Acesso em: 4 jun. 2016.

ALVAREZ, R. D.; HUH, W. K.; BAE, S.; LAMB, L. S.; CONNER, M. G.; BOYER, J.; WANG, C.; HUNG, C.-F.; SAUTER, E.; PARADIS, M.; ADAMS, E. A.; HESTER, S.; JACKSON, B. E.; WU, T. C.; TRIMBLE, C. L. A pilot study of pNGVL4a-CRT/E7(detox) for the treatment of patients with HPV16+ cervical intraepithelial neoplasia 2/3 (CIN2/3). **Gynecologic oncology**, v. 140, n. 2, p. 245–252, fev. 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26616223>. Acesso em: 4 jun. 2016.

AZAR, K. K.; TANI, M.; YASUDA, H.; SAKAI, A.; INOUE, M.; SASAGAWA, T. Increased secretion patterns of interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha in cervical squamous intraepithelial lesions. **Human Pathology**, v. 35, n. 11, p. 1376–1384, nov. 2004. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0046817704004678>.

BAE, S. H.; PARK, Y.-J.; PARK, J.-B.; CHOI, Y. S.; KIM, M. S.; SIN, J.-I. Therapeutic Synergy of Human Papillomavirus E7 Subunit Vaccines plus Cisplatin in an Animal Tumor Model: Causal Involvement of Increased Sensitivity of Cisplatin-Treated Tumors to CTL-Mediated Killing in Therapeutic Synergy. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 1, p. 341–349, 1 jan. 2007. Disponível em: <http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-06-1838>.

BASER, E.; OZGU, E.; ERKILINC, S.; TOGRUL, C.; CAGLAR, M.; GUNGOR, T. Risk factors for human papillomavirus persistence among women undergoing cold-knife conization for treatment of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. International **Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 125, n. 3, p. 275–278, jun. 2014. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020729214001192>.

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

BAUER, C.; STERZIK, A.; BAUERNFEIND, F.; DUEWELL, P.; CONRAD, C.; KIEFL, R.; ENDRES, S.; EIGLER, A.; SCHNURR, M.; DAUER, M. Concomitant gemcitabine therapy negatively affects DC vaccine-induced CD8+ T-cell and B-cell responses but improves clinical efficacy in a murine pancreatic carcinoma model. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 63, n. 4, p. 321–333, 2014.

BERMUDEZ-MORALES, V. H.; GUTIERREZ, L. X.; ALCOCER-GONZALEZ, J. M.; BURGUETE, A.; MADRID-MARINA, V. Correlation between IL-10 gene expression and HPV infection in cervical cancer: a mechanism for immune response escape. **Cancer investigation**, v. 26, n. 10, p. 1037–1043, dez. 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18798072>. Acesso em: 8 ago. 2016.

BERRAONDO, P.; NOUZÉ, C.; PRÉVILLE, X.; LADANT, D.; LECLERC, C. Eradication of large tumors in mice by a tritherapy targeting the innate, adaptive, and regulatory components of the immune system. **Cancer Research**, v. 67, n. 18, p. 8847–8855, 2007.

BIALKOWSKI, L.; VAN WEIJNEN, A.; VAN DER JEUGHT, K.; RENMANS, D.; DASZKIEWICZ, L.; HEIRMAN, C.; STANGÉ, G.; BRECKPOT, K.; AERTS, J. L.; THIELEMANS, K. Intralymphatic mRNA vaccine induces CD8 T-cell responses that inhibit the growth of mucosally located tumours. **Scientific reports**, v. 6, n. November 2015, p. 22509, 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26931556>.

BORYSIEWICZ, L. K.; FIANDER, A.; NIMAKO, M.; MAN, S.; WILKINSON, G. W.; WESTMORELAND, D.; EVANS, A. S.; ADAMS, M.; STACEY, S. N.; BOURSNELL, M. E.; RUTHERFORD, E.; HICKLING, J. K.; INGLIS, S. C. A recombinant vaccinia virus encoding human papillomavirus types 16 and 18, E6 and E7 proteins as immunotherapy for cervical cancer. **Lancet** (London, England), v. 347, n. 9014, p. 1523–1527, 1 jun. 1996. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8684105>.

BRAUN, D. A.; FRIBOURG, M.; SEALFON, S. C. Cytokine Response Is Determined by Duration of Receptor and Signal Transducers and Activators of Transcription 3 (STAT3) Activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 5, p. 2986–2993, 1 fev. 2013. Disponível em: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M112.386573>.

CETINA, L.; GONZALEZ-ENCISO, A.; CANTU, D.; CORONEL, J.; PEREZ-MONTIEL, D.; HINOJOSA, J.; SERRANO, A.; RIVERA, L.; POITEVIN, A.; MOTA, A.; TREJO, E.; MONTALVO, G.; MUNOZ, D.; ROBLES-FLORES, J.; DE LA GARZA, J.; CHANONA, J.; JIMENEZ-LIMA, R.; WEGMAN, T.; DUENAS-GONZALEZ, A. Brachytherapy versus radical hysterectomy after external beam chemoradiation with gemcitabine plus cisplatin: a randomized, phase III study in IB2-IIB cervical cancer patients. **Annals of Oncology**, v. 24, n. 8, p. 2043–2047, 1 ago. 2013. Disponível em: <http://annonc.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/annonc/mdt142>.

CHEN, J.; NI, G.; LIU, X. S. Papillomavirus virus like particle-based therapeutic vaccine against human papillomavirus infection related diseases: Immunological problems and future directions. **Cellular Immunology**, v. 269, n. 1, p. 5–9, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2011.03.003>.

CHEN, S.; NI, G.; WU, X.; ZHU, B.; LIAO, Z.; WANG, Y.; LIU, X. Blocking IL-10 signalling at the time of immunization renders the tumour more accessible to T cell infiltration in mice. **Cellular Immunology**, v. 300, p. 9–17, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2015.11.002>.

CHEUNG, T. C.; STEINBERG, M. W.; OBORNE, L. M.; MACAULEY, M. G.; FUKUYAMA, S.; SANJO, H.; D'SOUZA, C.; NORRIS, P. S.; PFEFFER, K.; MURPHY, K. M.; KRONENBERG, M.; SPEAR, P. G.; WARE, C. F. Unconventional ligand activation of herpesvirus entry mediator signals cell survival. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 15, p. 6244–6249, 14 abr. 2009. Disponível em: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0902115106>.

CHUANG, C.-M.; HOORY, T.; MONIE, A.; WANG, M.-C. Enhancing Trerapeutic HPV DNA vaccine potency through depletin of CD4+CD25+ T regulatory cells. **Vaccine**, v. 27, n. 5, p. 684–689, 2009.

CHUANG, C.-Y.; SUNG, W.-W.; WANG, L.; LIN, W.-L.; YEH, K.-T.; SU, M.-C.; HSIN, C.-H.; LEE, S.-Y.; WU, B.-C.; CHENG, Y.-W.; LEE, H. Differential Impact of IL-10 Expression on Survival and Relapse between HPV16-Positive and -Negative Oral Squamous Cell Carcinomas. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. e47541, 31 out. 2012. Disponível em: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0047541>.

COMPAAN, D. M.; GONZALEZ, L. C.; TOM, I.; LOYET, K. M.; EATON, D.; HYMOWITZ, S. G. Attenuating lymphocyte activity: the crystal structure of the BTLA-HVEM complex. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 47, p. 39553–39561, 25 nov. 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16169851>. Acesso em: 8 ago. 2016.

CURIEL, T. J. Tregs and rethinking cancer immunotherapy. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 5, p. 1167–1174, 1 maio 2007. Disponível em: <http://www.jci.org/cgi/doi/10.1172/JCI31202>.

DE MARTEL, C.; FERLAY, J.; FRANCESCHI, S.; VIGNAT, J.; BRAY, F.; FORMAN, D.; PLUMMER, M. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. **The Lancet Oncology**, v. 13, n. 6, p. 607–615, jun. 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22575588>. Acesso em: 28 set. 2015.

DE ROSA, S. C.; LU, F. X.; YU, J.; PERFETTO, S. P.; FALLOON, J.; MOSER, S.; EVANS, T. G.; KOUP, R.; MILLER, C. J.; ROEDERER, M. Vaccination in humans generates broad T cell cytokine responses. **Journal of immunology** (Baltimore, Md. : 1950), v. 173, n. 9, p. 5372–5380, 1 nov. 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15494483>. Acesso em: 8 ago. 2016.

DE SANJOSÉ, S.; BRUNI, L.; ALEMANY, L. HPV in genital cancers (at the exception of cervical cancer) and anal cancers. **Presse medicale** (Paris, France : 1983), v. 43, n. 12P2, p. e423–e428, 30 out. 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25455637>. Acesso em: 27 abr. 2016.

DENNIS, K. L.; BLATNER, N. R.; GOUNARI, F.; KHAZAIE, K. Current status of interleukin-10 and regulatory T-cells in cancer. **Current opinion in oncology**, v. 25,

n. 6, p. 637–645, 2013. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4322764&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

DIAZ-MONTERO, C. M.; SALEM, M. L.; NISHIMURA, M. I.; GARRETT-MAYER, E.; COLE, D. J.; MONTERO, A. J. Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy. **Cancer immunology, immunotherapy** : CII, v. 58, n. 1, p. 49–59, jan. 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18446337>. Acesso em: 8 ago. 2016.

DINIZ, M. O.; CARIRI, F. A. M. O.; APS, L. R. M. M.; FERREIRA, L. C. S. Enhanced Therapeutic Effects Conferred by an Experimental DNA Vaccine Targeting Human Papillomavirus-Induced Tumors. **Human Gene Therapy**, v. 24, n. 10, p. 861–870, out. 2013. Disponível em: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/hum.2013.102>.

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, mai. 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21445524>.

DINIZ, M. O.; LASARO, M. O.; ERTL, H. C.; FERREIRA, L. C. S. 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, 1 out. 2010. Disponível em: <http://cvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/CVI.00264-10>.

DINIZ, M. O.; SALES, N. S.; SILVA, J. R.; FERREIRA, L. C. S. Protection against HPV-16-Associated Tumors Requires the Activation of CD8+ Effector Memory T Cells and the Control of Myeloid-Derived Suppressor Cells. **Molecular cancer therapeutics**, v. 15, n. 8, p. 1920–1930, ago. 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27222537>. Acesso em: 8 ago. 2016.

DRAGHICIU, O.; LUBBERS, J.; NIJMAN, H. W.; DAEMEN, T. Myeloid derived suppressor cells-An overview of combat strategies to increase immunotherapy efficacy. **Oncoimmunology**, v. 4, n. 1, p. e954829, 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25949858>.

DURAISWAMY, J.; KALUZA, K. M.; FREEMAN, G. J.; COUKOS, G. Dual blockade of PD-1 and CTLA-4 combined with tumor vaccine effectively restores T-cell rejection function in tumors. **Cancer research**, v. 73, n. 12, p. 3591–3603, 15 jun. 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23633484>. Acesso em: 8 ago. 2016.

EINSTEIN, M. H.; BARON, M.; LEVIN, M. J.; CHATTERJEE, A.; EDWARDS, R. P.; ZEPP, F.; CARLETTI, I.; DESSY, F. J.; TROFA, A. F.; SCHUIND, A.; DUBIN, G.; HPV-010 STUDY GROUP. Comparison of the immunogenicity and safety of Cervarix and Gardasil human papillomavirus (HPV) cervical cancer vaccines in healthy

women aged 18-45 years. **Human vaccines**, v. 5, n. 10, p. 705–719, out. 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19684472>. Acesso em: 8 ago. 2016.

FIORANELLI, M.; ROCCIA, M. G. Twenty-five years of studies and trials for the therapeutic application of IL-10 immunomodulating properties. From high doses administration to low dose medicine new paradigm. **Journal of Integrative Cardiology**, v. 1, n. 1, p2-6, dez. 2014. Disponível em: < http://oatext.com/pdf/JIC-1-102.pdf>.

FULDA, S. Tumor resistance to apoptosis. **International journal of cancer**, v. 124, n. 3, p. 511–515, 1 fev. 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19003982>. Acesso em: 9 ago. 2016.

GARCIA, F.; PETRY, K. U.; MUDERSPACH, L.; GOLD, M. A.; BRALY, P.; CRUM, C. P.; MAGILL, M.; SILVERMAN, M.; URBAN, R. G.; HEDLEY, M. L.; BEACH, K. J. ZYC101a for treatment of high-grade cervical intraepithelial neoplasia: a randomized controlled trial. **Obstetrics and gynecology**, v. 103, n. 2, p. 317–326, fev. 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14754702>.

GARLAND, S. M.; STEBEN, M.; SINGS, H. L.; JAMES, M.; LU, S.; RAILKAR, R.; BARR, E.; HAUPT, R. M.; JOURA, E. A. Natural History of Genital Warts: Analysis of the Placebo Arm of 2 Randomized Phase III Trials of a Quadrivalent Human Papillomavirus (Types 6, 11, 16, and 18) Vaccine. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 199, n. 6, p. 805–814, 15 mar. 2009. Disponível em: <http://jid.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1086/597071>.

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, 1 nov. 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23111168>. Acesso em: 8 ago. 2016.

HAN, K. T.; SIN, J.-I. DNA vaccines targeting human papillomavirus-associated diseases: progresses in animal and clinical studies. **Clinical and Experimental Vaccine Research**, v. 2, n. 2, p. 106, 2013. Disponível em: <http://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.7774/cevr.2013.2.2.106>.

HEUSINKVELD, M.; VAN DER BURG, S. H. Identification and manipulation of tumor associated macrophages in human cancers. **Journal of translational medicine**, v. 9, n. 1, p. 216, 2011. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3286485&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

HUNG, C.-F.; MONIE, A.; ALVAREZ, R. D.; WU, T.-C. DNA vaccines for cervical cancer: from bench to bedside. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 39, n. 6, p. 679–689, dez. 2007. Disponível em: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/emm.2007.74>.

KAN, S.; KOIDO, S.; OKAMOTO, M.; HAYASHI, K.; ITO, M.; KAMATA, Y.; KOMITA, H.; NAGASAKI, E.; HOMMA, S.; EGAWA, S.; TOMA, H.; OHIGASHI, H.; OKUSAKA, T.; NAKAO, A.; HATORI, T.; NATALI, P.; NICOTRA, M.; BIGOTTI, A.; VENTURO, I.;

SLAMON, D.; FENDLY, B.; SLAMON, D.; CLARK, G.; WONG, S.; LEVIN, W.; ULLRICH, A.; MCGUIRE, W.; MOASSER, M.; LEWIS, G.; FIGARI, I.; FENDLY, B.; WONG, W.; CARTER, P.; GORMAN, C.; SLAMON, D.; LEYLAND-JONES, B.; SHAK, S.; FUCHS, H.; PATON, V.; BAJAMONDE, A.; BANG, Y.; CUTSEM, E.; FEYEREISLOVA, A.; CHUNG, H.; SHEN, L.; SAWAKI, A.; SAFRAN, H.; STEINHOFF, M.; MANGRAY, S.; RATHORE, R.; KING, T.; CHAI, L.; DERGHAM, S.; DUGAN, M.; ARLAUSKAS, P.; DU, W.; VAITKEVICIUS, V.; CRISSMAN, J.; YAMANAKA, Y.; FRIESS, H.; KOBRIN, M.; BÜCHLER, M.; KUNZ, J.; BEGER, H.; STOECKLEIN, N.; LUEBKE, A.; ERBERSDOBLER, A.; KNOEFEL, W.; SCHRAUT, W.; VERDE, P.; NOVOTNÝ, J.; PETRUZELKA, L.; VEDRALOVÁ, J.; KLEIBL, Z.; MATOUS, B.; JUDA, L.; SAFRAN, H.; IANNITTI, D.; RAMANATHAN, R.; SCHWARTZ, J.; STEINHOFF, M.; NAUMAN, C.; HARDER, J.; IHORST, G.; HEINEMANN, V.; HOFHEINZ, R.; MOEHLER, M.; BUECHLER, P.; BURRIS, H.; TIBBITTS, J.; HOLDEN, S.; SLIWKOWSKI, M.; PHILLIPS, G. L.; LORUSSO, P.; WEISS, D.; GUARDINO, E.; GIRISH, S.; SLIWKOWSKI, M.; BAROK, M.; TANNER, M.; KÖNINKI, K.; ISOLA, J.; BAROK, M.; TANNER, M.; KÖNINKI, K.; ISOLA, J.; VERMA, S.; MILES, D.; GIANNI, L.; KROP, I.; WELSLAU, M.; BASELGA, J.; SIPOS, B.; MÖSER, S.; KALTHOFF, H.; TÖRÖK, V.; LÖHR, M.; KLÖPPEL, G.; COOMBS, L.; PIGOTT, D.; SWEENEY, E.; PROCTOR, A.; EYDMANN, M.; PARKINSON, C.; POTTER, C.; DAELE, S.; VIJIVER, M.; PAUWELS, C.; MAERTENS, G.; BOEVER, J.; OSAKO, T.; MIYAHARA, M.; UCHINO, S.; INOMATA, M.; KITANO, S.; KOBAYASHI, M.; BURRIS, H.; MOORE, M.; ANDERSEN, J.; GREEN, M.; ROTHENBERG, M.; MODIANO, M.; WANG, S.; LIN, R.; SCOTT, G.; GOGA, A.; BHAUMIK, D.; BERGER, C.; SULLIVAN, C.; BENZ, C.; MARX, C.; YAU, C.; BANWAIT, S.; ZHOU, Y.; SCOTT, G.; HANN, B.; MARX, C.; HELD, J.; GIBSON, B.; BENZ, C.; NAKACHI, K.; FURUSE, J.; ISHII, H.; SUZUKI, E.; YOSHINO, M.; PARSONS, S.; WATSON, S.; STEELE, R.; KUWAHARA, K.; SASAKI, T.; KOBAYASHI, K.; NOMA, B.; SERIKAWA, M.; IIBOSHI, T. Up-regulation of HER2 by gemcitabine enhances the antitumor effect of combined gemcitabine and trastuzumab emtansine treatment on pancreatic ductal adenocarcinoma cells. **BMC Cancer**, v. 15, n. 1, p. 726-735, 16 dez. 2015. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/15/726>. Acesso em: 8 ago. 2016.

KANODIA, S.; DA SILVA, D. M.; KAST, W. M. Recent advances in strategies for immunotherapy of human papillomavirus-induced lesions. **International journal of cancer**, v. 122, n. 2, p. 247–259, 15 jan. 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17973257>. Acesso em: 4 jun. 2016.

KIM, J. H.; KANG, T. H.; NOH, K. H.; BAE, H. C.; AHN, Y. H.; LEE, Y. H.; CHOI, E. Y.; CHUN, K. H.; LEE, S. J.; KIM, T. W. Blocking the immunosuppressive axis with small interfering RNA targeting interleukin (IL)-10 receptor enhances dendritic cell-based vaccine potency. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 165, n. 2, p. 180–189, 2011.

KIM, J. W.; HUNG, C.-F.; JUANG, J.; HE, L.; KIM, T. W.; ARMSTRONG, D. K.; PAI, S. I.; CHEN, P.-J.; LIN, C.-T.; BOYD, D. A.; WU, T.-C. Comparison of HPV DNA vaccines employing intracellular targeting strategies. **Gene Therapy**, v. 11, n. 12, p. 1011–1018, 26 jun. 2004. Disponível em: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/sj.gt.3302252>.

KIM, T. J.; JIN, H.-T.; HUR, S.-Y.; YANG, H. G.; SEO, Y. B.; HONG, S. R.; LEE, C.-

W.; KIM, S.; WOO, J.-W.; PARK, K. S.; HWANG, Y.-Y.; PARK, J.; LEE, I.-H.; LIM, K.-T.; LEE, K.-H.; JEONG, M. S.; SURH, C. D.; SUH, Y. S.; PARK, J. S.; SUNG, Y. C. Clearance of persistent HPV infection and cervical lesion by therapeutic DNA vaccine in CIN3 patients. **Nature communications**, v. 5, n. May, p. 5317, 2014. Disponível em: <http://www.nature.com/ncomms/2014/141030/ncomms6317/full/ncomms6317.html>.

KIMURA, Y.; TSUKADA, J.; TOMODA, T.; TAKAHASHI, H.; IMAI, K.; SHIMAMURA, K.; SUNAMURA, M.; YONEMITSU, Y.; SHIMODAIRA, S.; KOIDO, S.; HOMMA, S.; OKAMOTO, M. Clinical and Immunologic Evaluation of Dendritic Cell–Based Immunotherapy in Combination With Gemcitabine and/or S-1 in Patients With Advanced Pancreatic Carcinoma. **Pancreas**, v. 41, n. 2, p. 195–205, mar. 2012. Disponível em: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00006676-201203000-00004>.

KIRNBAUER, R.; BOOY, F.; CHENG, N.; LOWY, D. R.; SCHILLER, J. T. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 24, p. 12180–12184, 15 dez. 1992. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1334560>. Acesso em: 8 ago. 2016.

KOBAYASHI, A.; WEINBERG, V.; DARRAGH, T.; SMITH-MCCUNE, K. Evolving immunosuppressive microenvironment during human cervical carcinogenesis. **Mucosal immunology**, v. 1, n. 5, p. 412–420, set. 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19079205>. Acesso em: 8 ago. 2016.

KOCJAN, B. J.; BZHALAVA, D.; FORSLUND, O.; DILLNER, J.; POLJAK, M. Molecular methods for identification and characterization of novel papillomaviruses. Clinical **Microbiology and Infection**, v. 21, n. 9, p. 808–816, set. 2015. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X15005261>.

KRUZIKAS, D.; SMITH, J. S.; HARLEY, C.; BUZINEC, P. Costs Associated with Management of Cervical Human Papillomavirus-Related Conditions. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 21, n. 9, p. 1469–1478, 1 set. 2012. Disponível em: <http://cebp.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1055-9965.EPI-11-1019>.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Tipos de câncer. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/> Acesso em: 05 ago. 2016.

LASARO, M. O.; DINIZ, M. O.; REYES-SANDOVAL, A.; ERTL, H. C.; FERREIRA, L. C. S. 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** / Institut Pasteur, v. 7, n. 15, p. 1541–1550, dez. 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16213178>. Acesso em: 4 jun. 2016.

LEE, S.-H.; DANISHMALIK, S. N.; SIN, J.-I. DNA vaccines, electroporation and their

applications in cancer treatment. **Human vaccines & immunotherapeutics**, v. 11, n. 8, p. 1889–1900, jan. 2015. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4635908&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 4 jun. 2016.

LEPIQUE, A. P.; RABACHINI, T.; VILLA, L. L. HPV vaccination: the beginning of the end of cervical cancer? - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 1, p. 1–10, fev. 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19274369>.

LIN, K. Y.; GUARNIERI, F. G.; STAVELEY-O'CARROLL, K. F.; LEVITSKY, H. I.; AUGUST, J. T.; PARDOLL, D. M.; WU, T. C. 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, 1 jan. 1996. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8548765>.

MADRIGAL, M.; JANICEK, M. F.; SEVIN, B.-U.; PERRAS, J.; ESTAPE, R.; PEÑALVER, M.; AVERETTE, H. E. *In Vitro* Antigene Therapy Targeting HPV-16 E6 and E7 in Cervical Carcinoma. **Gynecologic Oncology**, v. 64, n. 1, p. 18–25, jan. 1997. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0090825896945151>.

MAK, I. W.; EVANIEW, N.; GHERT, M. Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment. **American journal of translational research**, v. 6, n. 2, p. 114–118, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24489990>.

MANSILLA, C.; BERRAONDO, P.; DURANTEZ, M.; MART??NEZ, M.; CASARES, N.; ARRIBILLAGA, L.; RUDILLA, F.; FIORAVANTI, J.; LOZANO, T.; VILLANUEVA, L.; SAROBE, P.; BORR??S, F.; LECLERC, C.; PRIETO, J.; LASARTE, J. J. Eradication of large tumors expressing human papillomavirus E7 protein by therapeutic vaccination with E7 fused to the extra domain a from fibronectin. **International Journal of Cancer**, v. 131, n. 3, p. 641–651, 2012.

MARCHI, L. H. L.; PASCHOALIN, T.; TRAVASSOS, L. R.; RODRIGUES, E. G. Gene therapy with interleukin-10 receptor and interleukin-12 induces a protective interferon-γ-dependent response against B16F10-Nex2 melanoma. **Cancer gene therapy**, v. 18, n. 2, p. 110–122, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20885448>.

MARINCOLA, F. M.; JAFFEE, E. M.; HICKLIN, D. J.; FERRONE, S. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. **Advances in immunology**, v. 74, p. 181–273, 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10605607>.

MIKYŠKOVÁ, R.; INDROVÁ, M.; ŠÍMOVÁ, J.; BIEBLOVÁ, J.; BUBENÍK, J.; REINIŠ, M. Genetically modified tumour vaccines producing IL-12 augment chemotherapy of HPV16-associated tumours with gemcitabine. **Oncology Reports**, v, 25, n. 6, p. 1683–1689, 2011.

MINI, E.; NOBILI, S.; CACIAGLI, B.; LANDINI, I.; MAZZEI, T. Cellular pharmacology of gemcitabine. **Annals of oncology : official journal of the European Society for**

Medical Oncology / ESMO, v. 17 Suppl 5, p. v7–12, maio 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16807468>. Acesso em: 9 ago. 2016.

MKRTICHYAN, M.; NAJJAR, Y. G.; RAULFS, E. C.; ABDALLA, M. Y.; SAMARA, R.; ROTEM-YEHUDAR, R.; COOK, L.; KHLEIF, S. N. Anti-PD-1 synergizes with cyclophosphamide to induce potent anti-tumor vaccine effects through novel mechanisms. **European journal of immunology**, v. 41, n. 10, p. 2977–2986, out. 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21710477>. Acesso em: 8 ago. 2016.

MONJAZEB, A. M.; ZAMORA, A. E.; GROSSENBACHER, S. K.; MIRSOIAN, A.; SCKISEL, G. D.; MURPHY, W. J. Immunoediting and antigen loss: overcoming the achilles heel of immunotherapy with antigen non-specific therapies. **Frontiers in oncology**, v. 3, n. July, p. 197, 2013. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3724213&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

MUMM, J. B.; OFT, M. Pegylated IL-10 induces cancer immunity: The surprising role of IL-10 as a potent inducer of IFN-??-mediated CD8+ T cell cytotoxicity Prospects & Overviews. **BioEssays**, v. 35, n. 7, p. 623–631, 2013.

MÜNGER, K.; HOWLEY, P. M. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. **Virus research**, v. 89, n. 2, p. 213–228, nov. 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12445661>.

NI, G.; WANG, T.; WALTON, S.; ZHU, B.; CHEN, S.; WU, X.; WANG, Y.; WEI, M. Q.; LIU, X. Manipulating IL-10 signalling blockade for better immunotherapy. **Cellular Immunology**, v. 293, n. 2, p. 126–129, fev. 2015. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0008874914002020>.

PENG, S.; LYFORD-PIKE, S.; AKPENG, B.; WU, A.; HUNG, C. F.; HANNAMAN, D.; SAUNDERS, J. R.; WU, T. C.; PAI, S. I. Low-dose cyclophosphamide administered as daily or single dose enhances the antitumor effects of a therapeutic HPV vaccine. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 62, n. 1, p. 171–182, 2013.

PETIT, R. G.; MEHTA, A.; JAIN, M.; GUPTA, S.; NAGARKAR, R.; KUMAR, V.; PREMKUMAR, S.; NEVE, R.; JOHN, S.; BASU, P. ADXS11-001 immunotherapy targeting HPV-E7: final results from a Phase II study in Indian women with recurrent cervical cancer. **Journal for ImmunoTherapy of Cancer**, v. 2, n. Suppl 3, p. P92, 2014. Disponível em: <http://jitc.biomedcentral.com/articles/10.1186/2051-1426-2-S3-P92>. Acesso em: 8 ago. 2016.

PIROG, E. C.; LLOVERAS, B.; MOLIJN, A.; TOUS, S.; GUIMERÀ, N.; ALEJO, M.; CLAVERO, O.; KLAUSTERMEIER, J.; JENKINS, D.; QUINT, W. G.; XAVIER BOSCH, F.; ALEMANY, L.; DE SANJOSÉ, S. HPV prevalence and genotypes in different histological subtypes of cervical adenocarcinoma, a worldwide analysis of 760 cases. **Modern Pathology**, v. 27, n. 12, p. 1559–1567, 25 dez. 2014. Disponível em: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/modpathol.2014.55>.

PLETNEV, S.; MAGRACHEVA, E.; WLODAWER, A.; ZDANOV, A. A model of the ternary complex of interleukin-10 with its soluble receptors. **BMC Structural Biology**,

v. 5, n. 1, p. 10, 2005. Disponível em: <http://bmcstructbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6807-5-10>.

POPOVTZER, A.; NORMOLLE, D.; WORDEN, F. P.; PRINCE, M. E.; CHEPEHA, D. B.; WOLF, G. T.; BRADFORD, C. R.; LAWRENCE, T. S.; EISBRUCH, A. Phase I Trial of Radiotherapy Concurrent with Twice-Weekly Gemcitabine for Head and Neck Cancer: Translation From Preclinical Investigations Aiming to Improve the Therapeutic Ratio. **Translational Oncology**, v. 7, n. 4, p. 479–483, ago. 2014. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1936523314000515>.

PRECOPIO, M. L.; BETTS, M. R.; PARRINO, J.; PRICE, D. A.; GOSTICK, E.; AMBROZAK, D. R.; ASHER, T. E.; DOUEK, D. C.; HARARI, A.; PANTALEO, G.; BAILER, R.; GRAHAM, B. S.; ROEDERER, M.; KOUP, R. A. Immunization with vaccinia virus induces polyfunctional and phenotypically distinctive CD8(+) T cell responses. **The Journal of experimental medicine**, v. 204, n. 6, p. 1405–1416, 11 jun. 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17535971>. Acesso em: 8 ago. 2016.

RILEY, J. K.; TAKEDA, K.; AKIRA, S.; SCHREIBER, R. D. Interleukin-10 receptor signaling through the JAK-STAT pathway. Requirement for two distinct receptor-derived signals for anti-inflammatory action. **The Journal of biological chemistry**, v. 274, n. 23, p. 16513–16521, 4 jun. 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10347215>.

RIZZUTO, G. A.; MERGHOUB, T.; HIRSCHHORN-CYMERMAN, D.; LIU, C.; LESOKHIN, A. M.; SAHAWNEH, D.; ZHONG, H.; PANAGEAS, K. S.; PERALES, M.-A.; ALTAN-BONNET, G.; WOLCHOK, J. D.; HOUGHTON, A. N. Self-antigen-specific CD8+ T cell precursor frequency determines the quality of the antitumor immune response. **The Journal of experimental medicine**, v. 206, n. 4, p. 849–866, 13 abr. 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19332877>. Acesso em: 8 ago. 2016.

RUIZ, R.; HUNIS, B.; RAEZ, L. E. Immunotherapeutic agents in non-small-cell lung cancer finally coming to the front lines. **Current oncology reports**, v. 16, n. 9, p. 400, set. 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25030654>. Acesso em: 8 ago. 2016.

SASAGAWA, T.; TAKAGI, H.; MAKINODA, S. Immune responses against human papillomavirus (HPV) infection and evasion of host defense in cervical cancer. **Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy**, v. 18, n. 6, p. 807–815, dez. 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23117294>. Acesso em: 4 jun. 2016.

SATO, T.; TERAI, M.; TAMURA, Y.; ALEXEEV, V.; MASTRANGELO, M. J.; SELVAN, S. R. Interleukin 10 in the tumor microenvironment: A target for anticancer immunotherapy. **Immunologic Research**, v. 51, n. 2-3, p. 170–182, 2011.

SCHIFFMAN, M.; CASTLE, P. E.; JERONIMO, J.; RODRIGUEZ, A. C.; WACHOLDER, S. Human papillomavirus and cervical cancer. **Lancet**, v. 370, n. 9590, p. 890–907, 8 set. 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17826171>. Acesso em: 24 mar. 2015.

SEVKO, A.; UMANSKY, V. Myeloid-derived suppressor cells interact with tumors in terms of myelopoiesis, tumorigenesis and immunosuppression: Thick as thieves. **Journal of Cancer**, v. 4, n. 1, p. 3–11, 2013.

SHURIN, M. R. Dual role of immunomodulation by anticancer chemotherapy. **Nature medicine**, v. 19, n. 1, p. 20–22, 2013. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4045109&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

SMITH, B.; COHN, D. E.; CLEMENTS, A.; TIERNEY, B. J.; STRAUGHN, J. M. Is the progression free survival advantage of concurrent gemcitabine plus cisplatin and radiation followed by adjuvant gemcitabine and cisplatin in patients with advanced cervical cancer worth the additional cost? A cost-effectiveness analysis. Gynecologic **Oncology**, v. 130, n. 3, p. 416–420, set. 2013. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0090825813007579>.

SMYTH, M. J.; NGIOW, S. F.; RIBAS, A.; TENG, M. W. L. Combination cancer immunotherapies tailored to the tumour microenvironment. **Nature reviews. Clinical oncology**, v. 13, n. 3, p. 143–158, mar. 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26598942>. Acesso em: 9 ago. 2016.

SONG, X.; GUO, W.; CUI, J.; QIAN, X.; YI, L.; CHANG, M.; CAI, Q.; ZHAO, Q. A tritherapy combination of a fusion protein vaccine with immune-modulating doses of sequential chemotherapies in an optimized regimen completely eradicates large tumors in mice. International **Journal of Cancer**, v. 128, n. 5, p. 1129–1138, 2011a.

SONG, X.; GUO, W.; CUI, J.; QIAN, X.; YI, L.; CHANG, M.; CAI, Q.; ZHAO, Q. A tritherapy combination of a fusion protein vaccine with immune-modulating doses of sequential chemotherapies in an optimized regimen completely eradicates large tumors in mice. International **Journal of Cancer**, v. 128, n. 5, p. 1129–1138, 1 mar. 2011b. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.25451>.

SUZUKI, E. Gemcitabine Selectively Eliminates Splenic Gr-1+/CD11b+ Myeloid Suppressor Cells in Tumor-Bearing Animals and Enhances Antitumor Immune Activity. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 18, p. 6713–6721, 15 set. 2005. Disponível em: <http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-05-0883>.

SYRJÄNEN, S.; NAUD, P.; SARIAN, L.; DERCHAIN, S.; ROTELI-MARTINS, C.; LONGATTO-FILHO, A.; TATTI, S.; BRANCA, M.; ERŽEN, M.; HAMMES, L. S.; COSTA, S.; SYRJÄNEN, K. Immunosuppressive cytokine Interleukin-10 (IL-10) is up-regulated in high-grade CIN but not associated with high-risk human papillomavirus (HPV) at baseline, outcomes of HR-HPV infections or incident CIN in the LAMS cohort. **Virchows Archiv**, v. 455, n. 6, p. 505–515, 2009.

THE INSTITUTE OF CANCER RESEARCH UK. Cervical Cancer. Disponível em: < http://www.icr.ac.uk/> Acesso em: 05 maio. 2014.

TRIMBLE, C. L.; MORROW, M. P.; KRAYNYAK, K. A.; SHEN, X.; DALLAS, M.; YAN, J.; EDWARDS, L.; PARKER, R. L.; DENNY, L.; GIFFEAR, M.; BROWN, A. S.; MARCOZZI-PIERCE, K.; SHAH, D.; SLAGER, A. M.; SYLVESTER, A. J.; KHAN, A.;

BRODERICK, K. E.; JUBA, R. J.; HERRING, T. A.; BOYER, J.; LEE, J.; SARDESAI, N. Y.; WEINER, D. B.; BAGARAZZI, M. L. Safety, efficacy, and immunogenicity of VGX-3100, a therapeutic synthetic DNA vaccine targeting human papillomavirus 16 and 18 E6 and E7 proteins for cervical intraepithelial neoplasia 2/3: A randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2b trial. **The Lancet**, v. 386, n. 10008, p. 2078–2088, 2015.

TRIMBLE, C. L.; PENG, S.; KOS, F.; GRAVITT, P.; VISCIDI, R.; SUGAR, E.; PARDOLL, D.; WU, T. C. 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, 1 jan. 2009. Disponível em: <http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-08-1725>.

UENO, H.; KIYOSAWA, K.; KANIWA, N. Pharmacogenomics of gemcitabine: can genetic studies lead to tailor-made therapy? **British journal of cancer**, v. 97, n. 2, p. 145–151, 16 jul. 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17595663>. Acesso em: 9 ago. 2016.

UMANSKY, V.; SEVKO, A. Tumor Microenvironment and Myeloid-Derived Suppressor Cells. **Cancer Microenvironment**, v. 6, n. 2, p. 169–177, 16 ago. 2013. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s12307-012-0126-7>.

VAN DER BURG, S. H.; PIERSMA, S. J.; DE JONG, A.; VAN DER HULST, J. M.; KWAPPENBERG, K. M. C.; VAN DEN HENDE, M.; WELTERS, M. J. P.; VAN ROOD, J. J.; FLEUREN, G. J.; MELIEF, C. J. M.; KENTER, G. G.; OFFRINGA, R. Association of cervical cancer with the presence of CD4+ regulatory T cells specific for human papillomavirus antigens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 29, p. 12087–12092, 17 jul. 2007. Disponível em: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0704672104>.

VANDERVEKEN, O. M.; SZTURZ, P.; SPECENIER, P.; MERLANO, M. C.; BENASSO, M.; VAN GESTEL, D.; WOUTERS, K.; VAN LAER, C.; VAN DEN WEYNGAERT, D.; PEETERS, M.; VERMORKEN, J. Gemcitabine-Based Chemoradiation in the Treatment of Locally Advanced Head and Neck Cancer: Systematic Review of Literature and Meta-Analysis. **The Oncologist**, v. 21, n. 1, p. 59–71, 1 jan. 2016. Disponível em: <http://theoncologist.alphamedpress.org/cgi/doi/10.1634/theoncologist.2015-0246>.

VANNEMAN, M.; DRANOFF, G. Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment. **Nature reviews. Cancer**, v. 12, n. 4, p. 237–251, abr. 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22437869>. Acesso em: 8 ago. 2016.

WANG, Y.; LIU, X.-H.; LI, Y.-H.; LI, O. The paradox of IL-10-mediated modulation in cervical cancer. **Biomedical reports**, v. 1, n. 3, p. 347–351, 2013.

WELTERS, M. J. P.; VAN DER LOGT, P.; VAN DEN EEDEN, S. J. F.; KWAPPENBERG, K. M. C.; DRIJFHOUT, J. W.; FLEUREN, G. J.; KENTER, G. G.; MELIEF, C. J. M.; VAN DER BURG, S. H.; OFFRINGA, R. Detection of human papillomavirus type 18 E6 and E7-specific CD4+ T-helper 1 immunity in relation to health versus disease. **International Journal of Cancer**, v. 118, n. 4, p. 950–956, 15

fev. 2006. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.21459>.

WHANG, S. N.; FILIPPOVA, M.; DUERKSEN-HUGHES, P. Recent progress in therapeutic treatments and screening strategies for the prevention and treatment of HPV-associated head and neck cancer. **Viruses**, v. 7, n. 9, p. 5040–5065, 2015.

WHITESIDE, T. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. Oncogene, v. 27, n. 45, p. 5904–5912, 2008. Disponível em: <http://www.nature.com/onc/journal/v27/n45/abs/onc2008271a.html>.

WHITESIDE, T. L. What are regulatory T cells (Treg) regulating in cancer and why? **Seminars in Cancer Biology**, v. 22, n. 4, p. 327–334, ago. 2012. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1044579X12000533>.

WIGLE, J.; COAST, E.; WATSON-JONES, D. Human papillomavirus (HPV) vaccine implementation in low and middle-income countries (LMICs): Health system experiences and prospects. **Vaccine**, v. 31, n. 37, p. 3811–3817, ago. 2013. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X13007858>.

ZHANG, X.-Q.; SUN, X.-E.; LIU, W.-D.; FENG, Y.-G.; ZHANG, H.-M.; SHI, L.-H.; SUN, X.-N.; LI, Y.-Q.; GAO, Z.-X. Synergic effect between 5‑fluorouracil and celecoxib on hypoxic gastric cancer cells. **Molecular medicine reports**, v. 11, n. 2, p. 1160–1166, fev. 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25351347>. Acesso em: 8 ago. 2016.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 5, p. 342–350, 1 maio 2002. Disponível em: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrc798>.