

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 Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Dissertações e Teses da USP (BDTD).

São Paulo
2016

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 quimioimunoterapia 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-específicos, 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 immunosuppression 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 activated E7-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.

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 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 episossomal 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 (KRUIKAS 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?

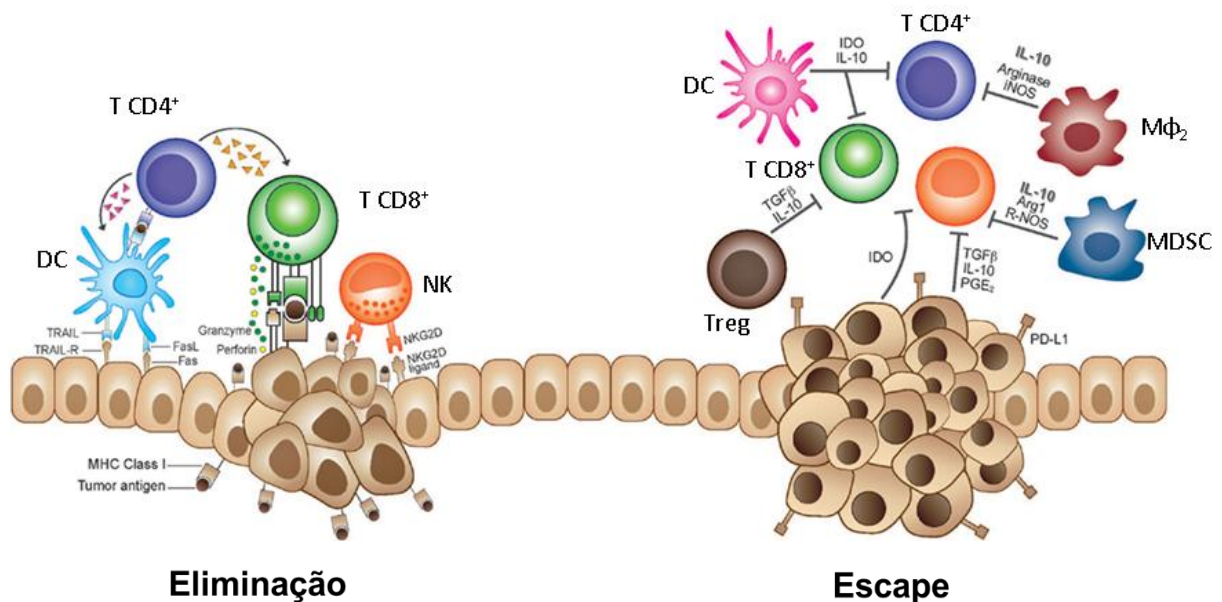
As proteínas E6 e E7, apesar de estarem presentes nas células tumorais, não estimulam naturalmente uma resposta imunológica citotóxica eficiente. Isso acontece por serem expressas em um contexto onde diversos mecanismos de escape imunológico desencadeiam um quadro de tolerância antigênica (SASAGAWA; 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 epítomos, 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-clínica (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 oxigênio (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).

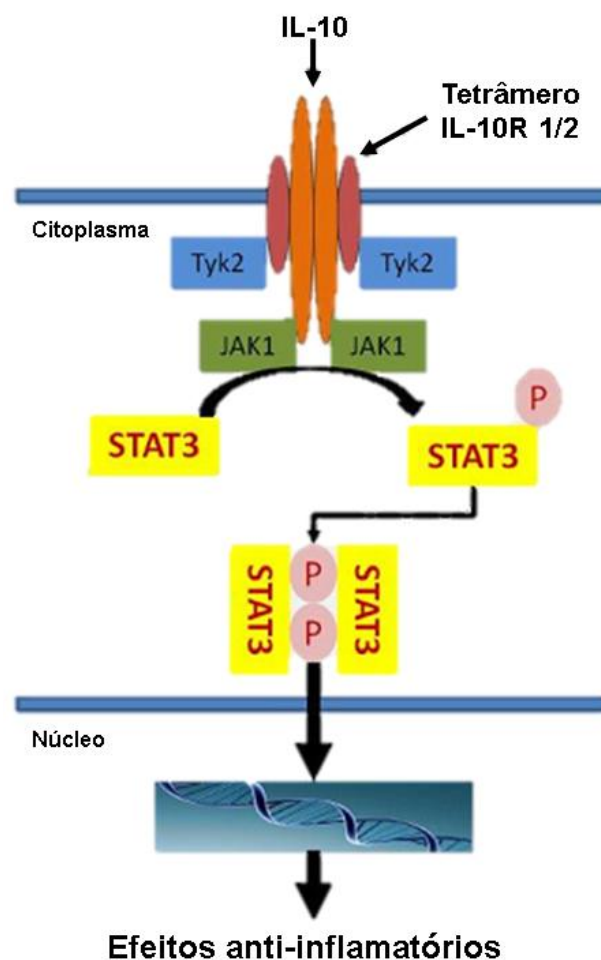


Figura 2 – Representação esquemática do mecanismo de interação da citocina IL-10 com o seu receptor

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 terapêuticamente (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 clínico, 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 sobrevivência 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 quimioterápico 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 enzimática 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.

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-específicas, 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 conseqüentemente 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- β receptor on dendritic cells potentiates tumour antigen-specific CD8⁺ T cell immunity. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 181, n. 1, p. 164–178, 2015.

AHRENDTS, 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.; BOURSNEILL, 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 Therapeutic HPV DNA vaccine potency through depletion 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>>.

DURAIWAMY, 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, p.2-6, 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/doi/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* Antigen 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.; MARTÍNEZ, M.; CASARES, N.; ARRIBILLAGA, L.; RUDILLA, F.; FIORAVANTI, J.; LOZANO, T.; VILLANUEVA, L.; SAROBE, P.; BORRÁS, 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- γ -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.; GUIMERA, N.; ALEJO, M.; CLAVERO, O.; KLAUSTERMEIER, J.; JENKINS, D.; QUINT, W. G.; XAVIER BOSCH, F.; ALEMANY, L.; DE SANJOSE, 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/doi/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.; TERAJ, 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>>.