

Bruna Felício Milazzotto Maldonado Porchia

**Imunoterapia e imunomodulação envolvendo a glicoproteína D (gD)
do HSV-1 em formulações vacinais voltadas para o controle de
tumores associados ao HPV-16**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2015

Bruna Felício Milazzotto Maldonado Porchia

**Imunoterapia e imunomodulação envolvendo a glicoproteína D (gD)
do HSV-1 em formulações vacinais voltadas para o controle de
tumores associados ao HPV-16**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientador: Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira

Versão original

São Paulo
2015

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

reprodução não autorizada pelo autor

Porchia, Bruna Felício Milazzotto Maldonado.

Imunoterapia e imunomodulação envolvendo a glicoproteína D (gD) do HSV-1 em formulações vacinais voltadas para o controle de tumores associados ao HPV-16 / Bruna Felício Milazzotto Maldonado Porchia. -- São Paulo, 2015.

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

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Imunoterapias contra tumores.

Versão do título para o inglês: Immunotherapy and immunomodulation involving glycoprotein D (gD) of HSV-1 in vaccine formulations directed to HPV-16 associated tumors control.

1. Câncer cervical 2. HPV-16 3. Imunoterapia 4. E7 5. gD 6. HSV-1 I. Ferreira, Prof. Dr. Luís Carlos de Souza II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB0144/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Bruna Felfcio Milazzotto Maldonado Porchia.

Título da Tese: Imunoterapia e imunomodulação envolvendo a glicoproteína D (gD) do HSV-1 em formulações vacinais voltadas para o controle de tumores associados ao HPV-16.

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

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

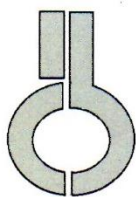
Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

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

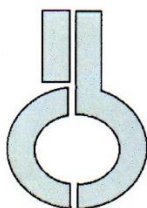
CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **147** nas fls. **111** do livro **02** 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 "*Imunoterapia e imunomodulação envolvendo a glicoproteína D (gD) do HSV-1 em formulações vacinas voltadas para o controle de tumores associados ao HPV-16*" do qual participam o(s) aluno(s) **Bruna Felício Milazzotto Maldona Porchia, Luana Raposo de Melo Moraes, Francisco Andre Marques de Oliveira Cariri**, 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 **30.09.2011, com validade de 3 anos.**

São Paulo, 03 de outubro de 2011.

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

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP



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

Of.CEUA. 071.14

São Paulo, 26 de setembro de 2014.

REF.: Protocolo nº 147/11.

" Imunoterapia e imunomodulação envolvendo a glicoproteína D (gD) do HSV-1 em formulações vacinas voltadas para o controle de tumores associados ao HPV-16"

Prezada Professora,

Informo que a sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epígrafe, **foi prorrogada até 30.09.2017.**

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA/ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

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

Ilmo^(a). Sr^(a).

Prof.^(a). Dr.^(a). Luis Carlos de Sousa Ferreira
Departamento de Microbiologia
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Dedico este trabalho

*Aos meus pais
Luiz Antônio e Juçara,*

*À minha irmã e sobrinha
Sarah e Laila,*

*E ao meu marido
Juliano,*

Pelo grande incentivo.

AGRADECIMENTOS

Os resultados apresentados neste trabalho de tese não são fruto exclusivamente do meu esforço, mas também de diversas colaborações e parcerias. Esta é uma tentativa de agradecer a todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho. Meus sinceros agradecimentos:

Ao professor Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira pela orientação exigente, pelo estímulo, exemplo e paciência. Agradeço pelo espaço concedido em seu laboratório ao longo de todos esses anos, período de muito crescimento profissional, científico e também pessoal. Muito obrigada!

À professora Dra. Rita de Cássia Café Ferreira pelos conselhos profissionais e pessoais e amizade.

À Dra. Maria Elisabete Sbrogio-Almeida pela orientação no manejo dos camundongos e discussões sempre muito produtivas sobre vacinas e imunologia. Obrigada pelo carinho e dedicação por todos deste grupo de pesquisa.

À professora Dra. Daniela Santoro Rosa da UNIFESP, pela colaboração no estudo da resposta imune efetora e pelo espaço cedido em seu laboratório para a execução dos experimentos. Obrigada!

À professora Dra. Silvia Boscardin do Departamento de Parasitologia do ICB, por compartilhar seus conhecimentos a respeito de células dendríticas. Obrigada pelo espaço e reagentes cedido em seu laboratório, fundamentais para a execução de tantos experimentos.

Ao professor Dr. José Alexandre Barbuto do Departamento de Imunologia do ICB, por “emprestar” o seu aluno de doutorado Rodrigo Nálío Ramos para a realização dos experimentos com células dendríticas humanas. Espero que esta parceria renda muitos frutos! Muito obrigada!

Às queridas “HPVetes”: Mariana, Luana, Natiely, Jamile, Ana Carolina, Laís, Carina, Mariângela e Patrícia. Obrigada pela imensa ajuda na elaboração e execução de experimentos, parceria e amizade. É sempre um prazer trabalhar ao lado de vocês. A união faz a força.

Aos amigos do Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas: Wilson, Renata, Juliana, Camila Santos, Mariana Cintra, Deni, Milene, Ewerton, Lennon, Raíza, Mônica, Jaime, Rúbens, Sara, Robert e Rafael pelas colaborações, discussões científicas (ou não!), amizade e momentos de descontração.

Aos demais integrantes e ex-integrantes do LDV com os quais convivi. 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.

Aos funcionários dos biotérios dos Departamentos de Parasitologia e Microbiologia: Daniela, Juliane, Luís, Anderson, Carlos e Maria do Carmo, pela atenção e competência no manejo dos camundongos.

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 Parasitologia Dalva Molnar e da Pós-Graduação Silvia Camargo e a bibliotecária Mônica. Sem vocês esse trabalho não estaria concluído.

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

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

Às queridas Milene, Nádia, Liliane, Patrícia e Renata, minhas amigas de ontem, hoje e sempre.

À minha família, pelo imenso apoio, confiança e amor que dedicam a mim. Obrigada por estarem sempre ao meu lado!

E ao Juliano, meu marido e grande companheiro, pela paciência e parceria durante todo o tempo de execução deste trabalho. Obrigada pela dedicação, companheirismo, amor e por acreditar no meu potencial.

Este trabalho foi realizado sob orientação do Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira, no Centro de Vacinas e Terapia Gênica (CEVAT – GENE) do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas II da Universidade de São Paulo, com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

*A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original.*

Albert Einstein

RESUMO

PORCHIA B. F. M. M. **Imunoterapia e imunomodulação envolvendo a glicoproteína D (gD) do HSV-1 em formulações vacinais voltadas para o controle de tumores associados ao HPV-16.** 2015. 135 f. Tese (Doutorado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O câncer cervical é considerado um grande problema de saúde pública e um dos maiores causadores de mortes relacionadas a tumores em mulheres. Praticamente todos os casos de câncer cervical, assim como uma proporção crescente de tumores na região anal e cabeça/pescoço, estão associados à infecção pelo vírus do papiloma humano (HPV), sendo o HPV-16 e 18 os genótipos mais comumente relacionados a esses tumores. Apesar da alta eficácia na prevenção da infecção pelo HPV, as vacinas profiláticas não beneficiam mulheres já infectadas com o vírus ou que já apresentam lesões precursoras ou câncer. Desta forma, a busca de novas abordagens imunoterapêuticas para o controle de tumores induzidos pelo HPV ainda é uma prioridade. O principal objetivo desta tese foi aumentar a eficácia antitumoral terapêutica conferida pela proteína gDE7, obtida após fusão genética da oncoproteína E7 do HPV-16 com a proteína gD do envelope do HSV-1, por meio da associação de adjuvantes vacinais em formulações testadas em condições experimentais com uma linhagem celular tumoral (TC-1). A proteína gDE7 foi produzida e purificada a partir de uma linhagem laboratorial recombinante de *Escherichia coli* e, em seguida, testada em associação a diferentes adjuvantes. A formulação vacinal baseada na proteína gDE7 coadministrada ao adjuvante poly(I:C) conferiu proteção antitumoral completa aos camundongos previamente desafiados com células TC-1 e foi mantida mesmo após aumento do intervalo entre o desafio e a primeira dose de imunização. A formulação vacinal composta pela proteína gDE7 coadministrada ao poly(I:C) induziu resposta de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos polifuncionais, com forte atividade citotóxica e de fenótipo de memória efetora/efetor. Além disto, a formulação vacinal promoveu o controle indireto da expansão de células supressoras do sistema imune induzidas pelo crescimento do tumor. Por outro lado, a administração do adjuvante poly(I:C) não apresentou qualquer efeito colateral deletério nos camundongos imunizados. Por fim, foi demonstrado que a proteína gDE7 atua de forma específica a subpopulação de células dendríticas especializada na apresentação cruzada de antígenos para linfócitos T CD8⁺, tanto em camundongos como em seres humanos. Portanto, os resultados indicaram que o efeito antitumoral conferido pela vacina está relacionado tanto à ativação de respostas imunológicas capazes de reconhecer e destruir células tumorais como, concomitantemente, controlar as respostas imunossupressoras desencadeadas pelo crescimento do tumor. Esses resultados abrem perspectivas para o emprego da proteína gD como plataforma vacinal para o controle de tumores induzidos pelo HPV-16.

Palavras-chave: Cancer cervical. HPV-16. Imunoterapia. E7. gD. HSV-1.

ABSTRACT

PORCHIA B. F. M. M. **Immunotherapy and immunomodulation involving glycoprotein D (gD) of HSV-1 in vaccine formulations directed to HPV-16-associated tumors control.** 2015. 135 p. Ph. D. thesis (Host-Pathogen Relationship Biology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Cervical cancer is considered a major public health problem and one of the leading causes of cancer death in women. Virtually, all cases of cervical cancer, as well as a growing share of anal and head/neck tumors, are associated with human papillomavirus (HPV) infection, mainly by HPV-16 and 18, the two most commonly genotypes related to tumors. Despite the effectiveness of prophylactic vaccines in preventing HPV infections, such vaccines do not benefit those already infected or bearing precursor lesions or cancer. Thus, the search for new immunotherapeutic approaches that control HPV-induced tumors is still a priority. The main goal of this thesis was the improvement of a therapeutic antitumor vaccine based on gDE7 recombinant protein, generated after fusion of the HPV-16 E7 oncoprotein with the gD type 1 HSV envelope protein, in formulations admixed with adjuvants under experimental conditions with a tumor cell line (TC-1). The gDE7 protein was expressed and purified from a recombinant *Escherichia coli* laboratory strain, and then tested in combination with different vaccine adjuvants. The gDE7 protein admixed with poly(I:C) conferred complete therapeutic antitumor protection to mice previously challenged with TC-1 cells and the effect was maintained even after a prolonged interval between tumor implantation and the first immunization dose. The vaccine formulation comprised by gDE7 admixed with poly(I:C) induced polyfunctional E7-specific CD8⁺ T cells with strong cytotoxic activity and effector/effector memory phenotype. In addition, the vaccine formulation had a negative impact on the expansion of immune suppressor cells induced by the tumor growth. On the other hand, poly(I:C) administration did not show any deleterious side effects in immunized mice. Finally, it was also demonstrated that the gDE7 protein activated a specialized dendritic cell subset involved in specific antigen cross-presentation to CD8⁺ T cells, both in mice and humans. Thus, the results indicated that the antitumor effects conferred by the vaccine is related both to the activation of immune responses capable to recognize and destroy specifically tumor cells and to, concomitantly, control of immune suppressor responses deployed by the tumor growth. These results open perspectives for the use of the gD protein use as a vaccine platform for the control of HPV-16-induced tumors.

Keywords: Cervical cancer. HPV-16. Immunotherapy. E7. gD. HSV-1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Regulação do sistema imune mediada pelo receptor HVEM.....	29
Figura 2. Regime vacinal utilizado na maioria dos ensaios de imunização.....	36
Figura 3. Obtenção da proteína de fusão gDE7 a partir do extrato insolúvel de <i>E. coli</i>	47
Figura 4. Obtenção da proteína gD a partir do extrato insolúvel de <i>E. coli</i>	48
Figura 5. Obtenção da proteína E7 a partir do extrato solúvel de <i>E. coli</i>	49
Figura 6. Efeito antitumoral terapêutico promovido pela coadministração da proteína gDE7 a diferentes adjuvantes vacinais em camundongos desafiados com as células TC-1	51
Figura 7. Resposta humoral sistêmica E7-específica desencadeada pela imunização com as proteínas gDE7 e E7 coadministradas ou não ao poly(I:C).....	54
Figura 8. A imunização com a proteína gDE7 coadministrada ao poly(I:C) confere 100% de proteção antitumoral terapêutica e ativa linfócitos T CD8 ⁺ E7-específicos em camundongos desafiados com células TC-1	56
Figura 9. Duas doses da proteína gDE7 coadministrada ao poly(I:C) confere 100% de proteção antitumoral terapêutica e ativa linfócitos T CD8 ⁺ E7-específicos em camundongos desafiados com células TC-1.....	57
Figura 10. Duas doses da proteína gDE7 coadministrada ao poly(I:C) conferem proteção antitumoral terapêutica completa mesmo com o aumento do intervalo entre o desafio e a primeira dose.....	59
Figura 11. A imunização com a proteína gDE7 coadministrada ao poly(I:C) induz resposta de linfócitos T CD8 ⁺ E7-específicos com potencial efector.....	61
Figura 12. A imunização em esquema de <i>prime-boost</i> homólogo com a proteína gDE7 coadministrada ao poly(I:C) induz maior ativação de linfócitos T CD8 ⁺ E7-específicos citotóxicos.....	62
Figura 13. A imunização com a proteína gDE7 coadministrada ao poly(I:C) ativa maior proporção de linfócitos T CD8 ⁺ E7-específicos polifuncionais.....	66
Figura 14. A imunização com a proteína gDE7 coadministrada ao poly(I:C) induz a ativação de linfócitos T CD8 ⁺ de memória efectora / efetores.....	68
Figura 15. A proteção antitumoral terapêutica induzida pela imunização com a proteína gDE7 coadministrada ao poly(I:C) é independente de linfócitos T CD4 ⁺ <i>helper</i> e dependente de linfócitos T CD8 ⁺	72

Figura 16. A imunização com a proteína gDE7 coadministrada ao poly(I:C) induz infiltração significativa de linfócitos T CD8 ⁺ E7-específicos para o microambiente tumoral.....	74
Figura 17. Efeito das imunizações em linfócitos T regulatórios sistêmicos em camundongos desafiados com as células TC-1.....	77
Figura 18. Efeito das imunizações em MDSCs sistêmicas em camundongos desafiados com as células TC-1.....	79
Figura 19. A coadministração da proteína gDE7 ao poly(I:C) confere proteção antitumoral terapêutica completa e ativação de linfócitos T CD8 ⁺ E7 específicos em camundongos TLR4 KO desafiados com células TC-1.....	81
Figura 20. Análise de parâmetros de segurança vacinal em camundongos imunizados com o adjuvante poly(I:C).....	84
Figura 21. A proteína gDE7 liga e ativa com maior eficiência a subpopulação CD11c ⁺ CD8α ⁺ de células dendríticas em relação a proteína E7.....	87
Figura 22. A proteína gDE7 liga com maior eficiência a subpopulação CD11c ⁺ CD8α ⁺ de DCs em relação a proteína E7.....	89
Figura 23. A Polimixina B inibe a ativação induzida pelo LPS em DCs de camundongos	90
Figura 24. A subpopulação BDCA3 ⁺ de células dendríticas sanguíneas humanas são ativadas mais eficientemente após a incubação com as proteínas gD e gDE7.....	93
Figura 25. A Polimixina B inibe a ativação induzida pelo LPS em DCs derivadas de monócitos e sanguíneas humanas <i>in vitro</i>	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Quantificação de LPS presente nas proteínas gD, gDE7 e E7 utilizadas nos ensaios <i>in vitro</i> com células dendríticas de camundongos e humanas.....	44
Tabela 2. Avaliação de alteração de parâmetros hematológicos em camundongos imunizados	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – Análise de variância

APC(s) – *Antigen presenting cell(s)* (célula(s) apresentadora(s) de antígeno)

APC - alofococianina

BSA – *Bovine serum albumin* (Albumina de soro bovino)

BTLA – *B and T lymphocyte attenuator* (Atenuador de linfócitos T e B)

CD – *Cluster of differentiation* (Grupo de diferenciação)

CFSE – Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester

CpG – Sequência de nucleotídeos que contem dinucleotídeos CG não metilados

CRD – *Cysteine rich domain* (Domínio rico em cisteína)

CTL – *Cytotoxic T lymphocyte* (Linfócito T citotóxico)

DCs – *Dendritic cells* (Células dendríticas)

DNA – *Desoxyribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucleico)

EDTA – Ethylenediaminetetraacetic acid (Ácido etileno diamino tetra acético)

ELISA – Enzyme-linked immunoabsorbent assay (Ensaio imunoenzimático)

ETEC – *Enterotoxigenic Escherichia coli* (*Escherichia coli* enterotoxigênica)

FITC – Fluoresceína

gD – glicoproteína D

GM-CSF – *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (Fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos)

GSK - GlaxoSmithKline

HPV – *Human papillomavirus* (Vírus do papiloma humano)

HSP – *Heat shock protein* (Proteína de choque térmico)

HSV – Herpes simplex vírus

HVEM – *Herpes virus entry mediator* (Mediador da entrada de herpes vírus)

IFN- γ – Interferon gama

IgG – Imunoglobulina G

IL – Interleucina

INCA – Instituto Nacional do Câncer

IPTG – *Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside* (*isopropil-beta-D-tiogalactopiranosideo*)

LPS – Lipopolissacarídeo

LTK63 – Mutante de LT-I com substituição pontual do aminoácido serina pelo aminoácido lisina na posição 63 da subunidade

MDSCs - *Myeloid-derived supressor cells* (Células mielóides supressoras)

MFI – *Median fluorescence intensity* (mediana da intensidade de fluorescência)

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

NF- κ B – *Nuclear fator kappa B* (Fator nuclear kappa B)

NK – *Natural killer cells*

OVA – Ovalbumina

PE – Ficoeritrina

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

PMSF – Phenylmethanesulfonyl fluoride

Poly(I:C) - *Polyinosinic:polycytidylic acid*

SDS-PAGE – *Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis* (separação eletroforética em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio)

SFB – soro fetal bovino

Th – *T helper* (T auxiliar)

TLR – *Toll-like receptor* (Receptor do tipo Toll)

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

Treg – Células T regulatórias

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

LISTA DE SÍMBOLOS

Ab_{8492nm} – Absorbância lida a 492 nm

DO_{600} – densidade óptica lida a 600 nm

°C – graus Celsius

mm^2 – milímetros quadrados

kDa – kiloDalton(s)

L – litro(s)

M – molar

m – mili (10^{-3})

μ – micro(10^{-6})

n – nano (10^{-9})

pH – potencial hidrogeniônico

psi – *pound force per square inch* (libra força por polegada quadrada)

rpm – rotações por minuto

% – porcentagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 O VÍRUS DO PAPILOMA HUMANO (HPV) E O CANCER CERVICAL.....	22
1.2 HPV, CANCER CERVICAL E VACINAS.....	24
1.3 A GLICOPROTEÍNA D (gD) DO HSV-1	28
2 OBJETIVOS	31
3 MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 OBTENÇÃO DOS ANTÍGENOS EMPREGADOS NOS ENSAIOS DE IMUNIZAÇÃO EM CAMUNDONGOS E <i>IN VITRO</i>	32
3.1.1 Linhagem bacteriana e condições de cultivo	32
3.1.2 Purificação das proteínas gD, gDE7 e E7 expressas em <i>E. coli</i>	32
3.2 EFEITO ANTITUMORAL TERAPÊUTICO DA PROTEÍNA gDE7 ADMINISTRADA SOZINHA OU EM ASSOCIAÇÃO A ADJUVANTES EM CAMUNDONGOS C57BL/6.....	34
3.2.1 Camundongos utilizados e ensaios de desafio com células TC-1	34
3.2.2 Experimentos de imunizações	35
3.2.3 Isolamento de células do baço	36
3.2.4 Intracellular cytokine staining (ICS) de amostras de sangue periférico e baço	36
3.2.5 Ensaio de citotoxicidade <i>in vivo</i>	37
3.2.6 Análise de resposta de linfócitos T CD8⁺ polifuncionais	38
3.2.7 Imunofenotipagem dos linfócitos T CD8⁺ E7-específicos	38
3.2.8 Processamento de tumores em matrigel	39
3.2.9 Células Supressoras	39
3.2.10 Cytokine Beads Array (CBA)	40
3.2.11 ELISAS	40
3.3 ANÁLISE DE PARÂMETROS DE SEGURANÇA VACINAL NOS CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM O ADJUVANTE POLY(I:C).....	41
3.3.1 Análises hematológicas	41
3.3.2 Testes bioquímicos para análise de função hepática, renal e lactato desidrogenase	41
3.4 ESTUDO DO EFEITO ADJUVANTE DA PROTEÍNA gD – FOCO EM CÉLULAS DENDRÍTICAS (DCs).....	41

3.4.1 Isolamento de células dendríticas de camundongos	41
3.4.2 Ensaio de ligação em células dendríticas de camundongo	42
3.4.3 Ativação de células dendríticas de camundongos <i>in vitro</i>	43
3.4.4 Diferenciação de células dendríticas derivadas de monócitos humanos (Mo-DCs) <i>in vitro</i>	43
3.4.5 Ativação de Mo-DCs e células dendríticas do sangue periférico humanas <i>in vitro</i>	44
3.4.6. Quantificação de LPS contaminante nas proteínas gD, gDE7 e E7	44
3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	45
4 RESULTADOS	46
4.1 OBTENÇÃO DOS ANTÍGENOS EMPREGADOS NOS ENSAIOS DE IMUNIZAÇÃO EM CAMUNDONGOS E <i>IN VITRO</i>	46
4.1.1 Obtenção da proteína de fusão gDE7	46
4.1.2 Obtenção da proteína gD recombinante	47
4.1.3 Obtenção da proteína E7 recombinante	48
4.2. EFEITO ANTITUMORAL TERAPÊUTICO DA PROTEÍNA gDE7 ADMINISTRADA EM ASSOCIAÇÃO A DIFERENTES ADJUVANTES EM CAMUNDONGOS C57BL/6	49
4.3. EFEITO ANTITUMORAL TERAPÊUTICO DA FORMULAÇÃO VACINAL CONSTITUÍDA PELA PROTEÍNA RECOMBINANTE gDE7 EM ASSOCIAÇÃO AO POLY(I:C)	52
4.3.1 Resposta imunológica humoral E7-específica em camundongos imunizados pela via subcutânea com as proteínas gDE7 e E7 coadministradas ou não ao adjuvante poly(I:C)	52
4.3.2 Resposta imunológica celular E7-específica e proteção antitumoral terapêutica em camundongos imunizados pela via subcutânea com as proteínas gDE7 e E7 coadministradas ou não ao poly(I:C)	54
<i>4.3.2.1 Efeito antitumoral terapêutico e ativação de respostas de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos</i>	54
<i>4.3.2.2 Avaliação da atividade citotóxica dos linfócitos T CD8⁺ E7-específicos</i>	60
<i>4.3.2.3 Avaliação do perfil polifuncional dos linfócitos T CD8⁺ E7-específicos</i>	63
<i>4.3.2.4 Imunofenotipagem dos linfócitos T CD8⁺ E7-específicos</i>	67

4.3.2.5 Contribuição dos subtipos de linfócitos T na proteção antitumoral mediada pela proteína gDE7 coadministrada ao poly(I:C).....	70
4.3.2.6 Avaliação da presença de linfócitos T CD8 ⁺ E7-específicos no microambiente tumoral.....	72
4.3.2.7 Efeito das imunizações sobre células imunossupressoras.....	75
4.3.2.8 Impacto da presença de LPS na resposta antitumoral terapêutica.....	79
4.4 ANÁLISE DE PARÂMETROS DE SEGURANÇA VACINAL NOS CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM O ADJUVANTE POLY(I:C).....	81
4.4.1 Análises hematológicas.....	82
4.4.2 Testes bioquímicos para análise de função hepática, renal e lactato desidrogenase.....	83
4.5 ESTUDO DO EFEITO ADJUVANTE DA PROTEÍNA gD – FOCO EM CÉLULAS DENDRÍTICAS (DCs).....	84
4.5.1 Efeito das proteínas gD, gDE7 e E7 em subpopulações de células dendríticas de camundongos.....	84
4.5.1.1 A polimixina B neutraliza os efeitos do LPS “in vitro” em culturas de células dendríticas de camundongos.....	89
4.5.2 Efeito das proteínas gD, gDE7 e E7 em células dendríticas derivadas de monócitos (MoDCs) e subpopulações de células dendríticas sanguíneas humanas.....	91
4.5.2.1. A polimixina B neutraliza os efeitos do LPS “in vitro” em culturas de células dendríticas humanas.....	94
5 DISCUSSÃO.....	95
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	101
REFERÊNCIAS	102
APÊNDICE A – Súmula Curricular.....	116
APÊNDICE B – Artigos publicados durante o doutorado.....	118

1 INTRODUÇÃO

1.1 O VÍRUS DO PAPILOMA HUMANO (HPV) E O CANCER CERVICAL

O câncer cervical é considerado um sério problema de saúde pública e um dos maiores causadores de mortes relacionadas a tumores em mulheres. Aproximadamente 490.000 novos casos de câncer de colo de útero são diagnosticados, causando em torno de 270.000 mortes todos os anos (ZUR HAUSEN, 2006). Foi estimado pelo INCA que em 2014 houve 15.590 novos casos de câncer cervical no Brasil com a morte de 5.160 mulheres no ano de 2011.

A relação entre o vírus HPV e o câncer cervical foi reportada pela primeira vez no início da década de 1970 por Harold zur Hausen (ZUR HAUSEN, 2009). O seu grupo de pesquisa foi o primeiro a demonstrar que verrugas genitais continham genes do HPV (GISSMANN; ZUR HAUSEN, 1980) e também a descobrir a relação da infecção pelo HPV e o câncer cervical (DÜRST et al., 1983). De lá para cá, muitos estudos mostraram que o vírus do papiloma humano (HPV) está presente em 99% dos casos clínicos, sendo considerado o agente etiológico do câncer cervical (LIN et al., 2010). Além disso, 90% dos casos de câncer de anus e em uma proporção crescente dos cânceres de cabeça e pescoço também estão relacionados ao vírus HPV.

Dentre os mais de 200 genótipos de HPV já identificados, acredita-se que 40 possuam afinidade pelo epitélio anogenital e aproximadamente 12 genótipos são considerados carcinogênicos. Logo, os genótipos de HPV são classificados como alto risco (genótipos 16, 18, 33, 45, entre outros) e baixo risco (genótipos 6, 11, 29, 63, 65, entre outros), dependendo da propensão em desencadear tumores em diferentes sítios anatômicos (EGAWA et al., 2015; LIN et al., 2010; SMITH et al., 2007; ZUR HAUSEN, 1996). Estima-se que 70% dos casos de neoplasias intraepitelial cervical (CIN) e tumores cervicais estão associados aos genótipos de alto risco 16 e 18.

A maioria das infecções por HPV é transiente, cerca de 90% delas são eliminadas em até 2 anos sem qualquer intervenção (MOSCICKI et al., 2004). No entanto, algumas infecções persistem e podem modificar o epitélio cervical dando origem a CINs ou lesões intraepiteliais escamosas (SIL), que na maioria dos casos, são assintomáticas e são diagnosticadas pelo exame de Papanicolau. Se não diagnosticadas, as lesões precursoras podem evoluir para lesões de alto grau e carcinoma cervical *in situ*, ainda localizado. Os tumores se tornam metastáticos a partir

do momento que as células tumorais ultrapassam a membrana basal do epitélio e alcançam a circulação sanguínea e linfática. Este processo de evolução tumoral é lento, mas ocorre em uma proporção significativa de pacientes com carcinoma cervical *in situ*.

A progressão de lesões precursoras para tumores invasivos está relacionada com a integração do genoma do HPV ao genoma da célula hospedeira, com perda de alguns genes virais neste processo. O potencial de malignização aumenta com a inativação do gene E2, responsável pela regulação da expressão das oncoproteínas E6 e E7, que passam a ser expressas de forma constitutiva. A expressão contínua de E6 e E7 dos genótipos de HPV de alto risco pode induzir a malignização celular e levar ao desenvolvimento de lesões e do câncer cervical (HOWLEY et al., 1991). O processo de malignização das células infectadas ocorre principalmente quando as oncoproteínas E6 e E7 dos genótipos de alto risco inativam os produtos dos genes *p53* e *pRb*, respectivamente, levando ao descontrole do crescimento celular. A expressão da proteína E6 pelas células infectadas resulta na degradação da proteína p53 e o ciclo celular passa a ocorrer sem reparos. Além disso, a oncoproteína E6 é capaz de degradar a proteína pró-apoptótica BAK (JACKSON et al., 2000) e ativar a telomerase (VELDMAN et al., 2010). Por sua vez, a oncoproteína E7 interage com a proteína do retinoblastoma (pRb) e causa a liberação do fator de transcrição E2F, fator responsável pela transcrição de genes que atuam na replicação dos cromossomos. A liberação do E2F causa perturbação do ciclo celular através de estímulo excessivo para a proliferação dos queratinócitos infectados (YUGAWA; KIYONO, 2009). Acredita-se que estas interações, apesar de não serem suficientes, desempenhem um papel fundamental no processo de carcinogênese das células infectadas pelo HPV.

As células que desempenham papel fundamental no processo de eliminação de lesões precursoras e tumores induzidos pelo HPV fazem parte tanto do sistema imune inato quanto do sistema imune adaptativo. Em verrugas genitais e lesões cervicais precursoras que regredem espontaneamente são encontradas maiores frequências de macrófagos M1, linfócitos T CD4⁺ com perfil Th-1 e linfócitos T CD8⁺ citotóxicos infiltrados (BUONAGURO et al., 2011; VAN DER BURG; MELIEF, 2011). Os macrófagos M1 possuem um fenótipo pró-inflamatório e secretam mediadores solúveis que recrutam outras células efetoras para o local da lesão, como linfócitos T e células *natural killers* (NKs). Os linfócitos TCD4⁺ são essenciais na montagem de respostas imunológicas antitumorais porque sustentam a atividade efetora dos CTLs, ativam células efetoras do sistema imune inato e auxiliam no desenvolvimento de células de memória.

De fato, a importância deste subtipo de linfócitos fica clara em pacientes soropositivos para o HIV que, com a diminuição dos linfócitos T CD4⁺, apresentam aumento da incidência de infecções por HPV e de tumores cervicais (VAN DER BURG; PALEFSKY, 2009). Por sua vez, os linfócitos T CD8⁺ citotóxicos são peças importantes na imunidade antígeno-específica, e têm papel fundamental na regressão de lesões associadas ao HPV (DELIGEOROGLOU et al., 2013).

O escape da imunovigilância está intimamente relacionado com a capacidade dos tumores cervicais em impedir um processo inflamatório necessário para a maturação de células apresentadoras de antígenos (APCs), e conseqüentemente, a ativação de respostas antitumorais efetoras (TINDLE et al., 2002). Além disso, vários estudos mostraram que há um aumento no número de linfócitos T regulatórios, células mielóides supressoras (MDSCs) e macrófagos M2, na interface entre tumores cervicais e o sistema imune ou infiltrados nos tumores (BATTAGLIA et al., 2009; STONE et al., 2014; VAN DER BURG et al., 2007). E ainda, na transição do epitélio normal e o carcinoma cervical foram encontradas baixas concentrações de IFN- γ e aumento de IL-10, citocina capaz de inibir a síntese de citocinas pró-inflamatórias, suprimir apresentação de antígenos pelas APCs, recrutar MDSCs e bloquear respostas efetoras (BOLPETTI et al., 2014; KOBAYASHI et al., 2008; SCOTT et al., 2009; STONE et al., 2014). Somente 25% das lesões precursoras regridem espontaneamente em decorrência de respostas antitumorais naturais (TRIMBLE et al., 2010). Fato que reforça o papel do microambiente imunossupressor promovido pelos tumores cervicais no escape da vigilância do sistema imune. Neste contexto, as imunoterapias ativas, incluindo as vacinas terapêuticas, podem reverter o escape da imunovigilância por meio da modulação do sistema imune e indução de respostas antígeno-específicas, capazes de promover a regressão e eliminação das lesões induzidas pelo HPV (VAN DER BURG; PALEFSKY, 2009).

1.2 HPV, CANCER CERVICAL E VACINAS

O HPV possui dois genes de expressão tardia que codificam as proteínas L1 e L2 do capsídeo, expressas nas camadas mais superficiais do epitélio infectado. Tanto L1 como L2 possuem epítomos reconhecidos por anticorpos neutralizantes, e por isso, tornaram-se alvos atraentes para o desenvolvimento de vacinas que impeçam a infecção pelo HPV. Existem atualmente duas vacinas profiláticas disponíveis no mercado, e ambas são compostas por

partículas virais recombinantes não infecciosas denominadas *virus-like particles* (VLPs). Estas VLPs são compostas majoritariamente pela proteína L1 que quando expressa em células eucariotas, promovem um arranjo estrutural tomando a forma do capsídeo viral do HPV. A primeira vacina profilática a ser licenciada, a Gardasil da Merck (Merck & CO., Whitehouse Station, NJ, USA) é uma vacina quadrivalente composta por VLPs dos genótipos 6, 11, 16 e 18 produzidos em células de levedura. A segunda, Cervarix, produzida pela GlaxoSmithKline (GSK, Filadélfia, PA, Estados Unidos) é uma vacina bivalente composta por VLPs dos genótipos 16 e 18 produzidos em células de inseto e contém o adjuvante hidróxido de alumínio associado ao monofosforil lipídio A (AS04). Essas vacinas induzem resposta robusta de anticorpos neutralizantes e são altamente eficazes na prevenção da infecção dos respectivos genótipos de HPV (PINTO et al., 2003; PINTO et al., 2005; VILLA et al., 2005; VILLA et al., 2006). Com a intenção de evitar futuras infecções pelos vírus e prevenir o aumento dos casos de câncer cervical, em 2014, o Ministério da Saúde do Brasil adotou a campanha de vacinação contra o HPV com a utilização da vacina bivalente Cervarix. Apesar da alta eficácia na prevenção da infecção pelo HPV, as vacinas profiláticas não beneficiam mulheres já infectadas com o vírus ou que já apresentam lesões precursoras. Portanto, o desenvolvimento de novas terapias é desejável e necessário.

As vacinas terapêuticas buscam impedir ou controlar o crescimento de lesões/tumores induzidos pelo HPV pela ativação de respostas imunológicas do tipo celular, particularmente de linfócitos T CD8⁺ citotóxicos. As oncoproteínas E6 e E7 do HPV-16 são consideradas antígenos ideais para vacinas terapêuticas contra tumores cervicais devido às seguintes características: **I)** são antígenos expressos constitutivamente em lesões precursoras e tumores cervicais, pois possuem papel crucial na malignização das células tumorais; **II)** são antígenos específicos de células infectadas ou tumorais, e não de células saudáveis e **III)** representam proteínas não-próprias ao hospedeiro, desta forma, os riscos de indução de autoimunidade podem ser menores. Por estas razões, E6 e E7 são os antígenos mais comumente empregados no desenvolvimento de vacinas terapêuticas contra tumores associados ao HPV (HUNG et al., 2007; LIN et al., 2010; TINDLE et al., 2002).

Algumas vacinas terapêuticas já foram testadas em ensaios clínicos contra tumores induzidos por HPV, mas até o momento nenhuma estratégia vacinal demonstrou resultados satisfatórios para uso em humanos. Estes ensaios mostraram a indução de respostas imunológicas específicas contra antígenos do HPV, como anticorpos, células T CD4⁺ ou T

CD8⁺, mas a regressão completa das lesões ainda precisa ser demonstrada (BAGARAZZI et al., 2012; DE JONG et al., 2002; GOLDSTONE et al., 2002; KENTER et al., 2008; KIM et al., 2014; SHEETS et al., 2003; WELTERS et al., 2008). Portanto, a descoberta de formulações vacinais terapêuticas com eficácia comprovada irá mudar radicalmente as estratégias de tratamento do câncer cervical, atualmente baseadas em cirurgias, radioterapias, quimioterapias ou uma combinação destas. Além da alta morbidade, esses tratamentos são de alto custo e traumáticos para o paciente.

Neste cenário, o Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas do Instituto de Ciências Biomédicas da USP desenvolveu duas vacinas com potencial terapêutico contra tumores associados ao HPV-16, uma baseada em vacina de DNA (DINIZ et al., 2010, DINIZ et al., 2013) e outra baseada em proteína recombinante purificada (PORCHIA et al., 2011). Ambas estratégias são baseadas na expressão de uma proteína híbrida, resultado da fusão genética da glicoproteína D (gD) do Herpes simplex vírus -1 (HSV-1) com a oncoproteína E7 do HPV-16, capazes de ativar células T CD8⁺ E7-específicas e gerar efeito antitumoral terapêutico em camundongos tratados. Em relação à estratégia baseada em proteína recombinante purificada, a imunização com a proteína gDE7 conferiu proteção preventiva completa (100%) em camundongos imunizados e desafiados com a linhagem tumoral TC-1. Por outro lado, a abordagem terapêutica conferiu proteção antitumoral parcial (30%) aos camundongos desafiados e imunizados com quatro doses da proteína gDE7, sem a utilização de adjuvantes vacinais (PORCHIA et al., 2011). A proteção antitumoral foi relacionada à ativação simultânea de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos sistêmicos e também a propriedades adjuvantes da proteína gD geneticamente fusionada ao antígeno E7. Os resultados obtidos indicaram que o potencial terapêutico da proteína gDE7 poderia ser aumentado pela incorporação de adjuvantes vacinais.

As vacinas baseadas em proteínas recombinantes purificadas têm vantagens sobre as vacinas baseadas em peptídeos porque apresentam todos os epítomos potenciais para o processamento do antígeno e ativação de células do sistema imunológico. Além disso, as vacinas baseadas em proteínas recombinantes purificadas são mais seguras em relação às vacinas baseadas em vetores virais ou bacterianos. Por outro lado, a ativação de respostas citotóxicas é, muitas vezes, deficiente. Uma alternativa comumente utilizada para contornar este problema é o emprego de adjuvantes adequados para a ativação de linfócitos T.

A coadministração de um adjuvante vacinal pode melhorar a eficácia de imunoterapias contra o câncer. O poly(I:C) (*polyinosinic:polycytidylic acid*) é uma molécula sintética análoga

ao RNA de dupla fita viral, agonista de *Toll like receptor 3* (TLR3) e ligante do receptor citoplasmático *melanoma differentiation-associated protein 5* (MDA-5) (CHEEVER et al., 2008; PICHLMAIR; REIS E SOUZA, 2007). O poly(I:C) foi incluído no ranking do *U.S. National Cancer Institute* como o agente de maior potencial imunoterapêutico no tratamento de diversos tipos de câncer (CHEEVER et al., 2008). Essas moléculas podem ter efeito direto em células tumorais que expressam os receptores TLR3 e MDA-5 funcionais, promovendo a inibição do crescimento tumoral e a indução de apoptose (CHENG; XU, 2010; SMITS et al., 2007). A indução de apoptose de alguns tipos de células tumorais mediada pelo poly(I:C) pode, indiretamente, contribuir para a geração de respostas imunes antitumorais devido a maior disponibilidade de antígenos tumorais para captura e processamento pelas APCs. Além do efeito citotóxico em células tumorais, a potencialização das respostas imunes inata e adaptativa é considerada o principal mecanismo antitumoral do poly(I:C). O efeito destas moléculas já foi descrito em diferentes processos e em diferentes células do sistema imune, incluindo células dendríticas (DCs), NKs e linfócitos T. Estudos demonstraram que o poly(I:C) é capaz de maturar e ativar eficientemente DCs *in vitro* (BENWELL et al., 2010), estimular linfócitos T (SALEM et al., 2009), promover a atividade citotóxica em células NK (LION et al., 2011) e melhorar a apresentação cruzada de antígenos em DCs (McBRIDE et al., 2006). Além disso, dentre outros agonistas de TLRs, o poly(I:C) é o indutor mais eficiente de interferon do tipo I (IFN-I) (LONGHI et al., 2009), importante elo entre a resposta imune inata e a adaptativa.

Diversos estudos pré-clínicos e clínicos foram conduzidos com o intuito de mostrar a eficácia e a segurança da administração do poly(I:C) ou poly ICLC (HiltonolTM – poly(I:C) estabilizado com poli-L-lisina e carboximetilcelulose) como adjuvante para diversas imunoterapias contra o câncer (AMMI et al., 2015), inclusive para o câncer cervical. Domingos-Pereira et al. (2013) reportaram que a instilação intravaginal do poly(I:C) após a imunização subcutânea com a proteína E7 induziu um aumento no número de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos na mucosa genital de camundongos, quando comparada a imunização com a proteína E7 sem a instilação do poly(I:C). Um outro estudo demonstrou que a coadministração do poly(I:C) a peptídeos da proteína E7 (BiVax) induziu resposta robusta de linfócitos T CD8⁺ efetiva contra tumores estabelecidos (CHO et al., 2013). Em 2007, a Nventa Biopharmaceuticals Corporation, hoje Akela Pharma, realizou um estudo clínico de fase I para avaliar a segurança e tolerabilidade de uma imunoterapia composta pela proteína de fusão HspE7 coadministrada ao poly ICLC em pacientes com CIN. A administração de três doses da

proteína HspE7 (500 µg) coadministrada ao poly ICLC (1mg) induziu respostas de linfócitos T E7-específicos em todos os pacientes envolvidos. (NVENTA BIOPHARMACEUTICALS, 2007). O estudo clínico de fase II não foi iniciado até o momento.

Portanto, o poly(I:C) / poly ICLC contribuir efetivamente na indução de respostas antitumorais como componentes estimuladores em imunoterapias contra o câncer. Embora a eficácia destas moléculas a longo prazo ainda não tenha sido avaliada, a sua atividade imunoestimuladora em pacientes torna o poly(I:C)/poly ICLC um bom adjuvante para vacinas terapêuticas contra o câncer.

1.3 A GLICOPROTEÍNA D (gD) DO HSV-1

As glicoproteínas do HSV são componentes estruturais do envelope do vírus e são essenciais no processo de internalização do vírus em células permissivas. Elas ligam em receptores celulares específicos que permitem a fusão da membrana celular com o envelope do HSV. A glicoproteína D (gD) interage com três tipos de receptores: Nectin-1, heparan-sulfato e HVEM (*Herpes Virus Entry Mediator*), este último membro da família de receptores de fatores de necrose tumoral (TNFR).

O receptor HVEM e seus ligantes são amplamente expressos em células do sistema imune, incluindo linfócitos T, linfócitos B, monócitos, macrófagos, células dendríticas, entre outras (CAI et al., 2008; CAI; FREEMAN, 2009; TAO et al., 2008). Quando o HVEM, presente em células dendríticas ou linfócitos, interage com os ligantes LIGHT ou linfotoxina α (LT- α) são gerados sinais estimulatórios que resulta na ativação e proliferação destas células (DEL RIO et al., 2010). Por outro lado, quando HVEM interage com BTLA (*B and T lymphocyte attenuator*) ou CD160 expressos nos linfócitos T ou B, desencadeia sinais inibitórios que bloqueiam a ativação destes linfócitos, levando-os a um estado de anergia (CAI et al., 2008). Portanto, o receptor HVEM tem papel importante na regulação do sistema imune, podendo exercer efeitos estimuladores para a proliferação, diferenciação e sobrevivência de células do sistema imune, bem como o bloqueio de respostas já iniciadas e manutenção da homeostase (MURPHY; MURPHY, 2010) (**Figura 1**).

Além de interagir com ligantes endógenos, o receptor HVEM é reconhecido pela glicoproteína D do HSV (HELDWEIN; KRUMMENACHER, 2008). A gD compete com os ligantes inibidores (BTLA/CD160) pela ligação no receptor, mas não interfere na interação dos

ligantes estimuladores (LIGHT/LT- α) de HVEM. Desta forma, a proteína gD pode favorecer o aumento da imunogenicidade do antígeno E7 ou outras proteínas a ela fusionadas, por competir com o BTLA pela interação com o HVEM, reduzindo os efeitos inibitórios em linfócitos T e B (LASARO et al., 2008). Por isso, além de intermediar a entrada do HSV, a interação da proteína gD com o HVEM altera a complexa via regulatória mediada por este receptor, podendo desta forma, favorecer vias estimuladoras do sistema imune.

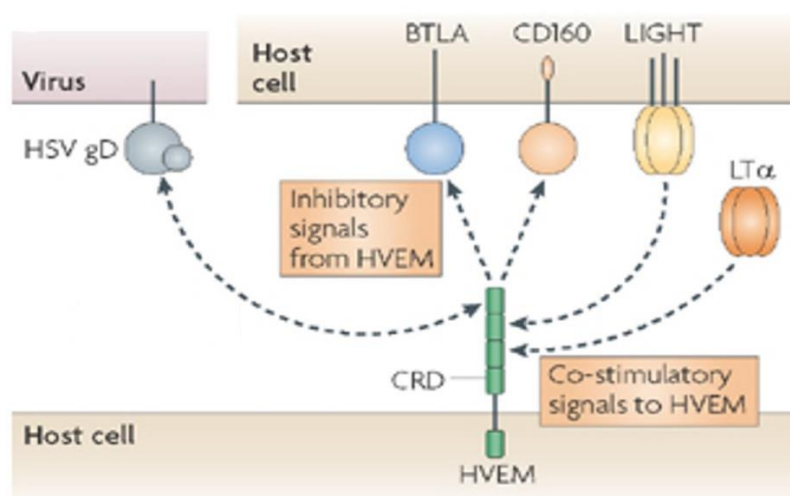


Figura 1. Regulação do sistema imune mediada pelo receptor HVEM. Os ligantes LIGHT e LT- α interagem com o receptor HVEM pelos domínios ricos em cisteína 2 e 3 (CRD2 e CRD3), o que desencadeia a sinalização coestimuladora em células que expressam este receptor. Os ligantes BTLA e CD160 interagem com HVEM pelo domínio N-terminal CRD1 e disparam sinais co-inibidores para linfócitos T e B. A glicoproteína D também interage com o receptor HVEM por meio do seu domínio CRD1 e, desta forma, facilita a entrada do HSV em células que expressem este receptor. Embora os ligantes estimuladores e inibidores interajam com regiões distintas do receptor HVEM, a gD pode competir com o BTLA e CD160 pela ligação no HVEM. Fonte: Modificado de Sedy; Spear e Ware (2008).

Um estudo recente adicionou maior complexidade à esta rede de sinais ao mostrar que a interação de HVEM com os ligantes BTLA, CD160 e a própria gD também pode disparar sinais estimulatórios, sem nenhuma influência dos ligantes LIGHT ou LT- α (CHEUNG et al., 2009). Evidências *in vitro* demonstraram que a ligação da proteína gD ao receptor HVEM resultou na ativação de NF- κ B e na redução dos níveis de apoptose em diferentes linhagens celulares, características que podem afetar a entrada do HSV nas células hospedeiras e, principalmente, nas respostas imunológicas induzidas. (CHEUNG et al., 2009; POLLARA et al., 2004; SCIORTINO et al., 2008a, b).

Stiles et al. (2010) demonstraram que a interação da proteína gD com o receptor HVEM promove a internalização deste receptor durante a entrada do HSV via endocitose. A baixa disponibilidade de HVEM na superfície celular tem consequências potencialmente importantes na modulação do sistema imune, devido à acessibilidade restrita dos ligantes a este receptor. Pelo fato dos ligantes LIGHT e LT- α promoverem sinais estimulatórios ao interagirem com outros receptores celulares, foi proposto que a sinalização inibitória, induzida pela ligação exclusiva de BTLA, é a principal função do receptor HVEM (WANG et al., 2005). Portanto, a interação da proteína gD com o receptor HVEM pode induzir sinais de sobrevivência para as células que expressam este receptor (DCs, linfócitos T) e diminuir a interação do BTLA com o HVEM pela internalização deste receptor. Estes dois fatores têm potencial para aumentar a intensidade de respostas baseadas em linfócitos T e B.

2 OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho de tese foi aumentar a eficácia antitumoral terapêutica conferida pela proteína gDE7 por meio da associação de adjuvantes vacinais em formulações testadas em condições experimentais com tumores associados ao HPV-16. Uma vez identificada a formulação vacinal com maior eficácia terapêutica antitumoral, procurou-se avaliar os mecanismos envolvidos nas respostas imunológicas protetoras.

Dentre as etapas experimentais específicas realizadas para a conclusão deste estudo estão:

- I. A obtenção das proteínas gD, gDE7 e E7, empregadas nos ensaios de imunização e *in vitro*, por meio de super-expressão em *E. coli* seguida de purificação por cromatografia de afinidade;
- II. Avaliação do efeito antitumoral terapêutico da proteína gDE7 associada a adjuvantes vacinais com diferentes formas de estimulação do sistema imune: CpG, peptídeo LAH4, um variante atóxico da toxina LT de *E. coli* (ETEC) (LTK63) e o poly(I:C) em formulações vacinais administradas por via subcutânea.
- III. Avaliação do efeito antitumoral terapêutico e de respostas imunológicas (humoral e celular) desencadeadas pela formulação vacinal constituída pela proteína gDE7 coadministrada ao poly(I:C).
- IV. Análise de alguns parâmetros de segurança vacinal indicativos de toxicidade relacionada ao emprego do adjuvante poly(I:C).
- V. Estudo do efeito adjuvante do componente gD da proteína de fusão gDE7 em células dendríticas de camundongos e de sangue periférico de doadores humanos saudáveis.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DOS ANTÍGENOS EMPREGADOS NOS ENSAIOS DE IMUNIZAÇÃO EM CAMUNDONGOS E *IN VITRO*

3.1.1 Linhagem bacteriana e condições de cultivo

A linhagem de *E. coli* utilizada nos ensaios de expressão das proteínas gD, gDE7 e E7 foi a BL21(DE3). Em todos os ensaios realizados, a linhagem BL21(DE3) foi cultivada em meio Luria Broth (LB) (1% triptona, 0.5% extrato de levedura, 171 mM NaCl, pH 7.0) por um período de aproximadamente 18 horas a 37 °C sob agitação intensa (200 rpm) em agitador orbital. As linhagens recombinantes foram rotineiramente cultivadas em meio LB suplementado com canamicina (50µg/mL).

3.1.2 Purificação das proteínas gD, gDE7 e E7 expressas em *E. coli*

O protocolo a seguir foi adaptado para melhorar os processos de purificação das proteínas gD, gDE7 e E7 previamente descritos por nós (PORCHIA et al., 2011). A expressão das proteínas foi induzida com 0,5 mM de Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) após as culturas atingirem DO₆₀₀ de 0,5, por 3-4 horas. A expressão das proteínas gD, gDE7 e E7 recombinantes foi escalonada para 4 L de volume de cultura. Para a extração das proteínas gD e gDE7, os sedimentos bacterianos foram ressuspensos em 10% do volume original de cultura em tampão A (Tris 100 mM; NaCl 500 mM; pH 9 para a **gD** e Tris 100 mM; NaCl 500 mM; pH 7,5 para a **gDE7**) acrescido do inibidor de proteases phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) a uma concentração final de 1 mM, lisozima a 0,1mg/mL, DNase (1,75U/4L cultura) e cloreto de magnésio a 20mM. A suspensão foi mantida em banho a 37 °C durante 30 minutos. Em seguida adicionou-se 0,1% de Triton X-100 e as células foram rompidas mecanicamente em homogeneizador a 6.000 psi por 10 minutos. A fração solúvel dos extratos bacterianos foi separada da fração insolúvel por centrifugação a 10.000 rpm por 40 min a 4 °C. A fração insolúvel das culturas foram submetidas à solubilização em 1% do volume original de cultura com tampão A₁ (ureia 8M; Tris 100 mM; NaCl 500 mM; pH 9 para a **gD** e ureia 8M; Tris 100 mM; NaCl 500 mM; pH 7,5 para a **gDE7**) sob agitação a 4 °C por aproximadamente 18 horas.

O extrato obtido foi clarificado através de centrifugação a 10.000 rpm por 30 minutos e filtração em membrana de acetato celulose (diâmetro dos poros: 0,45 e 0,22 μm - Millipore). As proteínas contidas no extrato clarificado foram aplicadas em coluna Histrap HP (GE Healthcare Life Sciences, Schenectady, New York, U.S.) de cromatografia de afinidade ao níquel, previamente equilibrada com o tampão A₁, em um AKTA FPLC (GE). Após a injeção da amostra, a coluna foi lavada com tampão A₁ e então com um gradiente linear do tampão A₁ ao B (ureia 8M, Tris 100 mM, NaCl 500 mM e Imidazol 1 M pH 9 para a **gD** e ureia 8M, Tris 100 mM, NaCl 500 mM e Imidazol 1 M pH 7,5 para a **gDE7**) para a eluição das proteínas recombinantes.

Em seguida, as frações das proteínas purificadas foram homogeneizadas e submetidas a filtração tangencial (Millipore LabScale TFF System) com membranas Pellicon (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha) de corte de 10k para a troca gradual do respectivo tampão A₁ pelo respectivo tampão A. O processo de *refolding* das proteínas ocorreu retirando gradualmente o agente desnaturante através de tampões com concentrações decrescentes de ureia. Para o *refolding* da proteína **gD** utilizamos os tampões: ureia 4 M Tris 100 mM NaCl 500 mM pH 9; ureia 2 M Tris 100 mM NaCl 500 mM pH 9; ureia 1 M Tris 100 mM NaCl 500 mM glicerol 10% pH 9 e Tris 100 mM NaCl 500 mM glicerol 10% pH 9. Para o *refolding* da proteína **gDE7** utilizamos os tampões: ureia 4 M Tris 100 mM NaCl 500 mM pH 7,5; ureia 2 M Tris 100 mM NaCl 500 mM pH 7,5; ureia 1 M Tris 100 mM NaCl 500 mM glicerol 10% pH 7,5 e Tris 100 mM NaCl 500 mM glicerol 10% pH 7,5.

Para a purificação do antígeno **E7**, o sedimento bacteriano foi ressuspenso em 10% do volume original de cultura em tampão A (Tris 100 mM; NaCl 500 mM; pH 7,5) acrescido de inibidor de proteases PMSF a 1 mM, lisozima a 0,1mg/mL, DNase (1,75U/4L cultura) e cloreto de magnésio a 20mM. A suspensão foi mantida em banho a 37 °C durante 30 minutos. Em seguida adicionou-se 0,1% de Triton X-100 e as células foram rompidas mecanicamente em homogeneizador conforme descrito anteriormente. O extrato solúvel obtido contendo a proteína E7 foi clarificado através de centrifugação a 10.000 rpm por 30 minutos a 4 °C e filtração em membrana de acetato celulose (0,45 e 0,22 μm). Em seguida, o extrato foi aplicado em coluna Histrap HP de cromatografia de afinidade ao níquel previamente equilibrada com o tampão A em um AKTA FPLC. A coluna foi lavada com um gradiente linear do tampão A ao B (Tris 100 mM, NaCl 500 mM e Imidazol 1 M pH 7,5) para a eluição da proteína E7. Após o processo de purificação, as frações contendo a proteína E7 purificada foram homogeneizadas e

submetidas a duas trocas de tampão (para o tampão A) em sacos de diálise com poros de corte de 10K (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) por aproximadamente 18 horas.

O rendimento final das proteínas gD, gDE7 e E7 foi determinado por quantificação com o reagente de Bradford (Thermo Scientific) utilizando uma curva padrão de BSA (albumina sérica bovina), de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, as proteínas foram analisadas em SDS-PAGE 15% para a confirmação da quantificação.

3.2 EFEITO ANTITUMORAL TERAPÊUTICO DA PROTEÍNA gDE7 ADMINISTRADA SOZINHA OU EM ASSOCIAÇÃO A ADJUVANTES EM CAMUNDONGOS C57BL/6

3.2.1 Camundongos utilizados e ensaios de desafio com células TC-1

Camundongos machos ou fêmeas C57BL/6 selvagens, C57BL/6 TLR4 *knockout* (KO) e C57BL/6 CD4 KO (The Jackson Laboratory) de 6 a 8 semanas foram fornecidos pelo biotério do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas II (ICB-II) da Universidade de São Paulo (USP). Camundongos fêmeas C57BL/6 CD8 KO (The Jackson Laboratory) de 6 a 8 semanas foram fornecidos pelo biotério do Departamento de Imunologia do ICB-IV da USP. Todas as manipulações, imunizações e procedimentos de eutanásia foram aprovados pelo comitê de ética para experimentação animal e seguiram as regras aprovadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

A linhagem tumoral TC-1, derivada de células epiteliais de pulmão de camundongos C57BL/6 transformadas com o oncogene c-Ha-ras e as oncoproteínas E6 e E7 do HPV-16, foi gentilmente cedida pelo Dr. T.C. Wu da Universidade Johns Hopkins, Baltimore, EUA (LIN et al., 1996). As células TC-1 foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Gibco, Waltham, MA USA) suplementado com 10% (vol/vol) de soro fetal bovino (SFB) (Vitrocel, Campinas, SP, Brasil), 100 U/ml de penicilina e 100 ug/ml de estreptomicina (Gibco) e 0,4 mg/ml de G418 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) a 37 °C e 5% CO₂. Para os experimentos de desafio tumoral, as células TC-1 foram retiradas das garrafas com a ajuda de tripsina (Vitrocel), lavadas duas vezes e suspensas em meio sem soro na concentração de 7,5x10⁵/ml. As células TC-1 foram inoculadas a uma concentração de 7,5x10⁴ em 100 µl no flanco inferior direito de cada camundongo pela via subcutânea. Para os experimentos de análise de microambiente tumoral, as células TC-1 foram diluídas em matrigel (BD Biosciences) antes da inoculação. Os camundongos foram considerados com tumor quando os tumores se tornaram sólidos e atingiram 4 mm². Os

camundongos com tumores foram eutanasiados quando os tumores excederam 1 cm de diâmetro enquanto os camundongos livres de tumores foram mantidos vivos até o 60º dia do protocolo vacinal.

3.2.2 Experimentos de imunizações

Nos experimentos de proteção antitumoral terapêutica onde alguns adjuvantes vacinais foram testados, os camundongos foram imunizados com 30µg da proteína gDE7 sozinha ou coadministrada a diferentes adjuvantes como: CpG (1µg), LTK63 (5µg), o peptídeo LAH4 (GenScript, Piscataway Township, NJ, EUA) (10µg) e o poly(I:C) (InVivogen, Toulouse, França) (50µg). Para a maioria dos experimentos de proteção antitumoral terapêutica e avaliação de resposta imune, os camundongos foram divididos em seis grupos experimentais: grupo **controle** imunizado com salina apirogênica; grupo **poly(I:C)** imunizado com 50µg do adjuvante poly(I:C); grupo **gDE7** imunizado com 30µg da proteína gDE7; grupo **gDE7 coadministrada ao poly(I:C)** imunizado com 30µg da proteína gDE7 coadministrada ao adjuvante poly(I:C) (50µg); grupo **E7** imunizado com 10µg da proteína E7 e grupo **E7 coadministrada ao poly(I:C)** imunizado com 10µg da proteína E7 coadministrada ao adjuvante poly(I:C) (50µg). Os animais receberam quatro ou duas doses (com intervalos semanais) das formulações vacinais e cada grupo de imunização era composto de três a cinco animais (**Figura 2**). O protocolo de imunização terapêutica também foi realizado com duas doses da formulação vacinal composta pela proteína gDE7 coadministrada ao poli (I:C) com diferentes intervalos entre o transplante das células TC-1 e a primeira dose vacinal: 1, 3, 5, 7 e 10 dias. Todas as formulações vacinais foram veiculadas em salina apirogênica em volume final de 200µl pela via subcutânea na região do flanco inferior dos animais.

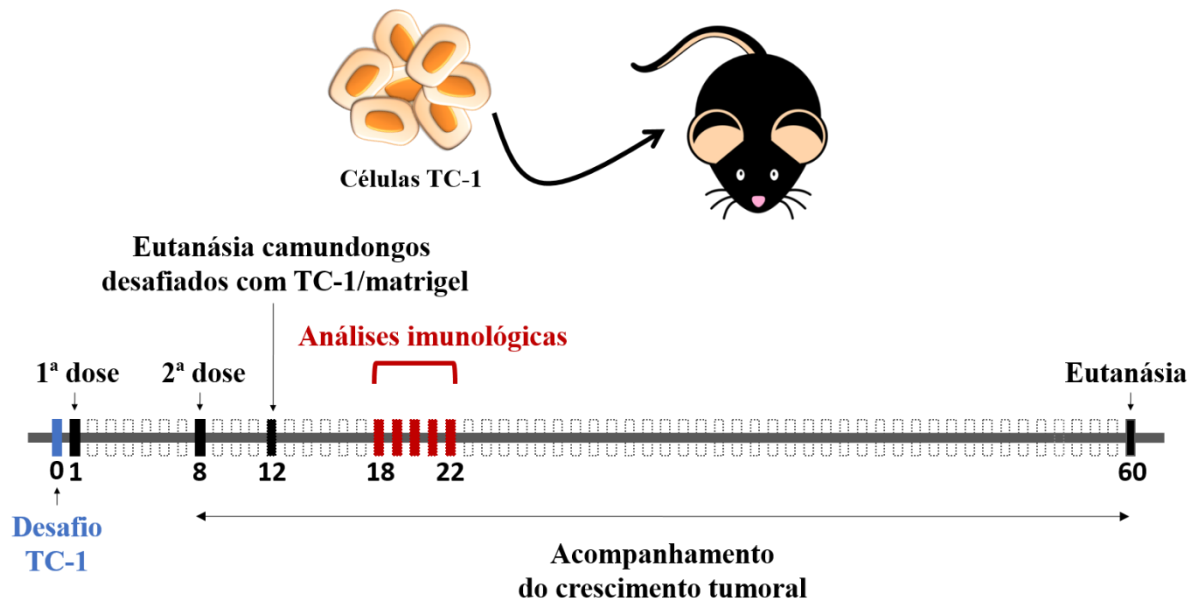


Figura 2. Regime vacinal utilizado na maioria dos ensaios de imunização. Os camundongos foram desafiados com $7,5 \times 10^4$ células TC-1 no dia 0 e imunizados com 2 doses das formulações vacinais, nos dias 1 e 8 após o desafio, e acompanhados por 60 dias para avaliação do crescimento tumoral. A maioria das análises imunológicas foi feita entre os dias 18 e 22 após o desafio, durante o pico da resposta efetora E7-específica sistêmica. Os camundongos desafiados com as células TC-1 diluídas em matrigel foram eutanasiados quatro dias após a dose de reforço.

3.2.3 Isolamento de células do baço

Camundongos *naïves* ou imunizados foram sacrificados e os baços foram removidos assepticamente. Após a obtenção da suspensão de células, as células foram lavadas em 5 mL de RPMI 1640 suplementado com 2% de SFB e então suspensas em meio completo ou tampão MACS (0,5% BSA, 2mM EDTA em PBS, pH: 7,2). A viabilidade das células foi avaliada usando o corante de exclusão azul de Tripán 0,4%. A concentração celular foi estimada em uma câmara de Neubauer e ajustada para os ensaios imunológicos.

3.2.4 *Intracellular cytokine staining* (ICS) de amostras de sangue periférico e baço

A marcação de IFN- γ intracelular foi feita com amostras de sangue periférico ou baço tratadas com o tampão de lise de hemácias ACK a 4°C por cinco minutos. As células foram lavadas com meio RPMI suplementado com 2% SFB, centrifugadas e ressuspensas em meio completo (RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB, 2 mM L-glutamina, 1 mM piruvato de sódio (Gibco), 1% vol/vol solução de aminoácidos não essenciais (Gibco) 1% vol/vol solução

de aminoácidos essenciais (Gibco), 1% vol/vol solução de vitaminas (Gibco), 55 μ M 2 β -mercaptoetanol (Gibco)), contendo o peptídeo CD8-específico da proteína E7 (⁴⁹RAHYNIVTF⁵⁷) (GenScript) na concentração 1,5 μ g/ml, Brefeldina A (Sigma) na concentração de uso de 10 μ g/ml e IL-2 (Sigma) na concentração final de 5ng/ml. As células foram cultivadas por 6-12 horas a 37 °C e 5% CO₂ em placas de 96 poços de fundo U. Nos experimentos de análise de degranulação, as células também foram encubadas com monensina (BD Biosciences) (4 μ l/6ml de estímulo) e o anticorpo monoclonal anti-CD107a-PECY7 (BD Biosciences) (1:200). Após o período de incubação, as células foram lavadas e incubadas por 30 minutos com o anticorpo monoclonal anti-CD8 α -FITC (BD Biosciences) em uma diluição 1:100 em tampão MACS. As células foram lavadas com tampão MACS e então fixadas com 4% de paraformaldeído por 10 minutos a 4°C. As lavagens subsequentes foram feitas com tampão de permeabilização contendo 0,5% de saponina (Sigma). Em seguida, as células foram incubadas por 30 minutos com o anticorpo anti-IFN- γ -PE (BD Biosciences) em uma diluição 1:100 em tampão de permeabilização. Após as lavagens, as células foram ressuspensas em tampão MACS e adquiridas no citômetro de fluxo LSR Fortessa (BD Bioscience). As células foram analisadas nos parâmetros *forward scatter* (FSC)/ *side scatter* (SSC) (50.000 – 150.000 eventos) e a porcentagem de linfócitos T CD8⁺ IFN- γ ⁺ dentre da população total de linfócitos T CD8⁺ foi determinada. As porcentagens de células produtoras de citocinas foram calculadas subtraindo-se os valores das amostras não estimuladas. Os dados foram analisados no software FlowJo (versão 10.0.7, Tree Star).

3.2.5 Ensaio de citotoxicidade *in vivo*

O ensaio de citotoxicidade *in vivo* foi realizado para verificar a presença de células T CD8⁺ citotóxicas específicas para o antígeno E7 em animais imunizados, de acordo com metodologia descrita por Barber, Wherrey e Ahmed (2003). Dez dias após a última dose, um grupo de animais não imunizados foi submetido à eutanásia, os baços foram retirados e processados como já descrito. As células foram marcadas com 0,5 μ M ou 5 μ M de carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) (Invitrogen, Waltham, MA, USA) em PBS, por 15 minutos a 37 °C. Após a incubação, as células foram lavadas e ressuspensas em meio RPMI acrescido de 5% de SFB. A população de células marcadas com 5 μ M de CFSE também foi pulsada com 2,5 μ g/mL do peptídeo CD8-específico da proteína E7 por 40 minutos a 37 °C.

Após esse período, as células foram lavadas com meio RPMI suplementado com 5% SFB para a remoção do excesso do peptídeo e, em seguida, contadas. Quantidades iguais das duas populações de células marcadas foram misturadas e centrifugadas a 1.500 rpm. O sedimento de células foi ressuspensionado em RPMI sem soro de modo a conter 2×10^7 células/100 μ L e injetado nos animais imunizados pela via do plexo retro orbital. No dia seguinte, todos os animais foram submetidos à eutanásia e as células do baço foram coletadas. As células do baço foram lavadas e ressuspensionadas em 400 μ L de tampão MACS e examinadas por citometria de fluxo. As porcentagens de lise específica das células-alvo foram calculadas como descrito anteriormente (DE ALENCAR et al., 2009).

3.2.6 Análise de resposta de linfócitos T CD8⁺ polifuncionais

Células do baço de camundongos imunizados foram estimulados com 2 μ g/mL do anticorpo anti-CD28 (BD Biosciences), 1,5 μ g/ml do peptídeo CD8-específico da proteína E7 e Brefeldina A – GolgiPlugTM (BD Biosciences) por até 12 horas. Após este período, as células foram lavadas com tampão MACS e marcadas utilizando anticorpos monoclonais anti-CD8 α -Pacific Blue por 30 minutos a 4 °C. As células foram então fixadas e permeabilizadas utilizando o kit Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences). Células permeabilizadas foram lavadas com o tampão Perm/Wash (BD Biosciences) e marcadas com os anticorpos monoclonais anti-CD3-APCCy7, anti-IL-2-PE, anti-TNF α -PECy7 e anti-IFN- γ -APC por 30 minutos a 4°C. Após a marcação as células foram lavadas duas vezes e ressuspensionadas em tampão MACS. As células foram adquiridas em citômetro de fluxo FACSCanto (BD Biosciences) e analisadas nos parâmetros FSC/SSC (500.000 eventos) e pela expressão das moléculas CD3 e CD8 utilizando o software FlowJo (version 9.0.2, Tree Star). A plataforma Boolean foi utilizada para criar diversas combinações das três citocinas analisadas (IFN- γ , TNF- α e IL-2) dentro da população de linfócitos T CD3⁺CD8⁺. As porcentagens de produção de citocinas foram calculadas subtraindo-se os valores das amostras não estimuladas.

3.2.7 Imunofenotipagem dos linfócitos T CD8⁺ E7-específicos

Para analisar o fenótipo de memória de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos, células foram inicialmente marcadas um dextrâmero de MHC-I contendo o peptídeo CD8-específico da

proteína E7 marcado com APC (Immudex, Copenhagen, Dinamarca) durante 10 minutos à temperatura ambiente no escuro. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com tampão MACS e marcadas com os anticorpos monoclonais anti-CD8 α -Pacífic Blue, anti-CD44-PE e anti-CD62L-PECy5 (BD Biosciences). As células foram lavadas duas vezes e ressuspensas em tampão MACS. As amostras foram adquiridas em citômetro de fluxo FACSCanto (BD Biosciences) e depois analisadas no software FlowJo (versão 9.0.2, Tree Star). As células foram analisadas em FSC/SSC (10^6 eventos) e as porcentagens de linfócitos de memória efetora / efetores (CD44⁺CD62L^{low}) e memória central (CD44⁺CD62L^{high}) foram determinadas dentro da população de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos.

3.2.8 Processamento de tumores em matrigel

Os tumores em matrigel foram retirados cirurgicamente do compartimento subcutâneo dos camundongos eutanasiados quatro dias após a última dose do regime vacinal. Inicialmente, os tumores foram fatiados em pequenos pedaços e digeridos com 1 mg/mL de Colagenase D (Roche, Basel, Suíça) em tampão PBS pH 7,4 a 37 °C por aproximadamente 1 hora. Após a digestão, as células foram filtradas em membrana de nylon de 70 μ m, lavadas com tampão MACS, contadas e marcadas com o dextrâmero de MHC-I contendo o peptídeo CD8-específico da proteína E7 e o anticorpo monoclonal anti-CD8 α BB515, para análise em citometria de fluxo.

3.2.9 Células Supressoras

As suspensões de células do baço de camundongos imunizados foram semeadas em placas de cultura de fundo chato de 24 poços (5×10^6 células/poço) contendo meio RPMI 1640 com 10% SFB e cultivadas com 10 μ g/ml da proteína E7 do HPV-16. Após 5 dias de incubação, as células foram recolhidas, marcadas com anticorpo anti-CD4-FITC (BD Biosciences) e anti-CD25-APC (eBioscience), fixadas utilizando tampão de coloração para Foxp3 (eBioscience) e então marcadas com anti-Foxp3-PE (BD Biosciences). As células mielóides supressoras (MDSC) foram quantificadas *ex vivo* através da marcação com os anticorpos anti-CD45-PerCP-Cy5.5, anti-CD11b-BV421 e anti-Gr1-PE (BD Biosciences). As amostras foram adquiridas em citômetro de fluxo LSR Fortessa (BD Biosciences) e depois analisadas no software FlowJo

(versão 10.0.7, Tree Star). As células foram analisadas em FSC/SSC (300.000 eventos) e as porcentagens de linfócitos T regulatórios ($CD4^+CD25^+Foxp3^+$) dentre os linfócitos T $CD4^+$ e células mielóides supressoras ($CD11b^+Gr-1^+$) dentre células $CD45^+$ foram determinadas.

3.2.10 Cytokine Beads Array (CBA)

As células do baço dos camundongos (5×10^5 células/poço) foram estimulados *in vitro* em meio completo com $10 \mu\text{g/ml}$ da proteína E7 por um período de 48 horas. A dosagem de citocinas do sobrenadante da cultura foi realizada com o kit Th1/Th2/Th17 (BD Biosciences) de acordo com as instruções do fabricante.

3.2.11 ELISAS

Os ensaios de ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) foram realizados com 250 ng da proteína E7 purificada disposta em placas PoliSorp (Nunc, Waltham, MA, USA). Após incubação de 18 horas a 4°C , as placas foram bloqueadas com 3% de gelatina em PBS-Tween 0,05% (PBS-T) por 2 horas a 37°C . Após as lavagens com PBS-T incubou-se as placas com soros provenientes dos animais imunizados em diluições iniciais que variaram de 1:25 e 1:1000 em 1% de gelatina em PBS-T durante 1 hora a 37°C . Anticorpos anti-IgG de camundongo conjugados à peroxidase foram diluídos em 1% de gelatina em PBS-T (1:3.000 - IgG total e IgG2c ou 1:10.000 - IgG1) e incubados nas placas previamente lavadas com PBS-T. A presença de anticorpos anti-E7 provenientes dos soros ligados aos antígenos foi visualizada com a solução de revelação (12,5 mL de tampão citrato-fosfato 33 mM, pH 5.0; 5 mg de O-fenilenodiaminadihidrocloreto [OPD], e 5 μL de H_2O_2) incubada nas placas por 15 minutos no escuro a temperatura ambiente. A reação foi interrompida com 50 μL de H_2SO_4 1 N por poço. As densidades óticas das reações foram determinadas a 492 nm em leitor de ELISA modelo MultiScan EX.

3.3 ANÁLISE DE PARÂMETROS DE SEGURANÇA VACINAL NOS CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM O ADJUVANTE POLY(I:C)

3.3.1 Análises hematológicas

Amostras de sangue periférico foram utilizadas para avaliar sete parâmetros hematológicos: células da série branca (WBC), neutrófilos (NEU), linfócitos (LYM), monócitos (MON), células da série vermelha (RBC), hematócrito (HCT) e hemoglobina (HGB). As amostras foram obtidas através da sangria dos animais (n=5/grupo) pela via do plexo submandibular em tubos contendo 20 µl do anticoagulante citrato de sódio a 7,2% (m/v) e analisadas em contador hematológico diferencial (Mindray). Os valores absolutos obtidos pelos grupos de imunização foram comparados com o grupo controle que recebeu somente o veículo vacinal, salina apirogênica.

3.3.2 Testes bioquímicos para análise de função hepática, renal e lactato desidrogenase

Os animais imunizados (n=5/grupo) foram sangrados pela via do plexo submandibular para obtenção de soro cinco dias após a segunda dose vacinal. Testes laboratoriais foram empregados para a dosagem de lactato desidrogenase (LDH) (Laborclin) - indicativo de lesão tecidual generalizada; transaminase glutâmico oxalacética (TGO) (Laborclin) / transaminase glutâmico pirúvico (TGP) (Laborclin) – indicativos de função hepática; e ureia (Wiener lab) – indicativo de função renal. Os testes bioquímicos foram realizados de acordo com as orientações dos fabricantes. Os valores obtidos pelos grupos de imunização foram comparados com o grupo controle, que recebeu somente o veículo vacinal, salina apirogênica.

3.4 ESTUDO DO EFEITO ADJUVANTE DA PROTEÍNA gD SOBRE CÉLULAS DENDRÍTICAS (DCs)

3.4.1 Isolamento de células dendríticas de camundongos

Os baços e os linfonodos de camundongos C57BL/6 selvagens naïves (com 8 a 12 semanas de idade) foram extraídos e colocados em uma placa de cultura contendo meio RPMI frio suplementado com 2% de SFB, 100 U/ml de penicilina e 100 ug/ml de estreptomicina. Os

órgãos foram cuidadosamente macerados e as grandes partículas foram removidas com a ajuda de filtros de membrana de nylon de 70 μm . As células foram lavadas com tampão MACS gelado e em seguida, foram incubadas com MicroBeads magnéticas (MiltenyiBiotec) conjugadas com anticorpos monoclonais anti-CD11c de acordo com as instruções do fabricante. A seleção positiva de DCs continha um nível de pureza > 90% de células CD11c⁺.

3.4.2 Ensaios de ligação em células dendríticas de camundongo

Os ensaios de ligação proteínas/células dendríticas foram realizados usando células totais de baço (5×10^6 células/poço) ou células dendríticas isoladas (4×10^5 células/poço) de camundongos C57BL/6 selvagens ou C57BL/6 TLR4 KO. As proteínas foram utilizadas em quantidades equimolares: gDE7 = 3 $\mu\text{g/mL}$; gD = 2,25 $\mu\text{g/ml}$; E7 = 0,75 $\mu\text{g/ml}$. Os receptores Fc γ foram bloqueados com anticorpos anti-CD16/CD32 (FcBlock – BD Biosciences) durante 15 minutos em gelo. Em seguida, as células foram incubadas com as proteínas durante 40 minutos em gelo, lavadas duas vezes com tampão MACS e então incubadas com anticorpo purificado anti-His (Thermo Scientific) durante 40 minutos em gelo. Após as lavagens, as células foram incubadas com anticorpo anti-IgG-PE (Jackson Immuno Research) durante 30 minutos em gelo, lavadas duas vezes com tampão MACS e incubadas com anticorpos biotinilados anti-CD3e, anti-CD19 e anti-CD49b (BD Biosciences) durante 30 minutos em gelo. Após as lavagens, as células foram incubadas com anticorpo anti-CD11c APC, anti-IA[b] (anti-MHC-II) BV421, anti-CD8 α -BB515 e estreptoavidina PerCPCy5.5 (BD Biosciences). As células foram analisadas em FSC/SSC (10^6 células totais do baço ou 10^5 células dendríticas isoladas), seguido de exclusão de *doublets* e células CD3⁺/CD49b⁺/CD19⁺. A análise partiu, portanto, da população de células dendríticas CD11c⁺ MHC-II⁺. Em seguida, a capacidade de ligação das proteínas gD, gDE7 e E7 foi avaliada através da fluorescência PE nas populações de dendríticas CD11c⁺CD8 α ⁺ e CD11c⁺CD8 α ⁻. Os dados estão apresentados como mediana da intensidade de fluorescência (MFI) do PE.

3.4.3 Ativação de células dendríticas de camundongos *in vitro*

Polimixina B foi adicionada às soluções das proteínas para neutralizar os efeitos da contaminação por LPS (TYNAN et al., 2012). Resumidamente, a polimixina B (200 ug/ml) foi previamente incubada com LPS (2 ug/ml), ou com a proteína gDE7 (60 µg/ml), ou com a proteína gD (45 µg/ml) ou com a proteína E7 (15 µg/ml) durante 2 horas a 37 °C. Em seguida, 4×10^5 células dendríticas isoladas foram incubadas com 50 uL das seguintes combinações e concentrações de uso: LPS (100 ng/ml); Polimixina B (10 ug/ml); LPS + polimixina B (100 ng/ml + 10 ug/ml); gDE7 + polimixina B (3 ug/ml + 10 ug/ml); gD + polimixina B (2,25 µg/ml + 10 ug/ml) e E7 + polimixina B (0,75 µg/ml + 10 ug/ml). Após 48 horas, as células foram lavadas com tampão MACS e em seguida coradas com anti-CD11c, anti-IA[b] (anti-MHC-II), anti-CD8 α , anti-CD40 e anti-CD86 conjugados com diferentes fluorocromos (BD Biosciences). Para a avaliação de IL-12 intracelular, as células dendríticas foram incubadas com Brefeldina A (10 µg/ml) (Sigma) durante as últimas 12 horas. As células (50.000 eventos) foram examinadas por citometria de fluxo utilizando LSR Fortessa (BD Biosciences) e os dados foram analisados utilizando o software FlowJo (versão 10.0.7, Tree Star). Os valores de MFI (CD40 e CD86) são mostrados a partir de células CD11c⁺ CD8 α ⁺ ou CD11c⁺ CD8 α ⁻. As percentagens de células IL-12⁺ foram determinadas dentre as células dendríticas CD11c⁺ CD8 α ⁺ ou CD11c⁺ CD8 α ⁻.

3.4.4 Diferenciação de células dendríticas derivadas de monócitos humanos (Mo-DCs) *in vitro*

Os monócitos sanguíneos foram separados a partir sangue periférico de doadores saudáveis por procedimentos de centrifugação dupla com Ficoll-Hypaque (Amersham Pharmacia Biotech) e 51% de Percoll (GE Life Sciences). Após lavagens extensivas com PBS, os monócitos (pureza CD14⁺ \geq 80%) foram ressuspensos em meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB acrescido de antibiótico-antimicótico (100 U/ml penicilina, 100 ug/ml estreptomicina, e 25 ug/ml de anfotericina) e semeados em placas de seis poços na presença de GM-CSF (50 ng/ml; R & D Systems) e IL-4 (50 ng/ml; R & D Systems) por 7 dias.

3.4.5 Ativação de Mo-DCs e células dendríticas do sangue periférico humanas *in vitro*

No dia 6 do protocolo de diferenciação das Mo-DCs, o LPS (100 ng/ml), a Polimixina B (10 ug/ml); LPS + polimixina B (100 ng/ml + 10 ug/ml); gDE7 + polimixina B (3 ug/ml + 10 ug/ml); gD + polimixina B (2,25 µg/ml + 10 ug/ml) ou E7 + polimixina B (0,75 µg/ml + 10 ug/ml) foram adicionadas as culturas na presença de reagente de StopGolgi (BD Biosciences) por 6 horas. Em seguida, as Mo-DCs foram colhidas, fixadas/permeabilizadas e a expressão de TNF- α foi investigada por citometria de fluxo.

Células dendríticas do sangue periférico de doadores saudáveis foram separadas por procedimentos de centrifugação dupla com Ficoll-Hypaque e 51% de Percoll. Após lavagens extensivas com PBS, as DC's foram ressuspendidas em meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB acrescido de antibiótico-antimicótico (100 U/ml penicilina, 100 ug/ml estreptomicina, e 25 ug/ml de anfotericina) e semeadas em placas de seis poços na presença de LPS (100 ng/ml), Polimixina B (10 ug/ml); LPS + polimixina B (100 ng/ml + 10 ug/ml); gDE7 + polimixina B (3 ug/ml + 10 ug/ml); gD + polimixina B (2,25 µg/ml + 10 ug/ml) ou E7 + polimixina B (0,75 µg/ml + 10 ug/ml). O reagente de StopGolgi foi incubado nas culturas por aproximadamente 6 horas. Em seguida, as DCs foram colhidas, fixadas/permeabilizadas e a expressão de TNF- α foi investigada por citometria de fluxo.

3.4.6 Quantificação do LPS contaminante nas proteínas gD, gDE7 e E7

A quantificação do LPS presente nas soluções das proteínas foi realizada com o kit Limulus Amebocyte Lysate (Lonza) de acordo com as instruções do fabricante. As quantidades estão expressas em ng de LPS por µg de proteína conforme demonstrado na **tebela 1**.

Tabela 1. Quantificação do LPS presente nas proteínas gD, gDE7 e E7 utilizados nos ensaios *in vitro* com células dendríticas de camundongos e humanas.

	gD	gDE7	E7
LPS (ng/µg das proteínas)	0,9	3,2	1,2

3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para verificar diferenças estatisticamente significativas entre grupos foram aplicados o teste t de Student ou a análise de variância (ANOVA) seguida do *post test* de Bonferroni. Testes Log-rank foram empregados quando curvas de sobrevivência foram comparadas. O teste estatístico aplicado aos dados está indicado nas legendas das figuras apresentadas. Os resultados foram considerados significativos para $p < 0,05$ e as avaliações foram realizadas no programa GraphPad Prism versão 5.01.

4 RESULTADOS

4.1 OBTENÇÃO DOS ANTÍGENOS EMPREGADOS NOS ENSAIOS DE IMUNIZAÇÃO EM CAMUNDONGOS E *IN VITRO*

4.1.1 Obtenção da proteína de fusão gDE7

A obtenção da proteína gDE7 foi realizada conforme descrito anteriormente, com pequenas adaptações (PORCHIA et al., 2011). A proteína gDE7 produzida em sistema procarioto acumula-se totalmente no extrato insolúvel de *E. coli* na forma de corpúsculos de inclusão. Por este motivo, foi necessário purificá-la na presença de um agente desnaturante e posteriormente retirá-lo das amostras (*refolding*/diálise) para as imunizações em camundongos. A proteína gDE7 foi purificada por cromatografia de afinidade ao níquel em função da cauda de 6 aminoácidos histidina geneticamente fusionada à sua porção C-terminal. Conforme mostrado na **figura 3A**, durante a etapa de eluição por gradiente linear de imidazol, foi identificado um pico de absorvância contendo a proteína gDE7 inicialmente adsorvida à coluna e liberada com aproximadamente 300 mM de imidazol.

Várias técnicas foram testadas para a renaturação da proteína gDE7: diálise em membrana, diálise pulsada, *refolding* em coluna de cromatografia, entre outros. Estes processos se mostraram muito dispendiosos e de baixo rendimento de produção. Por outro lado, a técnica de *refolding* que permitiu obter maior rendimento da proteína gDE7 solúvel foi a filtração tangencial, onde o agente desnaturante é retirado gradualmente da amostra por meio de lavagens extensivas com tampões com concentrações decrescentes de ureia. Durante o trabalho, foram feitas adaptações no protocolo de extração e *refolding* da proteína gDE7 de forma a aumentar o seu rendimento final. Por exemplo, a adição de 10% de glicerol aos tampões de *refolding* melhorou a estabilidade da proteína gDE7 em solução durante a retirada da ureia e, desta forma, foi possível obter um rendimento final de aproximadamente 14mg da proteína gDE7 solúvel / litro de cultura induzida, cerca de 40% a mais do descrito anteriormente. Após o *refolding* por filtração tangencial, o perfil eletroforético da gDE7 em SDS-PAGE 15% apresentou duas bandas com massas moleculares compatíveis ao descrito anteriormente (~65 kDa para a banda majoritária de maior massa molecular e ~55 kDa para a banda minoritária de menor massa molecular, ambas reconhecidas por anticorpo monoclonal anti-gD [dados não mostrados]) e com elevado nível de pureza (**Figura 3B**).

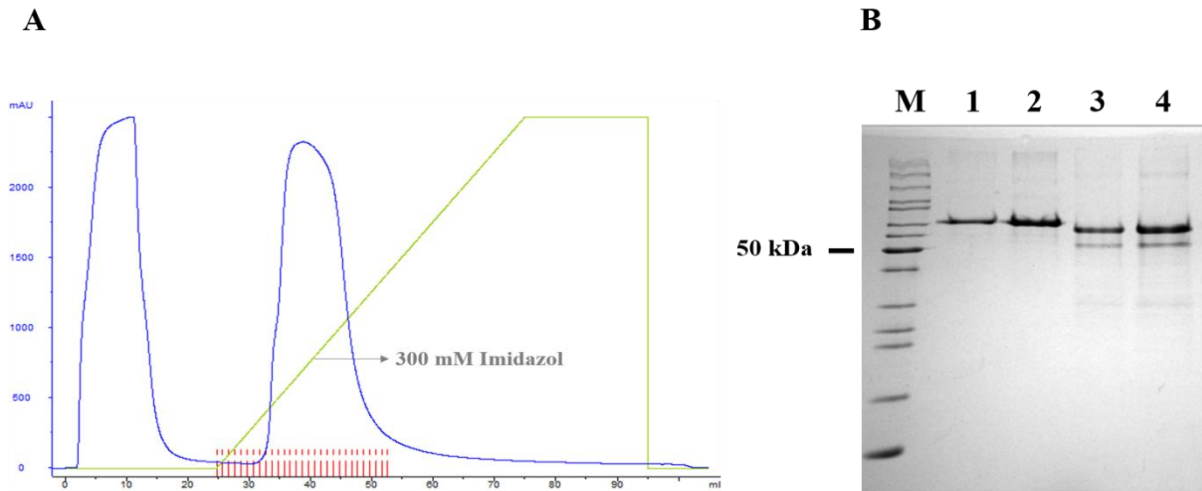


Figura 3. Obtenção da proteína de fusão gDE7 a partir do extrato insolúvel de *E. coli*. (A) Cromatograma representativo do processo de purificação por afinidade ao níquel da proteína gDE7 na presença de 8M ureia. (B) Caracterização da proteína gDE7 purificada por SDS-PAGE 15% após a etapa de *refolding*. M – Marcador de massa molecular (Fermentas); 1 – BSA 1µg; 2 – BSA 2µg; 3 - gDE7 1µg; 4 - gDE7 2µg.

4.1.2 Obtenção da proteína gD recombinante

A obtenção da proteína gD foi realizada conforme descrito anteriormente com pequenas adaptações (PORCHIA et al., 2011). Assim como a proteína gDE7, a proteína gD produzida em sistema procarioto também se acumula totalmente no extrato insolúvel de *E. coli*, na forma de corpúsculos de inclusão. Por este motivo, foi necessário purificá-la na presença de um agente desnaturante e posteriormente retirá-lo (*refolding*/diálise) para sua utilização em ensaios *in vitro*. A proteína gD também foi purificada por cromatografia de afinidade ao níquel em função da cauda de 6 aminoácidos histidina geneticamente fusionada à sua porção C-terminal. Conforme mostrado na **figura 4A**, durante a etapa de eluição por gradiente linear de imidazol foram identificados dois picos de absorvância dos quais o segundo continha a proteína gD inicialmente adsorvida à coluna, eluída com aproximadamente 300 mM de imidazol.

De forma semelhante à proteína gDE7, a proteína gD também foi submetida ao processo de *refolding* após a etapa de purificação. Com o intuito de aumentar o rendimento final desta proteína, foi adicionado 10% de glicerol aos tampões de *refolding* que ajudou a melhorar a estabilidade da proteína gD em solução durante a retirada da ureia e, desta forma, foi possível obter um rendimento final de aproximadamente 15 mg da proteína gD solúvel / litro de cultura induzida.

Após o *refolding* realizado por filtração tangencial, o perfil eletroforético da proteína gD em SDS-PAGE 15% apresentou uma banda com massa molecular compatível ao descrito anteriormente (~45 kDa) e com elevado nível de pureza (**Figura 4B**).

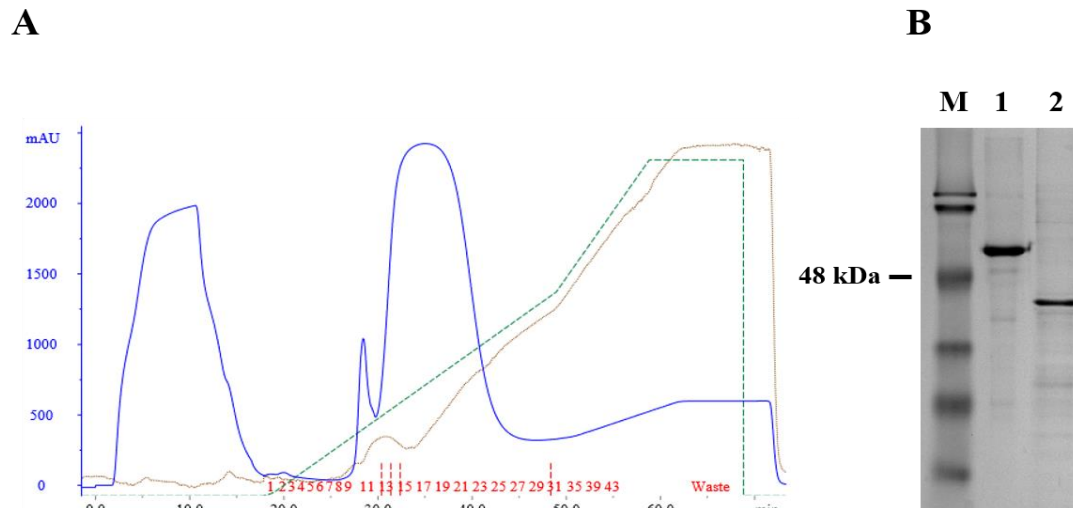


Figura 4. Obtenção da proteína gD a partir do extrato insolúvel de *E. coli*. (A) Cromatograma representativo do processo de purificação por afinidade ao níquel da proteína gD na presença de 8M ureia. (B) Caracterização da proteína gD purificada por SDS-PAGE 15% após a etapa de *refolding*. M – Marcador de massa molecular (Fermentas); 1 – BSA 2µg; 2 – gD 1µg.

4.1.3 Obtenção da proteína E7 recombinante

A obtenção da proteína E7 também foi realizada conforme descrito anteriormente (PORCHIA et al., 2011). Diferente das proteínas gDE7 e gD, a proteína E7 recombinante é obtida do extrato solúvel de *E. coli* e purificada por cromatografia de afinidade ao níquel em função da cauda de 6 aminoácidos histidina presente em sua porção C-terminal. A **Figura 5** apresenta o cromatograma do processo de purificação da proteína E7 e o produto final obtido. Durante o processo de eluição foram obtidos dois picos contendo proteínas inicialmente adsorvidas à coluna e liberadas por concentrações distintas de imidazol (**Figura 5A**). O pico A (100 mM de imidazol) continha proteínas contaminantes (dados não mostrados) e a proteína E7 foi localizada no pico B (800 mM de imidazol). As frações obtidas a partir do pico B foram homogeneizadas e submetidas à diálise para remoção do imidazol e então caracterizadas em eletroforese (**Figura 5B**).

Ao final do processo de purificação e diálise, foi possível obter a proteína E7 em sua forma solúvel, com tamanho similar ao descrito anteriormente (~20 kDa) e com elevado nível

de pureza. O rendimento final de produção foi de aproximadamente 10 mg da proteína E7 solúvel / litro de cultura induzida.

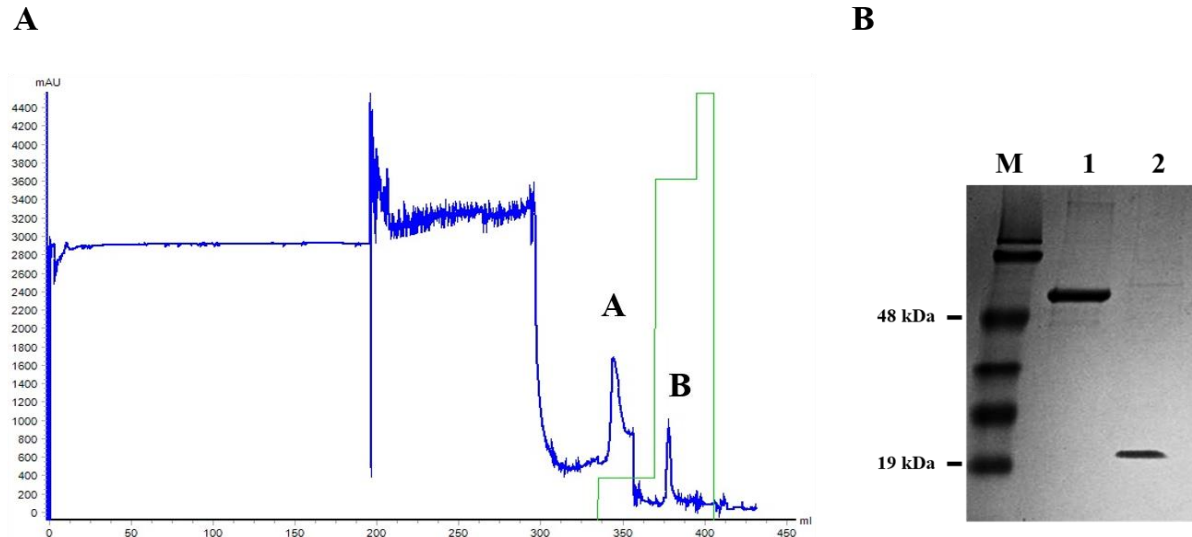


Figura 5. Obtenção da proteína E7 a partir do extrato solúvel de *E. coli*. (A) Cromatograma representativo do processo de purificação por afinidade ao níquel. (B) Caracterização da proteína E7 purificada por SDS-PAGE 15% após diálise. M – Marcador de massa molecular (Fermentas); 1 – BSA 2µg; 2 – E7 1µg.

4.2 EFEITO ANTITUMORAL TERAPÊUTICO DA PROTEÍNA gDE7 ADMINISTRADA EM ASSOCIAÇÃO A DIFERENTES ADJUVANTES EM CAMUNDONGOS C57BL/6

Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa tentou melhorar a performance de vacinas terapêuticas contra tumores associados ao HPV-16 fusionando geneticamente a oncoproteína E7 do HPV-16 à glicoproteína gD do HSV-1 (DINIZ et al., 2010; DINIZ et al., 2013; LASARO et al., 2005; PORCHIA et al., 2011). Resultados prévios demonstraram que a proteína de fusão gDE7 foi capaz de melhorar a resposta de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos e proteger parcialmente os camundongos previamente desafiados com as células TC-1, comparada com o antígeno E7 administrado sozinho (PORCHIA et al., 2011). Brevemente, a administração de quatro doses subcutâneas da proteína gDE7 (dias 1, 8, 15 e 22 após o desafio), conferiu proteção antitumoral terapêutica parcial (30%) a camundongos desafiados com as células TC-1, ao passo que não houve proteção antitumoral terapêutica nos camundongos imunizados somente com o antígeno E7. Esses resultados reforçaram a hipótese de que a proteína gD possui propriedades adjuvantes, particularmente para linfócitos T CD8⁺, quando fusionada geneticamente ao antígeno E7.

Para alcançar o principal objetivo deste trabalho, alguns adjuvantes vacinais foram associados à proteína gDE7 com o intuito de melhorar o seu efeito antitumoral terapêutico, demonstrado no modelo de desafio baseado em células TC-1. Desta forma, camundongos C57BL/6 foram desafiados com a linhagem TC-1 e imunizados com quatro doses subcutâneas (dias 1, 8, 15 e 22 após o desafio) da proteína gDE7 associada a quatro adjuvantes com diferentes formas de estimulação do sistema imune: CpG (1 µg) – ligante de *Toll like receptor* 9 (TLR 9), LTK63 (5 µg) – um variante atóxico da toxina termo-lábil (LT) de *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), o peptídeo LAH4 (10 µg) - candidato a promover apresentação cruzada de antígenos vacinais proteicos e o poly(I:C) (50 µg) – ligante de TLR 3. Os camundongos foram acompanhados durante 60 dias para a análise do crescimento tumoral.

De forma semelhante ao demonstrado no trabalho anterior (PORCHIA et al., 2011), a administração de quatro doses subcutâneas da proteína gDE7 conferiu proteção antitumoral terapêutica parcial (20%) aos camundongos desafiados com as células TC-1 (**Figura 6**). As respostas imunológicas induzidas por um adjuvante vacinal podem ser influenciadas pela sua natureza molecular, dose do adjuvante e do antígeno coadministrado, bem como a via de administração empregada. Por conta disso, à medida que os adjuvantes foram associados à proteína gDE7 diferentes níveis de proteção antitumoral foram observados. Por exemplo, as associações de gDE7 coadministrada ao CpG e/ou ao peptídeo LAH4 resultaram em proteção antitumoral terapêutica em apenas 40% dos camundongos desafiados. Em nossas condições experimentais, 1 µg de CpG/dose, 10 µg de peptídeo LAH4/dose ou a associação destes dois adjuvantes à proteína gDE7 não foram suficientes para proteger completamente os camundongos do aparecimento do tumor. Testes adicionais com doses maiores destes adjuvantes são necessários para avaliar a capacidade de potencialização da resposta antitumoral terapêutica induzida pela proteína gDE7.

De maneira interessante, a proteína gDE7 associada à toxina LTK63 ou gDE7 coadministrada ao poly(I:C) resultaram em proteção antitumoral terapêutica mais elevada. Ao final de 60 dias de acompanhamento, 80% dos camundongos desafiados e imunizados com quatro doses da proteína gDE7 associada à LTK63 permaneciam livres de tumores. E ainda, a formulação vacinal composta pela proteína gDE7 coadministrada ao poly(I:C) conferiu proteção antitumoral terapêutica completa aos animais previamente desafiados (**Figura 6**).

Após os primeiros 60 dias de acompanhamento, os camundongos livres de tumores dos grupos gDE7 (1 camundongo), gDE7 coadministrada ao CpG, gDE7 coadministrada ao

peptídeo LAH4 e gDE7 associada ao CpG e ao peptídeo LAH4 (2 camundongos em cada grupo) foram eutanasiados. Os animais protegidos dos grupos gDE7 associada à LTK63 (4 camundongos) e gDE7 coadministrada ao poly(I:C) (5 camundongos) receberam um segundo desafio com a mesma carga de células TC-1 do primeiro desafio ($7,5 \times 10^4$ células TC-1). Esses camundongos foram acompanhados por mais 20 dias para avaliação de desenvolvimento de novos tumores. Conforme ilustrado na **figura 6**, todos os camundongos do grupo imunizado com a proteína gDE7 coadministrada ao poly(I:C) permaneceram livres do crescimento de novos tumores até o final da avaliação. Neste experimento, o grupo imunizado com a proteína gDE7 associada à LTK63 mostrou o aparecimento de um tumor em um dos cinco camundongos, mas em seguida houve regressão e ao final da avaliação todos os animais estavam livres de tumor (**Figura 6**).

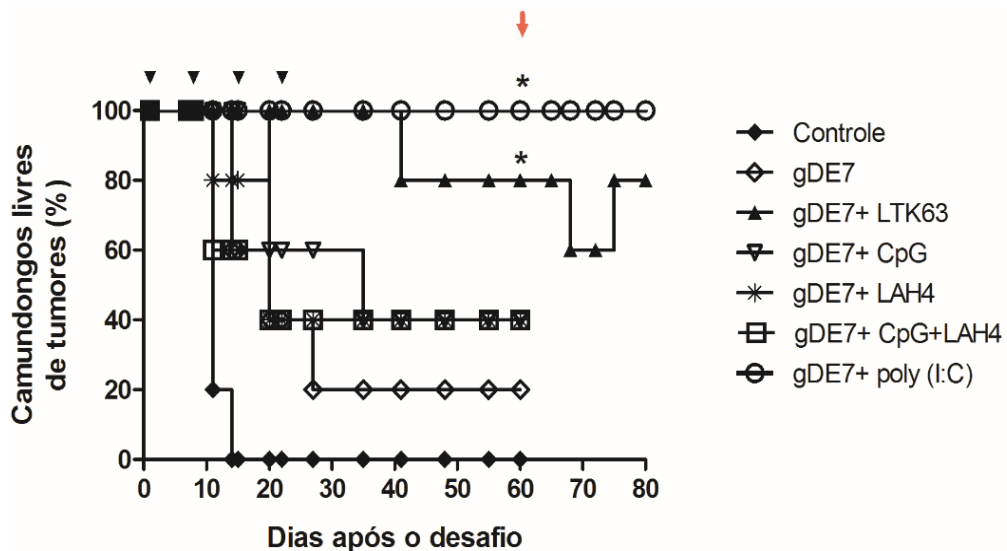


Figura 6. Efeito antitumoral terapêutico promovido pela coadministração da proteína gDE7 a diferentes adjuvantes vacinais em camundongos desafiados com as células TC-1. Os camundongos foram desafiados no dia 0, imunizados com quatro doses subcutâneas das formulações vacinais testadas e acompanhados por 60 dias para análise de proteção antitumoral. No 60º dia do protocolo vacinal os camundongos livres de tumores dos grupos gDE7, gDE7 coadministrada ao CpG, gDE7 coadministrada ao peptídeo LAH4 e gDE7 associada ao CpG e ao peptídeo LAH4 foram eutanasiados. Os camundongos livres de tumores dos grupos imunizados com a proteína gDE7 associada a LTK63 e gDE7 coadministrada ao poly(I:C) receberam um segundo desafio com as células TC-1 e foram acompanhados por mais 20 dias. As setas pretas indicam a administração das quatro doses de imunização. A seta vermelha indica o momento em que os grupos imunizados com a gDE7 associada a LTK63 e gDE7 coadministrada ao poly(I:C) receberam o segundo desafio com as células TC-1 ($7,5 \times 10^4$ células TC-1). n = 5 camundongos por grupo. * p < 0.05 versus gDE7. (Log-rank – Mantel Cox).

Baseado nesta observação, a formulação vacinal que conferiu maior proteção antitumoral terapêutica, gDE7 coadministrada ao poly(I:C), foi escolhida para aprofundar o estudo de alguns aspectos das respostas imunológicas geradas. Nesta etapa, outros grupos

experimentais foram inseridos ao estudo: um grupo imunizado com o poly(I:C) (ausente em alguns ensaios), um grupo imunizados com o antígeno E7 e um grupo imunizado com o antígeno E7 coadministrado ao poly(I:C). Desta forma também foi possível avaliar a contribuição da proteína gD na indução de respostas imunológicas antitumorais. Portanto, as análises posteriores foram realizadas em camundongos C57BL/6, utilizando as proteínas gDE7 e E7 na presença ou ausência do adjuvante poly(I:C) em um regime de imunização de quatro ou duas doses com intervalo de uma semana entre as doses.

4.3 EFEITO ANTITUMORAL TERAPÊUTICO DA FORMULAÇÃO VACINAL CONSTITUÍDA PELA PROTEÍNA RECOMBINANTE gDE7 EM ASSOCIAÇÃO AO POLY(I:C)

4.3.1 Resposta imunológica humoral E7-específica em camundongos imunizados pela via subcutânea com as proteínas gDE7 e E7 coadministradas ou não ao adjuvante poly(I:C)

Embora a resposta de anticorpos E7-específicos não tenha papel relevante na resposta antitumoral no modelo TC-1 de tumores associados ao HPV-16, ela é um parâmetro indicativo de imunogenicidade das formulações vacinais testadas. A resposta imunológica humoral sistêmica E7-específica, gerada pela administração dos antígenos gDE7 e E7 coadministrados ou não ao poly(I:C), foi mensurada pela técnica de ELISA. A **Figura 7** apresenta os níveis de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2c E7-específicos nos soros dos camundongos desafiados e imunizados (dias 1 e 8 após o desafio), quantificados 14 dias após a última dose vacinal. É importante destacar que os níveis basais de anticorpos quantificados nos camundongos imunizados com o veículo salina apirogênica (grupo controle) foram subtraídos dos grupos imunizados com as proteínas gDE7 e E7 coadministradas ou não ao poly(I:C).

Conforme ilustrado na **figura 7A**, a imunização com a proteína gDE7 isolada induziu um aumento estatisticamente significativo dos títulos de IgG anti-E7 em relação à imunização com o antígeno E7 isolado (média de títulos: gDE7 = 3.6 log₁₀; E7 = 2.9 log₁₀). O mesmo perfil foi observado com os antígenos coadministrados ao poly(I:C) (média de títulos: gDE7 coadministrada ao poly(I:C) = 3.9 log₁₀; E7 coadministrada ao poly(I:C) = 3.1 log₁₀). Curiosamente, a combinação do adjuvante poly(I:C) não aumentou de maneira significativa os títulos de IgG anti-E7 em relação aos antígenos administrados sem adjuvante. No entanto, a

coadministração deste adjuvante induziu uma resposta de IgG E7-específica mais homogênea entre os camundongos do mesmo grupo (**Figura 7A**).

As análises das respostas celulares E7-específicas, mostradas mais adiante, indicaram que a coadministração do poly(I:C) às proteínas gDE7 e E7 conduziu a resposta imunológica com tendência para o braço Th-1 em relação aos antígenos administrados sem adjuvante, confirmado pela maior produção de IFN- γ em camundongos C57BL/6 selvagens tratados com os antígenos e o poly(I:C) (**Figura 19C**). A geração de citocinas do braço Th-1 impacta diretamente na resposta humoral alterando as subclasses de IgG1 (do perfil Th-2) para IgG2c (perfil Th-1). Para avaliar o papel do adjuvante poly(I:C) na alteração das subclasses de IgG, os títulos de IgG1 e IgG2c anti-E7 séricos de camundongos desafiados e imunizados (dias 1 e 8 após o desafio) foram determinados 14 dias após a segunda dose vacinal.

Conforme demonstrado na **figura 7B**, foi observada uma resposta predominante de IgG1 E7-específico nos camundongos de todos os grupos experimentais (média de títulos: gDE7 = 3 log₁₀; gDE7 coadministrada ao poly(I:C) = 3.4 log₁₀; E7 = 2.6 log₁₀ e E7 coadministrada ao poly(I:C) = 3.2 log₁₀). No entanto, a coadministração do poly(I:C) elevou os títulos de IgG2c E7-específicos nos camundongos imunizados com as proteínas gDE7 e E7, porém, o aumento foi significativo apenas nos camundongos imunizados com a proteína gDE7 coadministrada ao poly(I:C) (média de título: 3 log₁₀), o que refletiu na menor razão de IgG1/IgG2c E7-específicos observada.

Coletivamente, esses dados demonstraram que a fusão genética da proteína gD ao antígeno E7 aumentou a imunogenicidade deste antígeno, refletida no aumento da magnitude da resposta humoral E7-específica. Adicionalmente, a imunização com a proteína gDE7 coadministrada ao poly(I:C) produziu níveis significativos de anticorpos da subclasse IgG2c em relação aos outros grupos experimentais. O aumento dos níveis séricos de IgG2c, em conjunto com os resultados de produção de IFN- γ (**Figura 19C**), demonstrou que a coadministração do poly(I:C) à proteína gDE7 direcionou mais eficientemente a resposta E7-específica para o braço Th-1 da resposta imunológica.

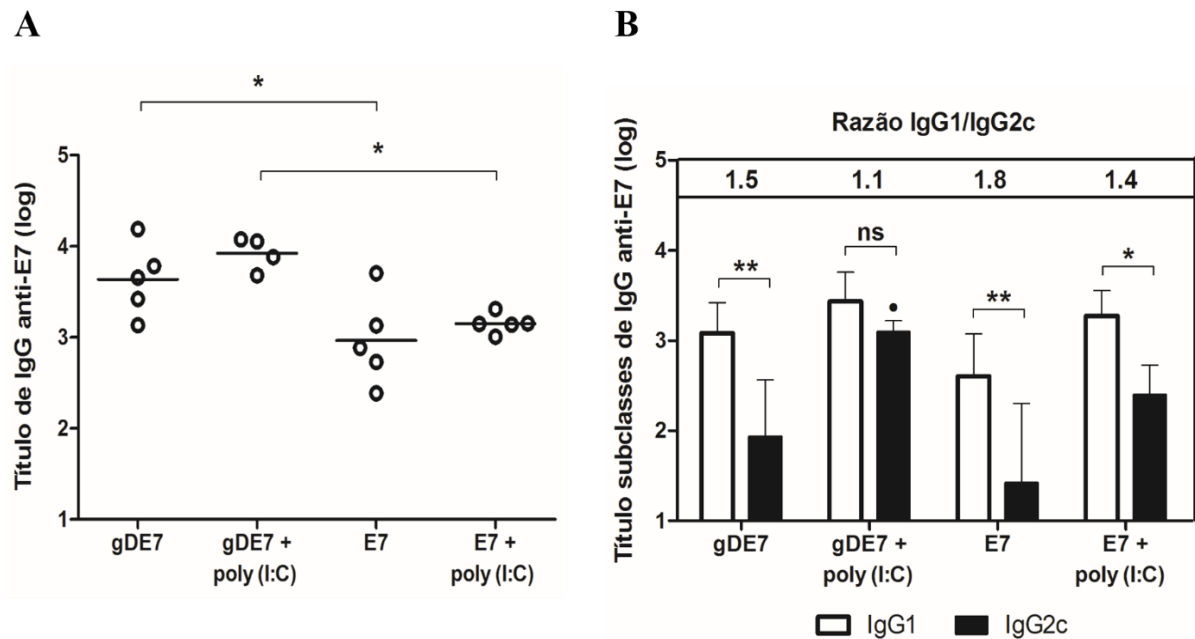


Figura 7. Resposta humoral sistêmica E7-específica desencadeada pela imunização com as proteínas gDE7 e E7 coadministradas ou não ao poly(I:C). (A) Títulos de IgG sistêmicos E7-específicos determinados 14 dias após a última dose do protocolo de imunização. Estão representados os valores médios dos títulos de IgG (linhas pretas) e individuais (círculos brancos) de cada grupo experimental. (B) Títulos de IgG1 e IgG2c sistêmicos E7-específicos. Os resultados representam a média dos títulos em \log_{10} de 4-5 camundongos por grupo \pm desvio padrão. Os valores basais médios de IgG total, IgG1 e IgG2c E7-específicos encontrados no grupo controle (imunizado somente com salina apirogênica) foram subtraídos dos valores dos grupos imunizados com os antígenos. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; • $p < 0.05$ versus todos os outros grupos experimentais em IgG2c; ns: estatisticamente não significativo. (ANOVA, post test: Bonferroni; Teste t).

4.3.2 Resposta imunológica celular E7-específica e proteção antitumoral terapêutica em camundongos imunizados pela via subcutânea com as proteínas gDE7 e E7 coadministradas ou não ao poly(I:C)

4.3.2.1 Efeito antitumoral terapêutico e ativação de respostas de linfócitos T $CD8^+$ E7-específicos

Para a avaliação do efeito antitumoral terapêutico das formulações vacinais e a ativação de linfócitos T $CD8^+$ E7 específicos, os camundongos foram desafiados com a linhagem tumoral TC-1 no dia 0 do regime vacinal e imunizados com quatro doses subcutâneas (dias 1, 8, 15 e 22 após o desafio) das formulações vacinais testadas. Foi observado, novamente, que a administração de quatro doses subcutâneas da proteína gDE7 conferiu proteção antitumoral terapêutica parcial (20%) aos camundongos desafiados com as células TC-1. Conforme demonstrado no experimento de escolha de adjuvantes, a coadministração da proteína gDE7 ao

poly(I:C) conferiu proteção antitumoral completa (100%) aos camundongos previamente desafiados com as células TC-1. Em contraste, a coadministração do antígeno E7 ao poly(I:C) protegeu somente 20% dos camundongos previamente desafiados com as células TC-1, mesmo após quatro doses de imunização. Nenhuma proteção antitumoral foi observada no grupo imunizado somente com o antígeno E7 (**Figura 8A**).

A proteção antitumoral terapêutica em modelo murino de tumores associados ao HPV-16 correlaciona com a ativação simultânea de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos produtores de IFN- γ (CHENG et al., 2003; LIU et al., 2007). Por este motivo, a dinâmica da resposta de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos, mediada pelas formulações vacinais, foi avaliada temporalmente a partir de amostras de sangue periférico, seis dias após cada dose de imunização. Conforme mostrado na **figura 8B**, a expansão da população de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos produtores de IFN- γ foi observada após a administração da segunda dose da formulação vacinal composta pela proteína gDE7 coadministrada ao poly(I:C), alcançando aproximadamente 3% do número total de linfócitos T CD8⁺. O mesmo fenômeno foi observado após a administração da segunda dose da formulação vacinal composta apenas pela proteína gDE7, mas em menor magnitude. Por outro lado, foram detectadas frequências muito baixas de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos produtores de IFN- γ nos camundongos imunizados com o antígeno E7 coadministrado ou não ao adjuvante poly(I:C). A expansão da população de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos, observada após a segunda dose das formulações compostas pela proteína gDE7, indicou que as últimas doses poderiam ser desnecessárias para a proteção antitumoral terapêutica, principalmente em camundongos imunizados com a proteína gDE7 coadministrada ao poly(I:C).

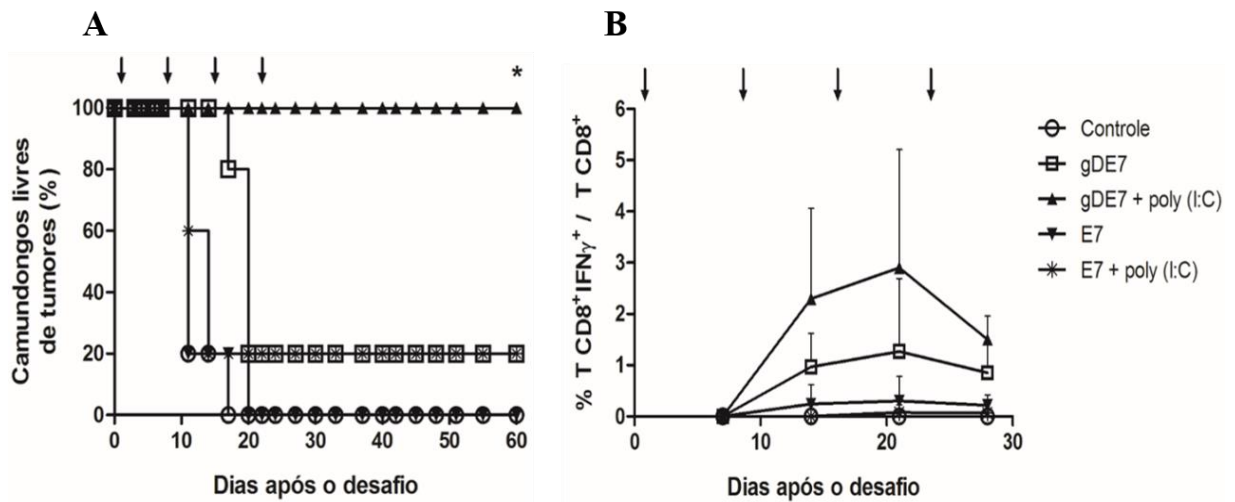


Figura 8. A imunização com a proteína gDE7 coadministrada ao poly(I:C) confere 100% de proteção antitumoral terapêutica e ativa linfócitos T CD8⁺ E7-específicos em camundongos desafiados com células TC-1. (A) Os camundongos foram desafiados no dia 0, imunizados com quatro doses subcutâneas contendo: 30µg da gDE7 ou 10µg da E7 coadministradas ou não a 50µg do adjuvante poly(I:C). Os camundongos foram acompanhados por 60 dias após o desafio para análise do crescimento tumoral. (B) As marcações de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos produtores de IFN- γ foram realizadas seis dias após cada dose de imunização, depois de 6-12 horas de re-estímulo *in vitro* com o peptídeo CD8-específico da proteína E7. As setas indicam quando ocorreram as imunizações. Os resultados representam a média de 5 camundongos por grupo \pm desvio padrão. * $p < 0.05$ versus todos os outros grupos experimentais. (Log-rank – Mantel Cox).

Guiados por esta evidência, avaliamos se duas doses subcutâneas (dias 1 e 8 após o desafio) da formulação vacinal composta pela proteína gDE7 coadministrada ao poly(I:C) seriam suficientes para conferir proteção antitumoral terapêutica completa aos camundongos desafiados com as células TC-1. Conforme demonstrado na **figura 9A**, não houve queda da proteção antitumoral terapêutica após duas doses subcutâneas da formulação vacinal gDE7 coadministrada ao poly(I:C), visto que todos os camundongos mantiveram-se livres de tumor até o final do período de acompanhamento. A diminuição para duas doses também não alterou os níveis de proteção antitumoral terapêutica mediada pela proteína gDE7 e pelo antígeno E7 coadministrado ao poly(I:C), mantendo parte dos camundongos desafiados livres de tumor (20%) até o final do período de acompanhamento. Nenhuma proteção antitumoral foi observada no grupo imunizado com duas doses do antígeno E7.

A dinâmica da resposta de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos induzida por duas doses das formulações vacinais testadas também foi avaliada temporalmente, seis dias após a primeira e a última dose e 13 e 20 dias após a última dose de imunização a partir de amostras de sangue periférico. A administração de duas doses da formulação vacinal contendo a proteína gDE7

coadministrada ao poly(I:C) elevou a frequência de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos nos camundongos imunizados, sendo a porcentagem média similar à desencadeada pela administração de quatro doses da mesma formulação vacinal (3%). A resposta E7-específica induzida por duas doses da formulação vacinal composta pela proteína gDE7 coadministrada ao poly(I:C) atingiu a magnitude máxima no 21º dia após o desafio e declinou ao final do período de observação (**Figura 9B**). A magnitude da resposta induzida pela proteína gDE7 isolada foi menor em relação à resposta induzida pela formulação vacinal composta pela gDE7 coadministrada ao poly(I:C). Foram detectadas frequências muito baixas de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos produtores de IFN- γ nos camundongos imunizados com o antígeno E7 coadministrado ou não ao poly(I:C).

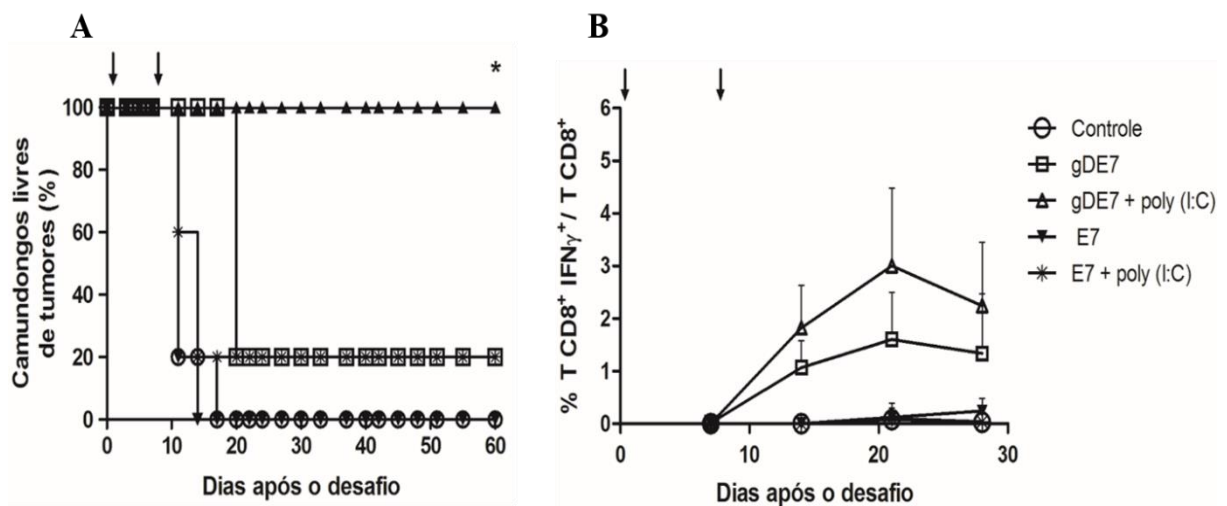


Figura 9. Duas doses da proteína gDE7 coadministrada ao poly(I:C) confere 100% de proteção antitumoral terapêutica e ativa linfócitos T CD8⁺ E7-específicos em camundongos desafiados com células TC-1. (A) Os camundongos foram desafiados no dia 0, imunizados com duas doses subcutâneas contendo: 30 μ g da gDE7 ou 10 μ g da E7 coadministradas ou não a 50 μ g do adjuvante poly(I:C). Os camundongos foram acompanhados por 60 dias após o desafio para análise do crescimento tumoral. (B) As marcações de linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN- γ a partir de amostras de sangue periférico foram realizadas seis dias após a primeira e a última dose e 13 e 20 dias após a última dose de imunização, depois de 6-12 horas de re-estímulo *in vitro* com o peptídeo CD8-específico da proteína E7. As setas indicam quando ocorreram as imunizações. Os resultados representam a média de 5 camundongos por grupo \pm desvio padrão. * $p < 0.05$ versus todos os outros grupos experimentais. (Log-rank – Mantel Cox)

Este conjunto de dados mostrou que a formulação vacinal composta pela proteína gDE7 coadministrada ao poly(I:C) protegeu completamente os camundongos do aparecimento do tumor. Em contraste, o antígeno E7 coadministrado ao poly(I:C) e a proteína gDE7 conferiram proteção antitumoral terapêutica parcial nos camundongos previamente desafiados (20%).

Desta forma, concluiu-se que a fusão genética da proteína gD ao antígeno E7 e a coadministração do adjuvante vacinal poly(I:C) atuaram de forma sinérgica no aumento da proteção antitumoral terapêutica observada. É importante destacar que, ao contrário da proteína gDE7, o antígeno E7 coadministrado ao poly(I:C) induziu frequências muito baixas de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos em ambas as condições experimentais (4 e 2 doses), mostrando a relevância da fusão da proteína gD ao antígeno E7 para a ativação da resposta de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos. Portanto, concluiu-se que a fusão genética da proteína gD ao antígeno E7 melhora a ativação da resposta de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos e a coadministração do poly(I:C) eleva a magnitude da resposta induzida. Finalmente, foi possível diminuir o número de doses de imunização (de 4 doses para 2 doses) sem que houvesse prejuízo na proteção antitumoral terapêutica, principalmente no grupo imunizado com a gDE7 coadministrada ao poly(I:C). É importante destacar ainda que apenas uma dose da proteína gDE7 coadministrada ao poly(I:C) protegeu 60% dos camundongos previamente desafiados com as células TC-1 (dados não mostrados). Por estas razões, todos os ensaios de imunização subsequentes foram realizados com 2 doses das formulações vacinais testadas.

O real impacto terapêutico da proteína gDE7 coadministrada ao poly(I:C) foi monitorado ao aumentar-se o intervalo entre o transplante das células TC-1 e a primeira dose vacinal, permitindo assim, que o tratamento ocorresse com pequenos tumores palpáveis estabelecidos ($\geq 4 \text{ mm}^2$). Os camundongos foram desafiados com as células TC-1 no dia 0 do regime vacinal e receberam a primeira dose vacinal nos dias 1, 3, 5, 7 ou 10 após o desafio. A dose de reforço foi administrada uma semana após a primeira dose. Como indicado na **figura 10**, a proteção antitumoral terapêutica foi mantida completa até o final do período de acompanhamento nos camundongos que receberam a primeira dose vacinal até 7 dias após o desafio com as células TC-1. A eliminação de pequenos tumores palpáveis ocorreu de forma mais evidente no grupo em que o intervalo entre o desafio e a primeira dose foi de 7 dias. No dia 18 após o desafio, 80% dos camundongos apresentavam tumores palpáveis ($\geq 4 \text{ mm}^2$), e por volta do dia 30, todos os camundongos já haviam eliminado estes tumores. A regressão tumoral coincidiu temporalmente com a expansão da resposta de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos (dados não mostrados). No entanto, o atraso de dez dias na administração da primeira dose em relação ao desafio reduziu a proteção antitumoral terapêutica para 40%.

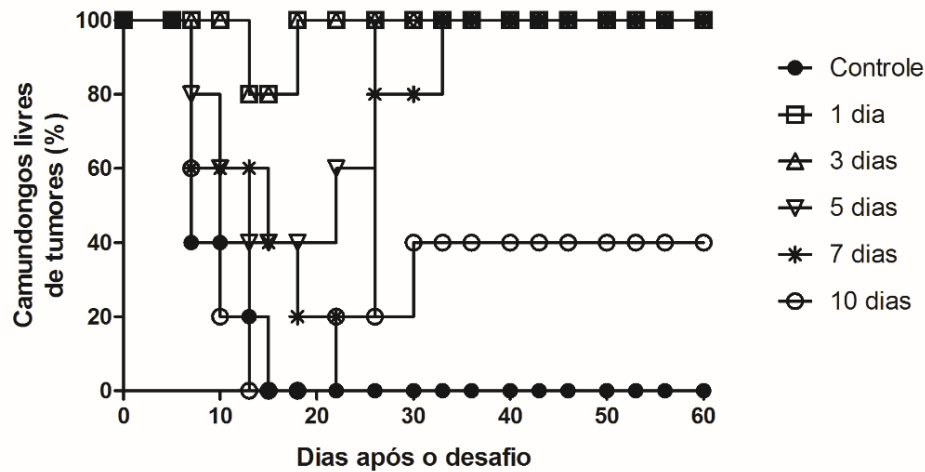


Figura 10. Duas doses da proteína gDE7 coadministrada ao poly(I:C) conferem proteção antitumoral terapêutica completa mesmo com o aumento do intervalo entre o desafio e a primeira dose. Os camundongos foram imunizados com duas doses vacinais da proteína gDE7 coadministrada ao poly(I:C) em diferentes intervalos após o desafio: 1, 3, 5, 7 e 10 dias. A dose de reforço foi administrada uma semana após a primeira dose. Os animais foram acompanhados por 60 dias após o desafio para análise do crescimento tumoral. (n=5 por grupo).

Não existem modelos ideais para o estudo de imunoterapias contra tumores que se estabelecem em humanos. Os modelos animais existentes não substituem os testes clínicos, mas são úteis no processo de entendimento das respostas imunológicas protetoras desencadeadas por imunoterapias. O modelo adotado neste trabalho baseia-se no uso de células TC-1 provenientes do epitélio pulmonar de camundongos C57BL/6, que expressam as oncoproteínas E6 e E7 do HPV-16 e são transformadas pelo gene c-Ha-ras mutado. Amplamente empregado, este modelo representa uma ferramenta fundamental para a demonstração do efeito de novas estratégias vacinais contra tumores associados ao HPV-16. No entanto, existem muitas limitações em relação ao processo tumoral observado em humanos. Por exemplo, ao contrário do que se observa em humanos nos quais os tumores apresentam desenvolvimento lento, cerca de 10 a 20 anos, o crescimento das células TC-1 em camundongos é bastante rápido e agressivo, visto que o tumor já se torna palpável entre 7-10 dias após a implantação destas células.

O microambiente promovido pelo estabelecimento do tumor dificulta o desencadeamento de uma resposta imune protetora, ou seja, quanto maior o intervalo entre o desafio e as doses, maior a dificuldade de visualização do efeito protetor e da resposta imunológica desencadeada por novos candidatos vacinais. Isso porque tumores estabelecidos conseguem modular a resposta imunológica pela secreção de citocinas regulatórias, recrutamento e expansão de células imunossupressoras, diminuição da expressão de moléculas

de MHC-I nas células tumorais e outros mecanismos a fim de favorecer a sua expansão (SWANN; SMYTH, 2007). Por esta razão, foi necessário manter um equilíbrio na extensão do intervalo para observarmos o efeito terapêutico da formulação em questão. Desta forma, decidiu-se manter os protocolos de imunização terapêuticos mais utilizados por nosso grupo de pesquisa e por outros grupos, variando o intervalo entre o desafio e a primeira dose do regime vacinal de 1 a 10 dias (CHUANG et al., 2010; DINIZ et al., 2010; DINIZ et al., 2013; KIMA et al., 2010; LASARO et al., 2005; PORCHIA et al., 2011; SEO et al., 2009; SHARMA et al., 2010).

O controle do crescimento de tumores maiores e em expansão se torna mais viável quando se consorcia outras substâncias à imunoterapia. Como exemplo, agentes quimioterápicos, como a cisplatina, oxiplatina e ciclofosfamida e substâncias imunomoduladoras, como anticorpos monoclonais anti-IL-10, anti-PD1/PD-L1 e anti-CTLA-4 e inibidores de angiogênese (DING et al., 2012).

4.3.2.2 Avaliação da atividade citotóxica dos linfócitos T CD8⁺ E7-específicos

A função efetora dos linfócitos T CD8⁺ E7-específicos induzidos pelas imunizações foi avaliada qualitativamente pela produção de IFN- γ e a expressão de CD107a (molécula relacionada ao processo de degranulação de linfócitos citotóxicos) simultaneamente em resposta ao re-estímulo *in vitro* do peptídeo CD8-específico da proteína E7. Para isto, os camundongos foram desafiados, imunizados com duas doses das formulações vacinais testadas (dias 1 e 8 após o desafio) e a marcação de IFN- γ intracelular e de CD107a de superfície foi realizada em células do baço dez dias após a administração da segunda dose do regime vacinal. Neste experimento foram analisados tanto o percentual de linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN- γ (**Figura 11A**) como o de linfócitos T CD8⁺ capazes de expressar simultaneamente a citocina IFN- γ e a molécula CD107a (**Figura 11B**), sendo estas populações consideradas como linfócitos T CD8⁺ E7-específicos ativados e com potencial efector, respectivamente.

Conforme já demonstrado, a imunização com a proteína gDE7 coadministrada ao poly(I:C) induziu frequências maiores de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos ativados em relação a outras formulações vacinais testadas (**Figura 11A**). Além disso, a maioria desses linfócitos ativados também expressou simultaneamente o marcador de degranulação CD107a (**Figura 11B**), evidenciando o potencial efector de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos. É importante

destacar a baixa frequência desta população de linfócitos nos camundongos imunizados com o antígeno E7 coadministrado ao poly(I:C), o que demonstra a importância da fusão genética da proteína gD ao antígeno E7 na indução de respostas de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos com potencial efector.

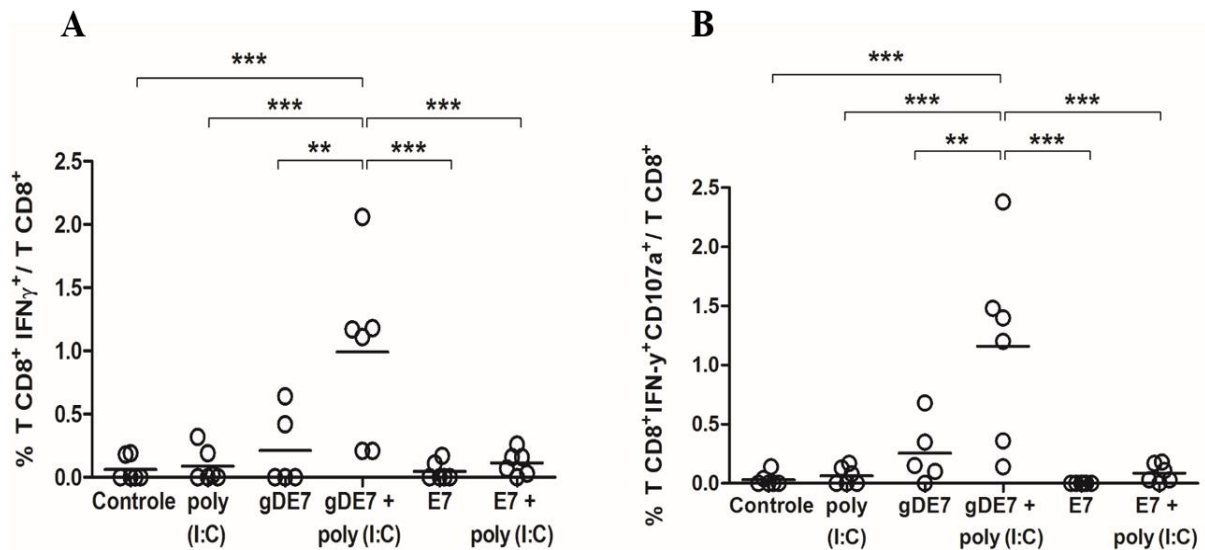


Figura 11. A imunização com a proteína gDE7 coadministrada ao poly(I:C) induz resposta de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos com potencial efector. (A) Porcentagem de linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN-γ e (B) porcentagem de linfócitos T CD8⁺ que produzem IFN-γ e expressam CD107a simultaneamente. As células do baço dos camundongos desafiados e imunizados foram recolhidas dez dias após a segunda dose vacinal (dia 18 após o desafio) e incubadas por 12h na presença do peptídeo CD8-específico da proteína E7 e do anticorpo monoclonal anti-CD107a de camundongo. Após o período de incubação os linfócitos foram marcados com anticorpos monoclonais para as moléculas CD8α e IFN-γ e então submetidos à citometria de fluxo. Os dados são representativos de dois experimentos independentes. ** p < 0.01 e *** p < 0.001 (ANOVA, post test: Bonferroni).

Ensaio de citotoxicidade *in vivo* foram realizados com o intuito de confirmar o perfil efector dos linfócitos T CD8⁺ E7-específicos gerados após a imunização com a proteína gDE7 coadministrada ao poly(I:C). Neste ensaio, células provenientes de camundongos não imunizados foram marcadas com concentrações distintas do corante CFSE. A população marcada com a maior concentração de CFSE também foi pulsada com o peptídeo CD8-específico da proteína E7, tornando-as células-alvo para lise mediada por linfócitos T CD8⁺ citotóxicos (CTLs). Células fracamente coradas com CFSE e que não foram pulsadas com o peptídeo CD8-específico da proteína E7 foram utilizadas como células-controle. Camundongos desafiados com as células TC-1 e imunizados com duas doses das formulações vacinais (dias 1 e 8 após o desafio) foram injetados de forma intravenosa com uma mistura de células-alvo/células-controle dez dias após a última dose vacinal. As células do baço dos camundongos

vacinados foram recolhidas 18 horas após a injeção e testadas para a diminuição da frequência das células-alvo, como medida indireta da atividade efetora de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos.

Conforme mostrado na **figura 12**, houve uma redução significativa na frequência das células-alvo nos camundongos imunizados com a proteína gDE7 coadministrada ao poly(I:C) (**Figura 12A**), resultado da forte atividade citotóxica dos linfócitos T CD8⁺ E7-específicos induzidos por esta formulação (**Figura 12B**). Em relação à proteína gDE7, a formulação vacinal composta pela gDE7 coadministrada ao poly(I:C) elevou em aproximadamente 2,5 X a geração de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos com atividade citotóxica (**Figura 12B**). Vale destacar também que pouca ou nenhuma atividade citotóxica foi detectada nos linfócitos T CD8⁺ E7 específicos de camundongos imunizados com o antígeno E7 isolado ou coadministrado ao poly(I:C). Portanto, concluiu-se que a fusão genética da proteína gD ao antígeno E7 e a coadministração do poly(I:C) atuaram de forma sinérgica na ativação dos linfócitos T CD8⁺ E7-específicos citotóxicos (efetores), resultado que corrobora os níveis de proteção antitumoral terapêutica observada em camundongos imunizados com duas doses da proteína gDE7 coadministrada ao poly(I:C).

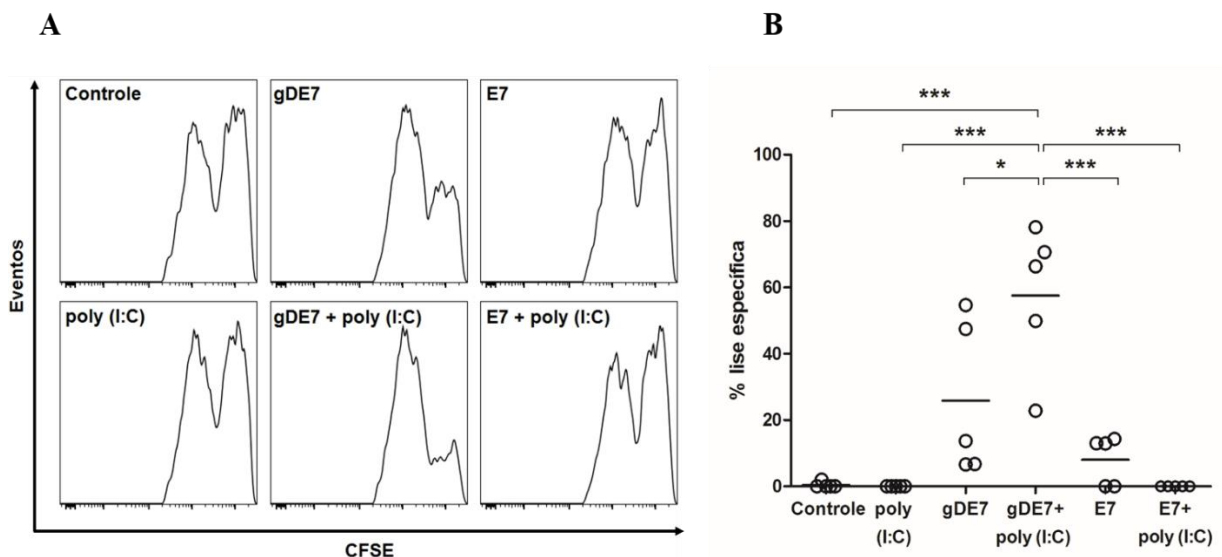


Figura 12. A imunização em esquema de *prime-boost* homólogo com a proteína gDE7 coadministrada ao poly(I:C) induz maior ativação de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos citotóxicos. (A) Atividade citotóxica *in vivo* de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos de camundongos desafiados e imunizados com duas doses (dias 1 e 8 após o desafio) das formulações vacinais testadas. Os histogramas do lado esquerdo dos painéis indicam as células-controles marcadas com 0.5 μ M CFSE. Os histogramas do lado direito dos painéis indicam as células-alvo marcadas com 5 μ M CFSE e pulsadas com o peptídeo CD8-específicos da proteína E7. A redução da área dos histogramas de células-alvo em relação às células controle indica a atividade citotóxica *in vivo* dos linfócitos T CD8⁺ E7 específicos. (B) Percentual de lise específica mediada pelos linfócitos TCD8⁺ E7-específicos em um total de 10^7

células-alvo. Os dados representam a média de cinco camundongos de um de dois experimentos independentes realizados com resultados semelhantes. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ (ANOVA, post test: Bonferroni).

4.3.2.3 Avaliação do perfil polifuncional dos linfócitos T CD8⁺ E7-específicos

Além da atividade citotóxica, a polifuncionalidade de linfócitos T CD8⁺ também está relacionada à rejeição de tumores em modelos murinos e em cânceres humanos (DE ROSA et al., 2004; KIM et al., 2014; PRECOPIO et al., 2007; RIZZUTO et al., 2009). Recentemente, foi sugerido que o desenvolvimento da resposta de linfócitos T CD8⁺ polifuncionais pode servir como biomarcador preditivo de eficácia clínica de vacinas terapêuticas contra lesões cervicais de alto-grau (KIM et al., 2014).

Duas semanas após a segunda dose, o perfil funcional dos linfócitos T CD8⁺ E7-específicos de camundongos desafiados e imunizados foi avaliado por citometria de fluxo multiparamétrica (**Figura 13A**). Conforme demonstrado nas **figuras 13B-D**, a imunização com a gDE7 coadministrada ao poly(I:C) induziu a produção de INF- γ , TNF- α e IL-2 mais eficientemente pelos linfócitos T CD8⁺ E7 específicos em relação às outras formulações vacinais testadas. Além disso, foi observada maior proporção de linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN- γ ou TNF- α do que linfócitos T CD8⁺ produtores de IL-2 neste grupo experimental (~1,2%, 1,1%, 0,4% respectivamente). Em relação ao grupo imunizado somente com a proteína gDE7, a imunização com a gDE7 coadministrada ao poly(I:C) elevou a frequência de linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN- γ ou TNF- α ou IL-2 em ~ 4X, 19X e 50X respectivamente (**Figuras 13B-D**). O efeito adjuvante da proteína gD na ativação de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos ficou mais uma vez em evidência. Ao comparar o grupo imunizado com a proteína gDE7 coadministrada ao poly(I:C) com o grupo que recebeu o antígeno E7 coadministrado ao poly(I:C), constatou-se que a frequência de linfócitos T CD8⁺ produtores de INF- γ ou TNF- α ou IL-2 era maior em ~ 3,5X, 4X e 7X respectivamente, no primeiro grupo. (**Figura 13B-D**).

Combinações foram geradas para análise de polifuncionalidade a partir da população de linfócitos T CD8⁺ respondedores ao re-estímulo *in vitro* com o peptídeo CD8-específicos da proteína E7 (**Figura 13E**). As imunizações com o adjuvante poly(I:C), com o antígeno E7, administrado sozinho ou coadministrado ao poly(I:C), induziram ativação de uma parcela significativa de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos produtores exclusivamente de IFN- γ (~ 93%, 48% e 41% respectivamente) (**Figura 13F**). Estudos *in vivo* já demonstraram que linfócitos T

produtores exclusivamente de IFN- γ possuem baixa capacidade de desenvolverem populações de memória (WU et al., 2002). Uma outra parcela dos linfócitos T CD8⁺ E7-específicos dos camundongos imunizados com o antígeno E7, administrado sozinho ou coadministrado ao poly(I:C), produziu exclusivamente TNF- α (~25% e 23% respectivamente). Em contraste, essas formulações vacinais induziram baixos níveis de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos produtores de IL-2. Portanto, esses resultados demonstram que as formulações vacinais compostas somente pelo adjuvante poly(I:C), pelo o antígeno E7, administrado sozinho ou coadministrado ao poly(I:C), induziram maior proporção de linfócitos que possuem apenas uma das três funções analisadas (93%, 75% e 67% respectivamente) (**Figura 13G**). É importante destacar que não foi possível fazer a análise *Boolean* do grupo controle devido à baixa frequência de linfócitos T CD8⁺ respondedores ao re-estímulo *in vitro* com o peptídeo CD8-específico da proteína E7. (**Figura 13E**).

Os camundongos imunizados com a proteína gDE7 administrada sozinha ou coadministrada ao poly(I:C) também apresentaram ativação de linfócitos T CD8⁺ produtores exclusivamente de IFN- γ , no entanto, a frequência destes linfócitos encontrada no segundo grupo foi significativamente menor (~51% e 25% respectivamente) (**Figura 13F**). Curiosamente, uma parcela relevante dos linfócitos T CD8⁺ E7-específicos dos camundongos imunizados com a gDE7 e o poly(I:C) produziram exclusivamente IL-2 (~20%). Por possuírem capacidade de proliferação, essas células representam uma fonte importante de geração de novos linfócitos T CD8⁺ E7-específicos. Além disso, alguns trabalhos já demonstraram o importante papel da IL-2 na diferenciação de linfócitos T CD8⁺ efetores (MANJUNATH et al., 2001; WENINGER et al., 2001) e na magnitude da resposta de linfócitos T efetores (TANIGUCHI; MINAMI, 1993).

A proteína gDE7 administrada sozinha ou coadministrada ao poly(I:C) induziu ativação de uma parcela importante de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos capazes de produzir simultaneamente as citocinas IFN- γ e TNF- α (~37% e 30% respectivamente), comparadas ao antígeno E7 administrado sozinho ou em associação ao poly(I:C) (~14% e 12% respectivamente) (**Figura 13F**). A produção simultânea de IFN- γ e TNF- α é uma característica de linfócitos T CD8⁺ de memória efetora / efetores, capazes de migrarem para tecidos periféricos e responderem ao encontro com o antígeno com funções efetoras imediatas (SALLUSTO; GEGINAT; LANZAVECCHIA, 2004; VAN DUIKEREN et al., 2012). Desta forma, a fusão da proteína gD ao antígeno E7 promoveu a ativação de linfócitos T CD8⁺ E7-

específicos com perfil funcional efetor e elevou a frequência de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos que apresentam pelo menos duas das três funções analisadas (~48%) (**Figura 13G**).

A coadministração do poly(I:C) às proteínas gDE7 e E7 resultou na ativação de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos produtores de IFN- γ , TNF- α e IL-2 simultaneamente (~8% e 4% respectivamente) (**Figura 13F-G**). Baseado em padrões funcionais, os linfócitos T CD8⁺ perdem progressivamente a capacidade de produzir IL-2 em função da diferenciação para linfócitos T efetores (LANZAVECCHIA; SALLUSTO, 2000; SALLUSTO et al., 1999). É possível que os linfócitos T CD8⁺ detentores das três funções analisadas estivessem em um estágio de diferenciação intermediário e, conforme mencionado anteriormente, poderiam representar uma fonte importante de geração de novos linfócitos T CD8⁺ E7-específicos efetores.

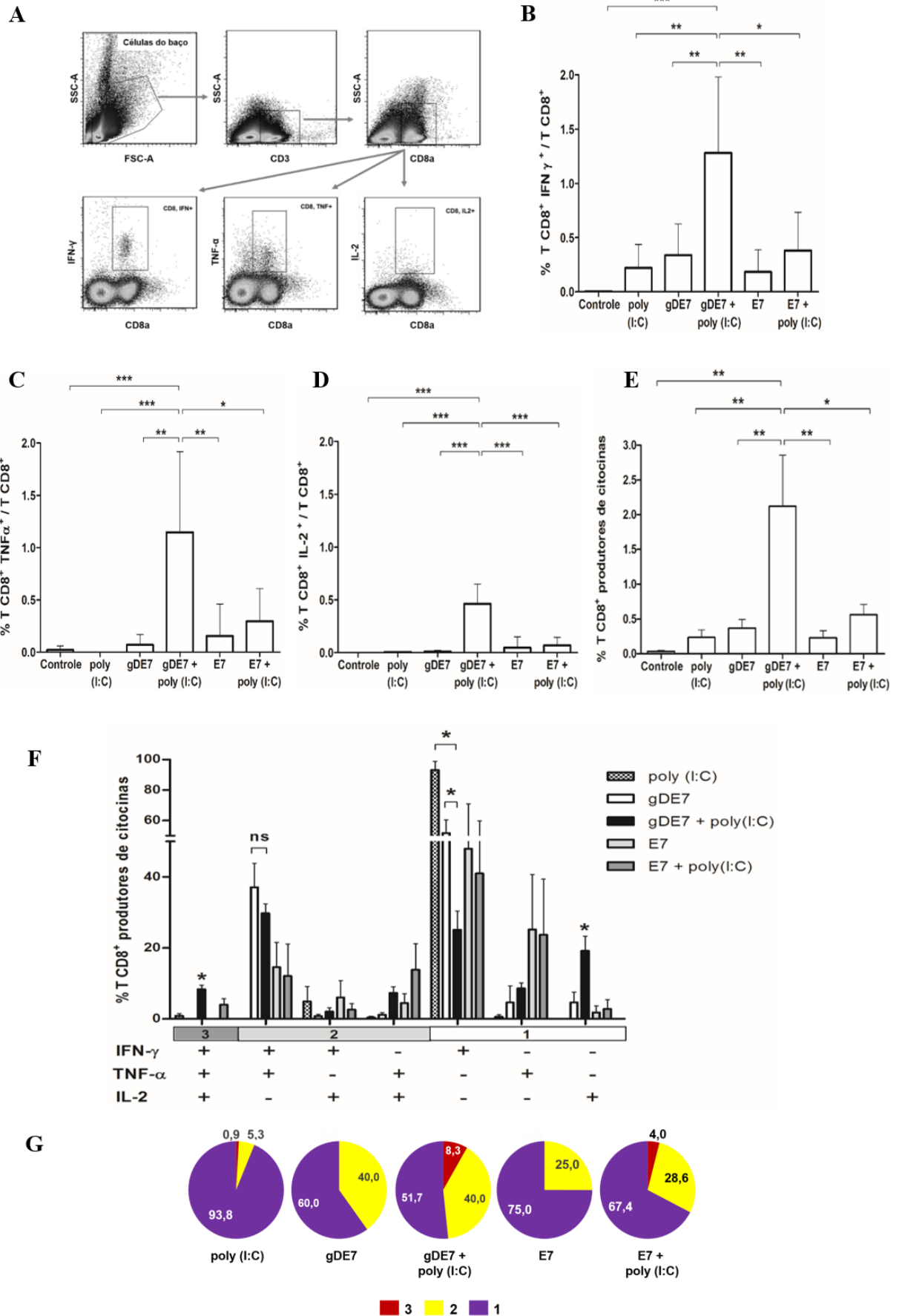


Figura 13. A imunização com a proteína gDE7 coadministrada ao poly(I:C) ativa maior proporção de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos polifuncionais. Os camundongos foram desafiados no dia 0 e imunizados com duas doses subcutâneas (dias 1 e 8 após o desafio) das formulações vacinais testadas. Duas semanas após a última dose vacinal, as células do baço foram colhidas e analisadas por citometria de fluxo. **(A)** Estratégia de citometria de fluxo multiparamétrica para determinação das frequências de linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN- γ , TNF- α e IL-2. As frequências de linfócitos T CD8⁺ que produzem IFN- γ **(B)** ou TNF- α **(C)** ou IL-2 **(D)** sobre o total de linfócitos T CD8⁺ foram avaliadas. **(E)** Porcentagem de linfócitos T CD8⁺ produtores de citocinas em resposta ao re-estímulo *in vitro* com o peptídeo CD8-específico da proteína E7 (linfócitos respondedores). As porcentagens de produção de citocinas foram calculadas subtraindo-se os valores das amostras não estimuladas. **(F)** Combinações *Boolean* de produção simultânea de IFN- γ , TNF- α e IL-2 pelos linfócitos T CD8⁺ E7-específicos dos camundongos imunizados (polifuncionais). * $p < 0.05$ quando não indicado, versus os outros grupos experimentais no parâmetro determinado. **(G)** Os gráficos de pizza representam a frequência relativa de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos de acordo com as combinações das funções efetoras analisadas. Os dados representam um de dois experimentos independentes realizados com resultados semelhantes. Os resultados estão apresentados como a média de 4-5 camundongos por grupo \pm desvio padrão. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. (ANOVA, post test: Bonferroni; Teste t).

4.3.2.4 Imunofenotipagem dos linfócitos T CD8⁺E7-específicos

Procedeu-se com a fenotipagem dos linfócitos T CD8⁺ ativados pelas formulações vacinais testadas neste estudo. Inicialmente, os linfócitos T CD8⁺ foram marcados com o dextrâmero de MHC classe I contendo o peptídeo CD8-específico da proteína E7, que permitiu a identificação dos linfócitos T CD8⁺ E7-específicos dentre a população total de linfócitos T CD8⁺ **(Figura 14A-B)**. Em seguida, o fenótipo de memória destas células foi determinado baseado na expressão do marcador de ativação CD44 e na expressão do receptor de *homing* para linfonodos em linfócitos, CD62L (GERBERICK et al., 1997; HARARI et al., 2006; OBAR et al., 2010; ROSA et al., 2011).

Os ensaios de imunofenotipagem dos linfócitos T CD8⁺ E7-específicos foram realizados a partir de células do baço dos camundongos desafiados e imunizados, duas semanas após a segunda dose de imunização, durante o pico da resposta específica primária. Corroborando os resultados de citotoxicidade *in vivo* **(Figura 12B)** e de polifuncionalidade **(Figura 13F-G)**, os camundongos imunizados com a proteína gDE7 isolada ou coadministrada ao poly(I:C) apresentaram frequências mais elevadas de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos com fenótipo CD44⁺CD62L^{low}, característico de memória efetora (T_{EM}) / efetor (~77% e 88% respectivamente) **(Figura 14A)**. A ausência da expressão da L-selectina CD62L nestes linfócitos faz com que esses circulem em tecidos periféricos onde podem encontrar o antígeno e responder com funções efetoras imediatas, como a produção de citocinas e moléculas citotóxicas. Em contraste, os camundongos imunizados com o antígeno E7 sozinho ou

coadministrado ao poly(I:C) apresentaram frequências maiores de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos com o fenótipo CD44⁺CD62L^{high}, característico de memória central (T_{CM}) (~51% para ambos) (**Figura 14A**).

Portanto, a fusão genética da proteína gD ao antígeno E7 favoreceu a mudança do fenótipo dos linfócitos T CD8⁺ E7-específicos para um fenótipo de memória efetora / efetor mais pronunciado, quando comparado ao antígeno E7. O emprego do adjuvante poly(I:C) promoveu o aumento da frequência dos T CD8⁺ E7-específicos com o fenótipo determinado pelo antígeno a ele coadministrado (**Figura 14C**).

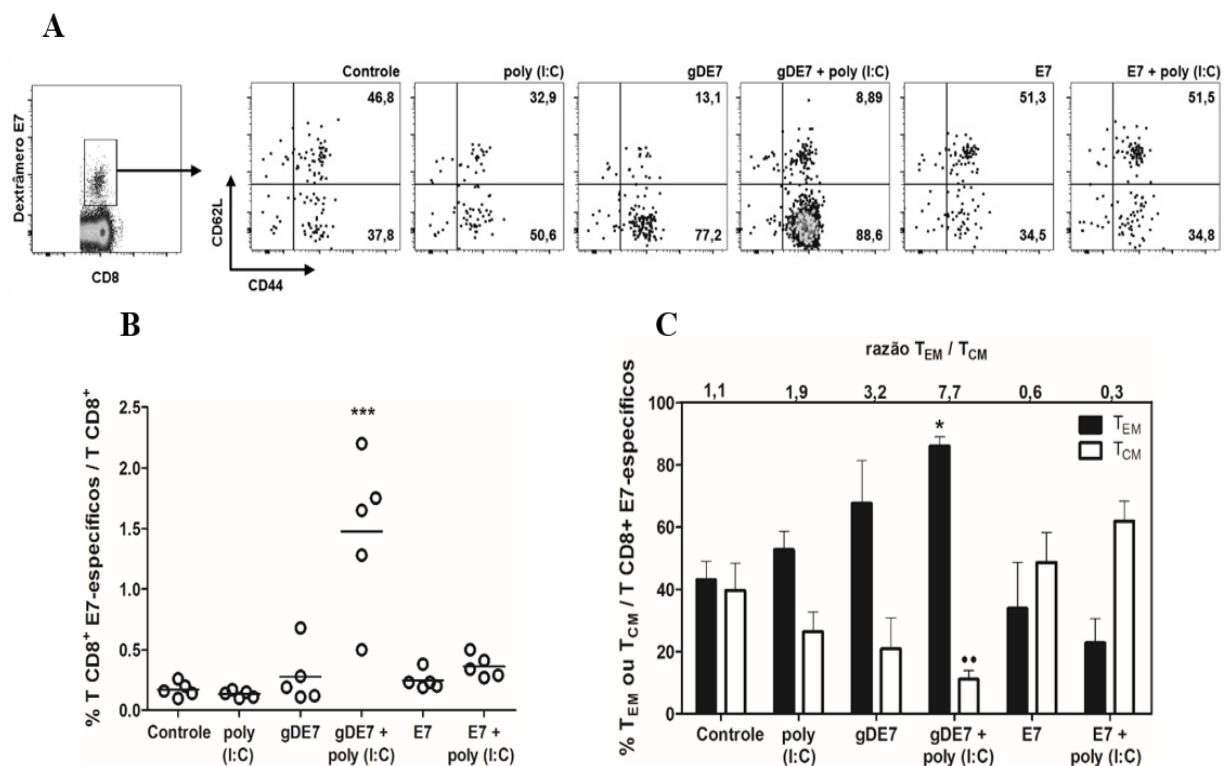


Figura 14. A imunização com a proteína gDE7 coadministrada ao poly(I:C) induz a ativação de linfócitos T CD8⁺ de memória efetora / efetores. Os camundongos foram imunizados com duas doses subcutâneas das proteínas gDE7 ou E7 misturadas ou não com poly(I:C) nos dias 1 e 8 após o desafio. As células do baço foram colhidas e analisadas por citometria de fluxo catorze dias após a última dose. **(A e B)** As células do baço dos camundongos foram marcadas com um dextrâmero de MHC-I contendo o peptídeo CD8-específico da proteína E7 e a frequência de linfócitos T CD8⁺ E7-específicas foi determinada. Em **(A)** estão representados os dados de um camundongo representativo de cada grupo. **(C)** Razão de linfócitos T CD8⁺ de memória efetora/efetores (CD44⁺CD62L^{low}) e memória central (CD44⁺ CD62L^{high}) de camundongos desafiados e imunizados com as diferentes formulações vacinais testadas. Os dados representam um de dois experimentos independentes realizados com resultados semelhantes. Os resultados apresentam a média de 5 camundongos por grupo \pm desvio padrão. * $p < 0.05$ versus todos os grupos em T_{EM}; ** $p < 0.01$ versus todos os grupos exceto gDE7 em T_{CM}; *** $p < 0.001$ versus todos os outros grupos. (ANOVA, post test: Bonferroni).

A oncoproteína E7 do HPV-16 possui uma meia-vida intracelular curta sendo rapidamente degradada via proteassomos (ROMAN; MUNGER, 2013; SMOTKIN; WETTSTEIN, 1987, VALDOVINOS-TORRES et al., 2008). Essa observação sugere que pode haver pouca apresentação do antígeno E7 pelas células dendríticas para linfócitos T CD8⁺. Além disso, o antígeno E7 possui similaridade com proteínas humanas envolvidas em vários processos regulatórios (NATALE et al., 2000). Essa similaridade é base para um dos mecanismos de tolerância utilizados por antígenos tumorais para escapar do reconhecimento de linfócitos T efetores antígeno-específicos.

De acordo com o “modelo de diferenciação progressiva” (LANZAVECCHIA; SALLUSTO, 2002; SALLUSTO; GEGINAT; LANZAVECCHIA, 2004), a intensidade e/ou duração da interação do TCR de linfócitos T com a molécula de MHC/peptídeo em células dendríticas tem papel importante na diferenciação de linfócitos efetores. Esse modelo propõe que os linfócitos T em proliferação recebem diferentes níveis de estímulo (quantidade de antígeno, coestímulo e citocinas) e, conseqüentemente, atingem diferentes níveis de diferenciação. Estudos *in vitro* corroboraram com este modelo ao mostrarem que linfócitos T CD4⁺ ativados por um estímulo fraco proliferam, mas não possuem função efetora. Após transferência *in vivo*, esses linfócitos migram para os órgãos linfóides secundários onde proliferam em resposta ao contato com o antígeno (IEZZI; SCHEIDEGGER; LANZAVECCHIA, 2001). Portanto, os linfócitos em estágios intermediários de diferenciação induzido por fraca estimulação dão origem aos linfócitos T de memória central (T_{CM}). Em contraste, linfócitos T CD4⁺ ativados por estímulo intenso diferenciam em linfócitos T CD4⁺ efetores e, após transferência *in vivo*, são excluídos dos órgãos linfóides e migram para tecidos inflamados (IEZZI; SCHEIDEGGER; LANZAVECCHIA, 2001). Ainda de acordo com o “modelo de diferenciação progressiva”, após a fase aguda alguns desses linfócitos efetores permanecem como linfócitos T de memória efetora (T_{EM}). Outros estudos também demonstraram que a ativação *in vitro* de linfócitos T CD8⁺ com razão elevada de células dendríticas e linfócitos T direciona a geração de linfócitos T CD8⁺ com fenótipo de memória efetora / efetor. Por outro lado, a baixa razão de células dendríticas e linfócitos T tende a gerar linfócitos T CD8⁺ com fenótipo de memória central (GETT et al., 2003; LANGENKAMP et al., 2002).

Coletivamente, essas evidências ajudam a explicar a baixa imunogenicidade do antígeno E7 sozinho bem como sua menor capacidade de gerar linfócitos T CD8⁺ E7-

específicos com fenótipo efetor. É possível que a fusão genética da proteína gD ajudou a aumentar a estabilidade intracelular do antígeno E7 e conseqüentemente, melhorou o processamento e a apresentação deste para linfócitos T CD8⁺. Portanto, a fusão da gD ao antígeno E7 melhorou a ativação dos linfócitos T CD8⁺ E7-específicos com fenótipo efetor e o poly(I:C) ampliou a magnitude da resposta induzida.

4.3.2.5 Contribuição dos subtipos de linfócitos T na proteção antitumoral mediada pela proteína gDE7 coadministrada ao poly(I:C)

Está bem estabelecido que os linfócitos T CD4⁺ *helper* têm papel importante no desenvolvimento de respostas de linfócitos T CD8⁺ citotóxicos (JANSEN et al., 2003; SUN; BEVAN, 2003). Os linfócitos T CD4⁺ *helper* atuam no “licenciamento” de células dendríticas resultando no aumento da expressão de moléculas coestimuladoras e de citocinas inflamatórias importantes para a ativação de linfócitos T CD8⁺ citotóxicos (BEVAN, 2004; WILLIAMS; BEVAN, 2007). Na clínica, o desenvolvimento da resposta de linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ (polarizada para Th-1) está associado à regressão e à melhora de neoplasias cervicais bem como à eliminação do HPV (DE JONG et al., 2002; KIM et al., 2014; STEELE et al. 2005). Muitas estratégias vacinais falharam em desenvolver resposta ampla e homogênea de linfócitos T CD8⁺ pela falta de uma resposta robusta de linfócitos T CD4⁺ (BALDWIN et al., 2003; BORYSIEWICZ et al., 1996; DAVIDSON et al., 2004; FRAZER et al., 2004; KAUFMANN et al., 2002). Entretanto, no modelo murino de tumores associados ao HPV-16 baseado em células TC-1, pesquisas demonstraram que a resposta de linfócitos T CD8⁺ induzida por diversas formulações vacinais independe da ajuda de linfócitos T CD4⁺ (BARRIOS; CELLIS, 2012; CHU et al., 2000; LIU et al., 2007). Por isso, avaliamos o papel dos linfócitos T CD4⁺ no desenvolvimento da resposta antitumoral mediada pela formulação vacinal composta pela proteína gDE7 coadministrada ao poly(I:C).

Conforme já demonstrado, a coadministração da proteína gDE7 ao poly(I:C) conferiu proteção antitumoral terapêutica completa a camundongos C57BL/6 selvagens, além de induzir resposta robusta de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos (**Figura 9A-B**). Para determinar a contribuição dos subtipos de linfócitos T na proteção antitumoral observada, camundongos C57BL/6 selvagens e *knockouts* (KO) para linfócitos T CD4⁺ (CD4 KO) e linfócitos T CD8⁺ (CD8 KO) (**Figura 15A**) foram imunizados com duas doses das formulações vacinais testadas (dias 1 e 8 após o desafio). Novamente, duas doses da proteína gDE7 coadministrada ao

poly(I:C) conferiram proteção antitumoral completa nos camundongos C57BL/6 selvagens. Resultado semelhante foi obtido nos camundongos C57BL/6 CD4 KO imunizados com a proteína gDE7 e o poly(I:C) (**Figura 15B**). É interessante notar que parte dos camundongos foram considerados com tumores no início do período de acompanhamento, no entanto, o crescimento tumoral foi controlado até a completa regressão dos mesmos. Ao final do período de acompanhamento, todos os camundongos C57BL/6 CD4 KO desafiados estavam livres de tumores. Nenhuma proteção antitumoral terapêutica foi observada nos camundongos C57BL/6 CD4 KO imunizados com o poly(I:C), com as proteínas gDE7 e E7 isoladas bem como com a proteína E7 coadministrada ao poly(I:C) (dados não mostrados). Em contraste, duas doses da proteína gDE7 coadministrada ao poly(I:C) não protegeu os camundongos C57BL/6 CD8 KO previamente desafiados com as células TC-1 (**Figura 15B**). Nenhuma proteção antitumoral terapêutica foi observada nos camundongos C57BL/6 CD8 KO imunizados com o poly(I:C), com as proteínas gDE7 e E7 isoladas bem como com a proteína E7 coadministrada ao poly(I:C) (dados não mostrados). Portanto, estes resultados apontam que os linfócitos T CD8⁺ têm papel fundamental na resposta antitumoral induzida pela formulação vacinal gDE7 coadministrada ao poly(I:C). E ainda, os linfócitos T CD4⁺ não exercem papel relevante para a função efetora dos linfócitos T CD8⁺ E7-específicos em modelo murino de tumores associados ao HPV-16, visto que esses linfócitos possuem magnitude suficiente para o controle do crescimento tumoral.

Recentemente, Hervas-Stubbs et al. (2007) demonstraram que a sinalização via TLR3 em células dendríticas promove a diferenciação de linfócitos T CD8⁺ efetores na ausência de linfócitos T CD4⁺ *helper*. Desta forma, a sinalização poly(I:C) / TLR3 poderia substituir o papel dos linfócitos T CD4⁺ na indução da resposta de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos efetores, e consequentemente na proteção antitumoral terapêutica em camundongos CD4 KO. No entanto, em nossas condições experimentais, a proteção antitumoral terapêutica foi observada somente nos camundongos CD4 KO imunizados com a gDE7 e o poly(I:C) e não com a E7 e o poly(I:C), sugerindo que o efeito adjuvante da proteína gD se sobrepõe ao do poly(I:C) na ativação resposta de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos efetores também em camundongos CD4 KO .

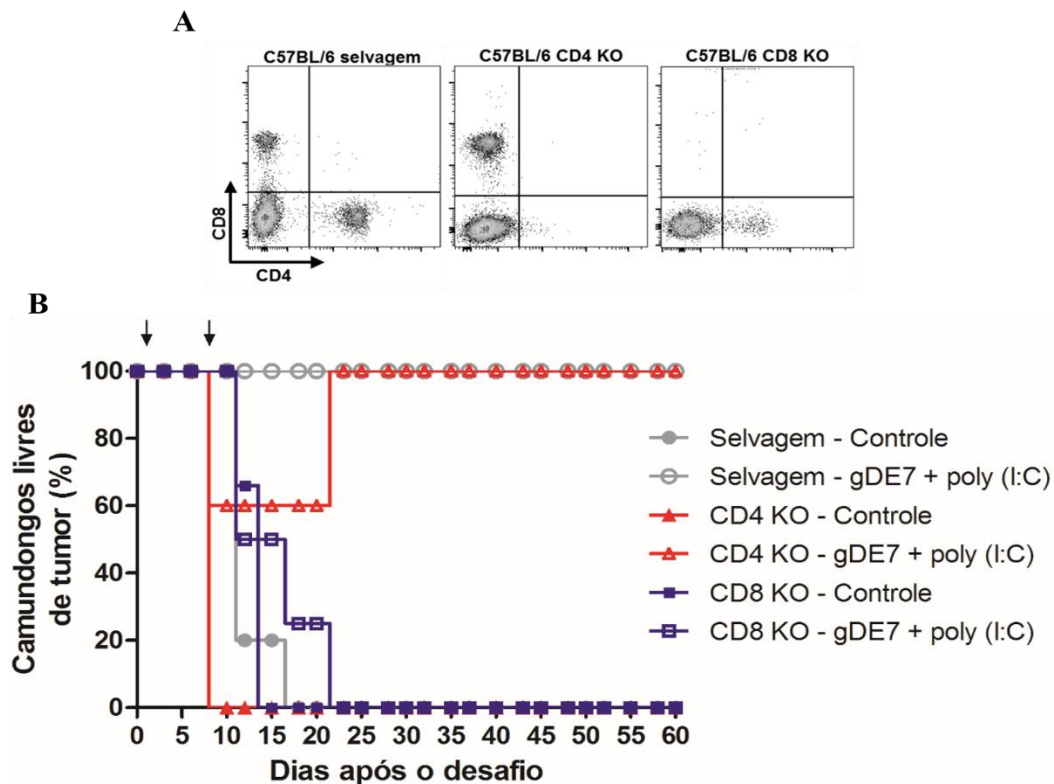


Figura 15. A proteção antitumoral terapêutica induzida pela imunização com a proteína gDE7 coadministrada ao poly(I:C) é independente de linfócitos T CD4⁺ helper e dependente de linfócitos T CD8⁺. (A) A análise por citometria de fluxo de amostras de sangue periférico confirmou a ausência de linfócitos T CD4⁺ ou T CD8⁺ em camundongos CD4 KO (painel central) ou CD8 KO (painel direito) respectivamente, em comparação aos camundongos selvagens (painel esquerdo). (B) Camundongos selvagens, CD4 KO e CD8 KO foram desafiados com $7,5 \times 10^4$ células TC-1 e imunizados com duas doses subcutâneas (dias 1 e 8 após o desafio) das formulações vacinais testadas para determinar a contribuição de subtipos de linfócitos T na proteção antitumoral. As setas pretas indicam as duas doses de imunização. Os camundongos foram acompanhados durante 60 dias após o desafio para avaliação do crescimento tumoral. Os dados representam um de dois experimentos independentes realizados com resultados semelhantes ($n = 5$ por grupo).

4.3.2.6 Avaliação da presença de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos no microambiente tumoral

Além da resposta sistêmica de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos, a resposta antitumoral no local do tumor, traduzida pela infiltração de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos para o microambiente tumoral, também foi avaliada. Nesses experimentos, os camundongos foram desafiados com $7,5 \times 10^4$ células TC-1 diluídas em matrigel. O matrigel apresenta-se em consistência líquida a 0^o C, no entanto, quando inoculado pela via subcutânea (37 °C), forma uma matriz gelatinosa que contém as células tumorais e células do sistema imune que migram para o local. Desta forma, mesmo nos camundongos imunizados em que o tumor não se desenvolve, é possível analisar os tipos celulares do sistema imune que infiltram a matriz em

resposta à inoculação das células TC-1. Os camundongos desafiados com as células TC-1/matrigel receberam duas doses das formulações vacinais testadas (dias 1 e 8 após o desafio) e foram eutanasiados 4 dias após a segunda dose. Os tumores/matrigel foram retirados cirurgicamente, digeridos com colagenase D e as células infiltradas foram analisadas por citometria de fluxo.

É importante destacar que o matrigel inoculado isoladamente, sem células TC-1, não induziu a infiltração de linfócitos T CD8⁺ para a matriz (**Figura 16A**). Desta forma, concluiu-se que a migração desses linfócitos se deve principalmente pela presença das células tumorais na matriz. Conforme comentado anteriormente, a proteção antitumoral terapêutica no modelo murino de tumores associados ao HPV-16 correlaciona com a ativação simultânea de resposta de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos. Os camundongos imunizados com a proteína gDE7 coadministrada ao poly(I:C) apresentaram infiltração significativa de linfócitos T CD8⁺ para o microambiente tumoral (~5%) em relação às outras formulações vacinais testadas (**Figura 16B**).

Para determinar a proporção de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos infiltrados no microambiente, as células dos tumores/matrigel dos camundongos imunizados com a gDE7, a gDE7 coadministrada ao poly(I:C) e a E7 coadministrada ao poly(I:C) também foram marcadas com o dextrâmero de MHC-I contendo o peptídeo CD8-específico da proteína E7. Assim, foi possível observar que nos tumores/matrigel dos camundongos imunizados com a gDE7 coadministrada ao poly(I:C), aproximadamente 80% dos linfócitos T CD8⁺ infiltrados eram linfócitos T CD8⁺ E7-específicos (**Figura 16C**). Essa proporção caiu para aproximadamente 45% e 30% nos tumores/matrigel implantados em camundongos imunizados com a proteína gDE7 sozinha e o antígeno E7 coadministrado ao poly(I:C), respectivamente.

De acordo com os resultados de imunofenotipagem (**Figura 14**), a maioria dos linfócitos T CD8⁺ E7-específicos ativados pela imunização com a proteína gDE7 isolada ou coadministrada ao poly(I:C), possuíam fenótipo de memória efetora / efetor (77% e 88% respectivamente). Ou seja, esses linfócitos possuíam maior capacidade de circulação em regiões periféricas onde poderiam encontrar o antígeno e responder com funções efetoras. Desta forma, as proporções elevadas de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos infiltrados nos tumores/matrigel de camundongos imunizados com a gDE7 isolada (~45%) ou a gDE7 coadministrada ao poly(I:C) (~80%) corroboram os resultados de imunofenotipagem destes linfócitos. Embora experimentos que comprovem a função efetora dos linfócitos T CD8⁺ E7-específicos infiltrados nos tumores/matrigel não tenham sido realizados, podemos sugerir indiretamente que esses

linfócitos possuem função efetora. A infiltração significativa de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos para o microambiente tumoral nos camundongos imunizados com a proteína gDE7 coadministrada ao poly(I:C) (**Figura 16B**) também corrobora a proteção antitumoral terapêutica completa observada em camundongos imunizados com esta formulação vacinal (**Figuras 9A e 10**).

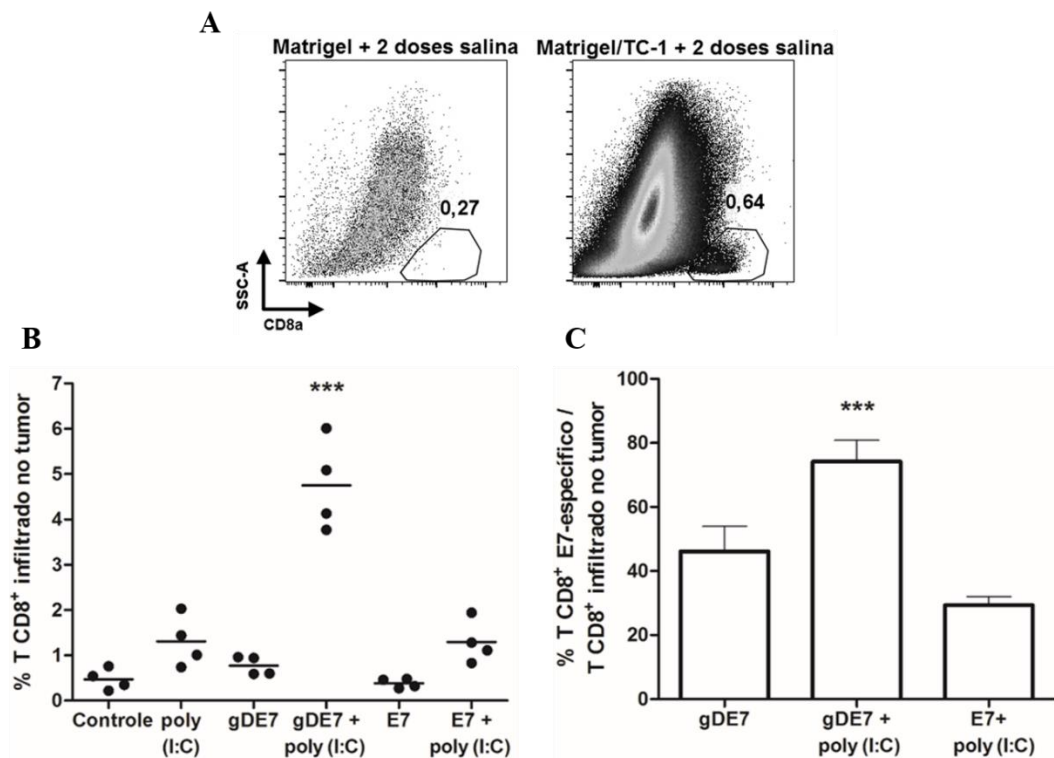


Figura 16. A imunização com a proteína gDE7 coadministrada ao poly(I:C) induz infiltração significativa de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos para o microambiente tumoral. Camundongos C57BL/6 foram desafiados com $7,5 \times 10^4$ células TC-1 suspensas em matrigel e receberam duas doses (dias 1 e 8 após o desafio) das formulações vacinais testadas. Quatro dias após a última dose, os camundongos foram eutanasiados e os tumores/matrigel foram retirados para análise de microambiente tumoral por citometria de fluxo. **(A)** A migração de linfócitos para a matriz depende da presença das células TC-1 e não do matrigel. **(B)** Frequências de linfócitos T CD8⁺ infiltrados nos tumores. **(C)** As células recuperadas dos tumores/matrigel de camundongos imunizados com a proteína gDE7, com a gDE7 coadministrada ao poly(I:C) e com a E7 coadministrada ao poly(I:C) também foram marcadas com o dextrâmero de MHC-I contendo o peptídeo CD8-específico da proteína E7. Desta forma, o percentual de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos dentre os linfócitos T CD8⁺ infiltrados nos tumores foi determinado. Os resultados representam a média de 4 camundongos por grupo \pm desvio padrão. *** $p < 0.001$ versus todos os outros grupos. (ANOVA, post test: Bonferroni).

4.3.2.7 Efeito das imunizações sobre células imunossupressoras

Tumores sólidos são compostos por diversos tipos celulares (células tumorais, células endoteliais, inflamatórias, fibroblastos) bem como componentes acelulares (citocinas, mediadores inflamatórios e matriz extracelular). No microambiente tumoral, esses elementos podem induzir angiogênese, inativar respostas antitumorais mediadas por células T, e também promover a proliferação e sobrevivência das células tumorais (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Vários estudos mostraram a infiltração de macrófagos e linfócitos em lesões cervicais induzidas pelo HPV (HAMMES et al., 2007; KOBAYASHI et al., 2008). Mulheres com lesões cervicais assintomáticas apresentam maior proporção de linfócitos T sistêmicos polarizados para Th-1, enquanto mulheres com câncer cervical apresentam também linfócitos T regulatórios (WELTERS et al., 2006). Portanto, a razão entre linfócitos T respondedores e T regulatórios sistêmicos ou no microambiente tumoral é um bom marcador preditivo de progressão do câncer cervical (PIERSMA et al., 2007). Van der Burg et al. (2007) reportaram recentemente a existência de linfócitos T regulatórios (T CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺) específicos para as oncoproteínas do HPV-16 em pacientes com câncer cervical. A capacidade imunossupressora desses linfócitos depende principalmente da ativação mediada pelas oncoproteínas do HPV-16 e da interação desses linfócitos com linfócitos T efetores (VAN DER BURG et al., 2007). Como as oncoproteínas E6 e E7 do HPV-16 são expressas constitutivamente em lesões pré-malignas e tumores estabelecidos, esses sítios podem representar uma fonte de antígenos para a ativação dos linfócitos T regulatórios. Esses linfócitos T regulatórios presentes na interface entre o tumor e o sistema imune (linfonodos drenantes e tecidos tumorais) são capazes de bloquear a proliferação e suprimir a produção de citocinas em linfócitos efetores e, desta forma, promoverem o desenvolvimento de tumores imunogênicos em pacientes que não conseguem montar uma resposta antitumoral eficiente (VAN DER BURG et al., 2007).

Pelo fato destes linfócitos dependerem da presença das oncoproteínas E6 e E7 do HPV-16 para exercerem sua função imunossupressora, existe a possibilidade de que as imunoterapias contra o câncer cervical também resultem na expansão de linfócitos T regulatórios. Esse fenômeno foi observado na imunoterapia baseada em peptídeos sintéticos longos derivados das oncoproteínas E6 e E7 do HPV-16 (WELTERS et al., 2008). Pacientes que tiveram o câncer cervical removido cirurgicamente foram imunizados com os peptídeos longos das oncoproteínas E6 e E7 e desenvolveram resposta ampla de linfócitos T CD4⁺ e

TCD8⁺ efetores. No entanto, também houve expansão de linfócitos T regulatórios (T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) E6/E7 específicos em todos os pacientes imunizados, sugerindo que estratégias que desarmem essa população de linfócitos T devem ser consideradas em imunoterapias contra tumores associados ao HPV-16.

Em nossas condições experimentais, a análise dos linfócitos T regulatórios foi realizada em camundongos desafiados e imunizados com as formulações vacinais nos dias 1 e 8 após o implante das células TC-1. Catorze dias após a última dose de imunização, os camundongos foram eutanasiados e os linfócitos T provenientes do baço foram mantidos em cultura em contato com 10 µg/ml da proteína E7 durante 5 dias, o que permitiu a expressão estável de Foxp3 pelos linfócitos T CD4⁺ (BOLPETTI et al., 2010; VAN DER BURG et al., 2007; WELTERS et al., 2008) (**Figura 17A**). Os camundongos imunizados com o antígeno E7 coadministrado, ou não, ao poly(I:C) apresentaram frequências maiores de linfócitos T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (~ 12% e 11% respectivamente) em relação aos camundongos tratados com a gDE7 administrada com ou sem o poly(I:C) (~ 4% e 2,5% respectivamente) (**Figura 17B**). Possivelmente, a ausência da resposta E7-específica efetora nos grupos controle, poly(I:C), E7 e E7 coadministrada ao poly(I:C) favorece o desenvolvimento do tumor que por sua vez, induz maior proliferação dos linfócitos T regulatórios. Por outro lado, a ativação de linfócitos T CD8⁺ E7 específicos de memória efetora / efetores (**Figuras 14A-C**) nos camundongos imunizados com a formulação vacinal gDE7 coadministrada ao poly(I:C) controla o desenvolvimento do tumor e conseqüentemente a proliferação de linfócitos T regulatórios .

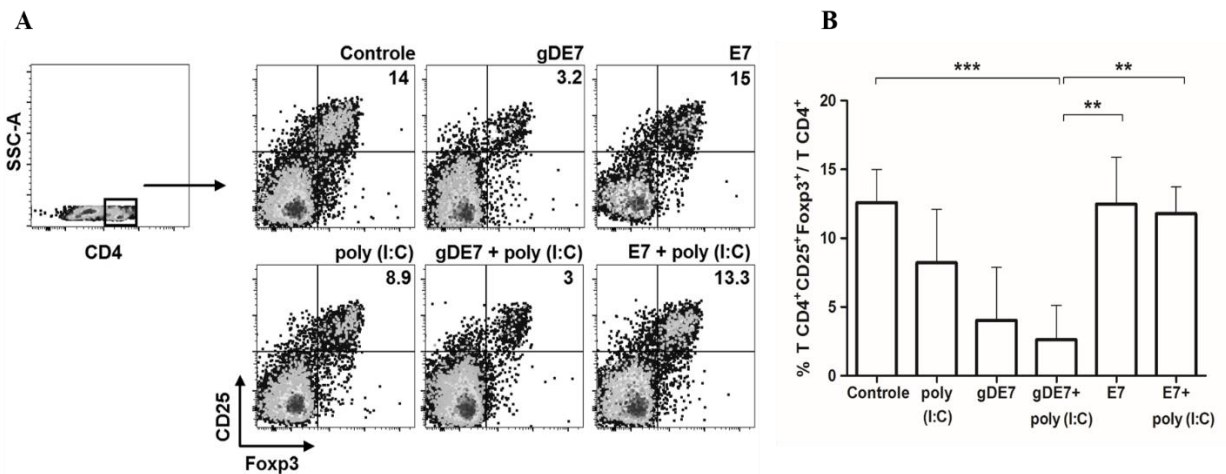


Figura 17. Efeito das imunizações em linfócitos T regulatórios sistêmicos em camundongos desafiados com as células TC-1. Para a análise de linfócitos T regulatórios, as células do baço de camundongos desafiados e imunizados foram colhidas catorze dias após a segunda dose e mantidas em cultura com 10 µg/ml da proteína E7 do HPV-16 durante 5 dias. Após este período, a frequência de linfócitos T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ dentre os linfócitos T CD4⁺ foi quantificada por citometria de fluxo. **(A)** Os *dot plots* demonstram os resultados de um camundongo representativo de cada grupo experimental. **(B)** Frequências de linfócitos T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ quantificadas após 5 dias de cultura em contato com o antígeno E7. Os resultados representam a média de 5 camundongos por grupo ± desvio padrão. Os dados representam um de dois experimentos independentes realizados com resultados semelhantes. ** p < 0.01 e *** p < 0.001. (ANOVA, post test: Bonferroni).

Além dos linfócitos T regulatórios, células mielóides com fenótipo imaturo e supressor (*Myeloid-derived suppressor cells* – MDSCs) também proliferam nos órgãos linfóides e tecidos tumorais em resposta a citocinas e outros fatores secretados por tumores em desenvolvimento (CHANG et al., 2014; KUSMARTSEV; GABRILOVICH, 2002; STONE et al., 2014; WILCOX, 2010). As MDSCs interferem na imunidade antitumoral pela inibição da atividade efetora de células NK, linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺, além de promoverem a expansão de linfócitos T regulatórios (BRONTE et al., 2001; GABRILOVICH, 2004; SINHA et al., 2005). Conseqüentemente, a proliferação e o acúmulo dessas células nos órgãos linfóides e tecidos tumorais contribuem para o desenvolvimento e progressão de diversos tumores, incluindo os tumores cervicais (STONE et al., 2014).

Em camundongos, as MDSCs são amplamente caracterizadas pela expressão de CD11b e Gr-1 (YOUN et al., 2011). Recentemente, foi observado pelo nosso grupo uma correlação linear positiva entre o aumento do volume tumoral e o aumento frequência de células Gr-1⁺ em baço de camundongos transplantados com células TC-1. Além disso, a depleção destas células com anticorpo monoclonal anti-Gr-1 associada à imunização ativa, resultou na indução de forte ativação de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos, além de conferir proteção

antitumoral terapêutica completa aos camundongos imunizados. (DINIZ et al., em fase de elaboração). Levando em consideração que o desenvolvimento do tumor influencia positivamente na expansão sistêmica destas células, e que uma das formulações vacinais testadas durante este estudo controla eficazmente o desenvolvimento de tumores, decidiu-se avaliar o impacto das formulações vacinais na frequência de MDSCs sistêmicas em camundongos previamente desafiados.

Para a análise das MDSCs, os camundongos foram desafiados com as células TC-1 e imunizados com duas doses das formulações vacinais testadas (dias 1 e 8 após o desafio). Catorze dias após a última dose vacinal as frequências das MDSCs presentes no baço dos camundongos foram avaliadas. Conforme ilustrado na **figura 18A-B**, os camundongos imunizados com a proteína gDE7 coadministrada ao poly(I:C) apresentaram as menores frequências de MDSCs dentre os camundongos imunizados (~2%). O grupo imunizado somente com a gDE7 também apresentou frequências menores de MDSC esplênicas, no entanto, a maioria dos camundongos (80%) já apresentavam tumores em desenvolvimento no momento em que o ensaio foi realizado. De acordo com resultados prévios encontrados pelo nosso grupo de pesquisa, se este ensaio fosse realizado com um intervalo maior em relação ao desafio (ocasião em que os tumores estivessem maiores), certamente veríamos maior diferença na frequência de MDSCs nos baços dos camundongos entre estes dois grupos. Estes aspectos certamente serão avaliados no futuro.

Em contraste, os grupos imunizados com salina (controle), com o antígeno E7, ou E7 coadministrado ao poly(I:C) apresentaram frequências significativamente maiores de MDSC no baço (~7%, 6,5% e 4,5%) em relação ao grupo imunizado com a gDE7 coadministrada ao poly(I:C). Coincidentemente, os tumores eram visualmente maiores nestes grupos no momento da realização dos experimentos.

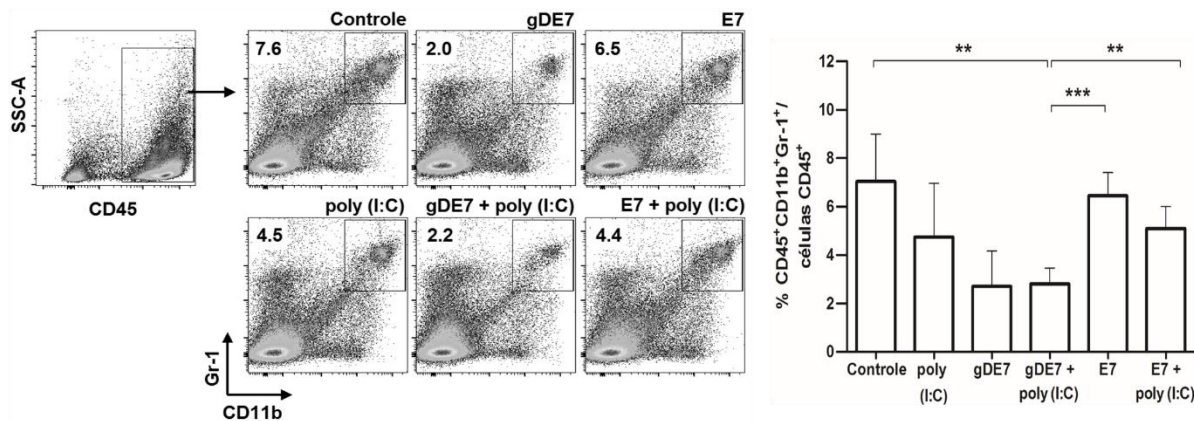


Figura 18. Efeito das imunizações em MDSCs sistêmicas em camundongos desafiados com as células TC-1. Para a análise das MDSCs, células do baço de camundongos desafiados e imunizados foram colhidas catorze dias após a última dose vacinal e marcadas com anticorpos anti-CD45, anti-CD11b e anti-Gr-1. (A) *Dot plots* demonstram os resultados de camundongos representativos dos grupos experimentais. (B) Frequência das MDSCs presentes no baço de camundongos imunizados 22 dias após o desafio. Os resultados representam a média de 5 camundongos por grupo \pm desvio padrão de um de dois experimentos independentes realizados com resultados semelhantes. ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$. (ANOVA, post test: Bonferroni).

Coletivamente, esses resultados demonstraram que o controle do desenvolvimento tumoral conferido pela imunização com a proteína gDE7 coadministrada ao poly(I:C) impactou diretamente na expansão de linfócitos T regulatórios e de MDSCs sistêmicos. Por sua vez, o controle da imunossupressão mediada pela formulação vacinal permite que a resposta antitumoral efetora rejeite o desenvolvimento do tumor com maior eficiência.

4.3.2.8 Impacto da presença de LPS na resposta antitumoral terapêutica

A contaminação das proteínas recombinantes por lipopolissacarídeos (LPS) excedeu o nível aceitável preconizado pela Farmacopeia Europeia (5 EU/kg) (PETSCH; ANSPACH, 2000) e, por esta razão, camundongos C57BL/6 TLR4 KO foram usados em experimentos controle para entender o impacto da presença de LPS contaminante na resposta antitumoral terapêutica gerada pelas formulações vacinais. Como demonstrado na **figura 19A**, a administração de duas doses subcutâneas da proteína gDE7 coadministrada ao poly(I:C) (dias 1 e 8 após o desafio), conferiu proteção antitumoral terapêutica completa aos camundongos C57BL/6 TLR4 KO desafiados com as células TC-1. Duas doses da proteína gDE7 administrada sozinha e do antígeno E7 coadministrado ao poly(I:C) protegeram parcialmente (33%) os camundongos C57BL/6 TLR4 KO do desenvolvimento do tumor. Nenhuma proteção antitumoral terapêutica foi observada no grupo imunizado com duas doses do antígeno E7 sem

o adjuvante. Além disso, os camundongos C57BL/6 TLR4 KO imunizados com duas doses da proteína gDE7 coadministrada ao poly(I:C) apresentaram frequências mais elevadas de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos produtores de IFN- γ , resposta monitorada dez dias após a última dose vacinal (**Figura 19B**). Desta forma, não foram observadas diferenças significativas na proteção antitumoral terapêutica e na resposta de linfócitos T CD8⁺ E7-específica induzidas pela imunização com a proteína gDE7 coadministrada ao poly(I:C) tanto em camundongos selvagens como em TLR4 KO, o que sugere que os níveis de LPS presente na proteína gDE7 não interferiu na resposta protetora contra o tumor.

Além de avaliarmos o impacto direto da presença do LPS na resposta de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos, o perfil de secreção de citocinas pró-inflamatórias por células de baço de camundongos selvagens e TLR4 KO imunizados também foi analisado (**Figura 19C**). Considerando as células de baço dos camundongos das duas linhagens imunizados com a gDE7 coadministrada ao poly(I:C), podemos concluir que a presença do LPS não influenciou na quantidade das citocinas secretadas. Tanto as células dos camundongos selvagens como dos TLR4 KO secretaram quantidades equivalentes ($p > 0.05$) das citocinas inflamatórias IL-6, TNF- α e IFN- γ neste grupo. Fato que também nos permite concluir que a quantidade de LPS presente na proteína gDE7 purificada não foi suficiente para alterar as respostas imunológicas induzidas.

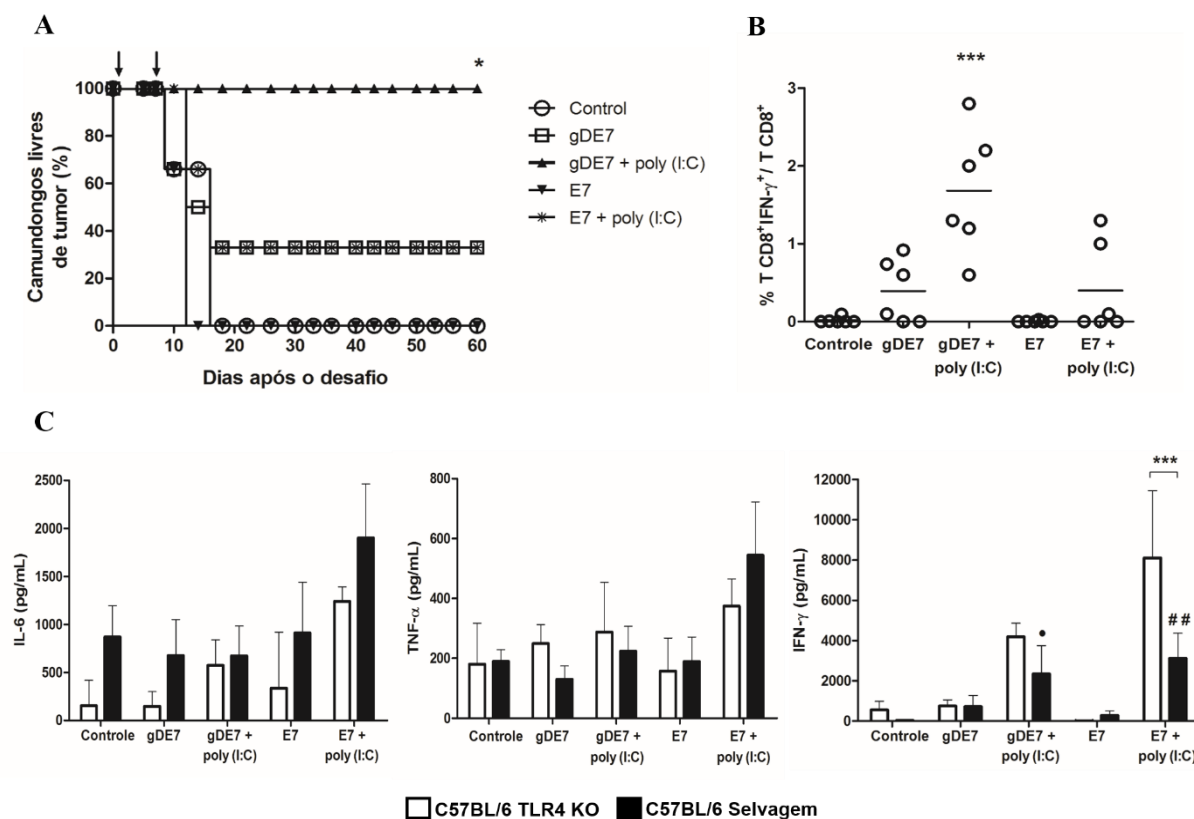


Figura 19. A coadministração da proteína gDE7 ao poly(I:C) confere proteção antitumoral terapêutica completa e ativação de linfócitos T CD8⁺ E7 específicos em camundongos TLR4 KO desafiados com células TC-1. (A) Os camundongos foram desafiados com $7,5 \times 10^4$ células TC-1 e imunizados com duas doses subcutâneas (dias 1 e 8 após o desafio) contendo a proteína gDE7 ou a E7 coadministradas ou não ao poly(I:C). Os camundongos foram acompanhados por 60 dias após o desafio para análise do crescimento tumoral. As setas indicam os dias das imunizações. * $p < 0.05$ versus todos os outros grupos. (B) As detecções de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos produtores de IFN- γ de PBMC foram realizadas dez dias após a última dose de imunização, após 12 horas de reestímulo *in vitro* com o peptídeo CD8-específico da proteína E7. Os dados demonstrados são baseados em três animais por grupo de dois experimentos independentes ($n=6$) *** $p < 0.001$ versus todos os outros grupos. (C) Produção das citocinas pró-inflamatórias IL-6, TNF- α e IFN- γ pelas células do baço de camundongos selvagens ($n=5$) e TLR4 KO ($n=3$) diante do reestímulo *in vitro* com $10 \mu\text{g/ml}$ da proteína E7 por 48 horas. Os valores foram obtidos a partir da diferença das amostras estimuladas com a proteína E7 e amostras não estimuladas. *** $p < 0.001$; • $p < 0.05$ versus gDE7 em C57BL/6 selvagens; ## $p < 0.01$ versus E7 em C57BL/6 selvagens. (Log-rank – Mantel Cox; ANOVA, post test: Bonferroni; Teste t).

4.4 ANÁLISE DE PARÂMETROS DE SEGURANÇA VACINAL NOS CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM O ADJUVANTE POLY(I:C)

Análogos de RNA de dupla fita são potentes indutores de interferon do tipo I e a sua efetividade como reagente antiviral é historicamente bastante conhecida. (BORECKY et al., 1981; CARTER; DE CLERCQ, 1974; DE CLERCQ, 2006; MATSUMOTO; SEYA, 2008). No entanto, a utilização destas moléculas em terapias antivirais e antitumorais implicou em outros

efeitos biológicos, muitos deles considerados indesejáveis. Dependendo da via utilizada e da quantidade administrada os efeitos podem incluir: pirogenicidade, redução da hematopoese, necrose de vários tipos celulares, disfunção hepática, entre outros (CARTER et al., 1976; HOMAN et al., 1971). Diante destes fatos, decidiu-se investigar se a dose do adjuvante poly(I:C) utilizada nas imunizações deste estudo teria efeito tóxico nos camundongos. Os parâmetros de segurança vacinal avaliados foram hematologia, função hepática, função renal e lactato desidrogenase.

4.4.1 Análises hematológicas

Para avaliar o efeito do adjuvante poly(I:C) nas células sanguíneas, os camundongos desafiados e imunizados com duas doses vacinais (dias 1 e 8 após o desafio) foram sangrados pela via do plexo submandibular um e três dias após a última dose vacinal. O sangue dos camundongos foi analisado em contador hematológico diferencial.

Em estudo realizado por Carter et al. (1976), animais que receberam múltiplas doses de análogos de RNA de fita dupla, incluindo o poly(I:C), durante 7 dias pela via intraperitoneal, apresentaram quadro de anemia acentuada (avaliado neste estudo pelo parâmetro HGB) e alterações no hematócrito (HCT). Conforme ilustrado na **tabela 1**, os parâmetros referentes à série vermelha do sangue (RBC, HCT e HGB) dos grupos imunizados com 50 µg do poly(I:C) pela via subcutânea se mostraram estatisticamente semelhantes ao do grupo controle, imunizado somente com salina apirogênica, nos dois tempos avaliados. Portanto, podemos concluir que 50 µg do adjuvante poly(I:C) pela via subcutânea não alteraram as células da série vermelha do sangue.

Ao analisarmos a série branca do sangue, constatamos que a contagem de WBC (células brancas totais) e LYM (linfócitos), se apresentou menor nos dois grupos imunizados com o adjuvante poly(I:C) em relação ao grupo controle. O fato de a contagem absoluta dos linfócitos ser menor nos dois grupos imunizados com o poly(I:C) certamente influenciou a contagem das células totais da série branca nestes grupos. O mesmo estudo realizado por Carter e O'Malley (1976) também observou um grau de linfopenia transiente nos animais que receberam doses múltiplas do adjuvante. Em nossas condições experimentais, o quadro de linfopenia observado com 1 dia após a segunda dose começou a ser revertido no terceiro dia após a segunda dose de imunização (**tabela 2**). No terceiro dia após a segunda dose vacinal a

contagem de linfócitos nos camundongos imunizados com o adjuvante poly(I:C) apresentou-se estatisticamente semelhante a do grupo controle.

Outro parâmetro da série branca que se mostrou alterado no primeiro dia após a segunda dose vacinal foi o de neutrófilos (NEU). No entanto, este parâmetro ficou alterado nos grupos imunizados tanto com a proteína gDE7 quanto a gDE7 coadministrada ao poly(I:C), indicando que a neutrofilia, denotativo de inflamação, se relacionou com a proteína gDE7.

Tabela 2. Avaliação de alteração de parâmetros hematológicos em camundongos imunizados ^a.

Parâmetros ^b	Controle		gDE7		gDE7+poly (I:C)		E7		E7+poly (I:C)	
	1 dia	3 dias	1 dia	3 dias	1 dia	3 dias	1 dia	3 dias	1 dia	3 dias
WBC	7,4 ± 1,5	10,1 ± 1,5	6,5 ± 1,4	10,4 ± 4,8	3,1 ± 1,0 ***	7,2 ± 1,3	8,5 ± 1,5	11,1 ± 2,2	2,7 ± 1,1 ***	7,7 ± 1,5
NEU	0,9 ± 0,1	1,5 ± 0,3	1,5 ± 0,4 *	1,2 ± 0,5	1,6 ± 0,5 **	1,6 ± 0,3	1,2 ± 0,3	1,5 ± 0,3	1,2 ± 0,6	1,7 ± 0,4
LYM	5,9 ± 1,2	7,2 ± 0,6	4,6 ± 0,9	8,3 ± 4,2	1,1 ± 0,4 ***	5 ± 0,9	6,8 ± 1,2	8,8 ± 1,8	1,3 ± 0,5 ***	5,3 ± 1,0
MON	0,5 ± 0,3	0,5 ± 0,1	0,3 ± 0,2	0,5 ± 0,2	0,2 ± 0,2	0,4 ± 0,3	0,4 ± 0,2	0,6 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,5 ± 0,1
RBC	7,7 ± 0,6	6,7 ± 0,2	8,3 ± 0,8	6,3 ± 0,6	7,6 ± 0,5	5,6 ± 0,8	7,5 ± 0,6	6,4 ± 0,9	7,5 ± 0,5	6,3 ± 0,5
HCT ^c	30,6 ± 2,6	27,7 ± 1,4	32,8 ± 3,4	25 ± 2,1	30,3 ± 1,9	22,6 ± 3,1	30,4 ± 2,7	26,8 ± 3,2	30,2 ± 1,8	25 ± 2,7
HGB	11,6 ± 0,9	10,5 ± 0,5	12,2 ± 1,2	9,4 ± 0,7	11,3 ± 0,7	8,5 ± 1,2	11,8 ± 1,0	10,1 ± 1,3	11,4 ± 0,7	9,5 ± 0,9

^a Camundongos fêmeas (n=5) foram desafiados no dia 0 e receberam duas doses das vacinas nos dias 1 e 8 após o desafio. Os camundongos foram sangrados pelo plexo submandibular nos dias um e três após a segunda dose do regime vacinal para as análises hematológicas.

^b As amostras de sangue foram processadas para determinar a concentração de células brancas do sangue (WBC), neutrófilos (NEU), linfócitos (LYM), monócitos (MON), e células vermelhas do sangue (RBC). As contagens de WBC, NEU, LYM e MON são expressas em 10³ células/ul. A contagem de RBC é expressa em 10⁶ células/ul.

^c Os valores do hematócrito são dados como porcentagem (%) do volume ocupado pelas hemácias em relação ao volume total de sangue. Os dados são expressos como média ± desvio padrão de medidas de amostras individuais. * p<0.05; ** p<0.01; *** p< 0.001 em relação ao grupo controle.

4.4.2 Testes bioquímicos para análise de função hepática, renal e lactato desidrogenase

Phillips et al. (1971) demonstraram que doses subcrônicas do adjuvante poly(I:C) se mostraram tóxicas em cachorros e alteraram as funções hepáticas e renal dos animais empregados no estudo. Para avaliar o impacto do poly(I:C) nas funções hepática e renal, os camundongos foram desafiados e imunizados com duas doses das formulações vacinais testadas (dias 1 e 8 após o desafio). Cinco dias após a segunda dose, os camundongos foram sangrados pela via do plexo submandibular para obtenção do soro empregado nos testes bioquímicos. Testes laboratoriais foram utilizados para a dosagem de transaminase glutâmico oxalacética (TGO) (**Figura 20A**) e transaminase glutâmico pirúvico (TGP) (**Figura 20B**) – indicativos de função hepática; lactato desidrogenase (LDH) (**Figura 20C**) - indicativo de lesão tecidual generalizada; e ureia (**Figura 20D**) – indicativo de função renal.

Conforme demonstrado na **figura 20**, nenhum dos parâmetros avaliados se mostrou alterado nos grupos imunizados com o poly(I:C) em relação ao grupo controle imunizado somente com salina apirogênica. Desta forma, podemos concluir que 50 μ g do adjuvante poly(I:C) pela via subcutânea não ofereceu risco de toxicidade aos camundongos imunizados.

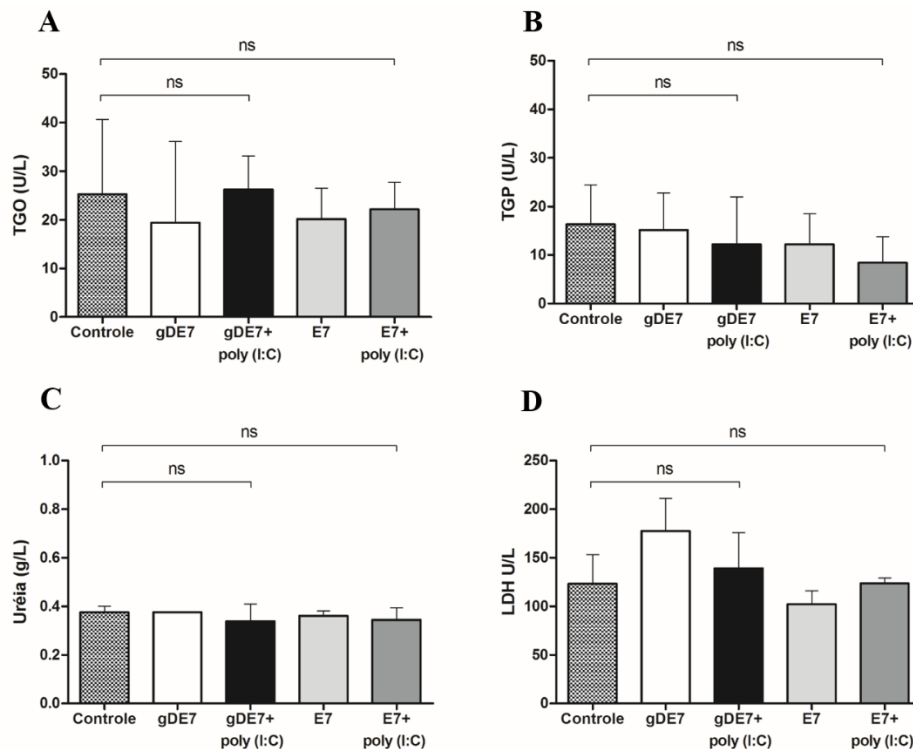


Figura 20. Análise de parâmetros de segurança vacinal em camundongos imunizados com o adjuvante poly(I:C). Cinco dias após a segunda dose vacinal, os camundongos foram sangrados pela via do plexo submandibular para obtenção do soro empregado nos testes bioquímicos e avaliação de função hepática (A) e (B), função renal (C) e lesão tecidual generalizada (D). ns: estatisticamente não significativo.

4.5 ESTUDO DO EFEITO ADJUVANTE DA PROTEÍNA gD – FOCO EM CÉLULAS DENDRÍTICAS (DCs)

4.5.1 Efeito das proteínas gD, gDE7 e E7 em subpopulações de células dendríticas de camundongos

Classicamente, antígenos exógenos de natureza proteica são processados e apresentados via moléculas de MHC classe II para linfócitos T CD4⁺ (ROBSON et al., 2010; ROCHE; FURUTA, 2015). No entanto, em nossas condições experimentais, a vacina baseada na proteína de fusão gDE7 coadministrada ao poly(I:C) induziu resposta robusta de linfócitos T CD8⁺ efetores capazes de controlar o desenvolvimento de tumores associados ao HPV-16 em

camundongos. É interessante destacar que o efeito antitumoral desta formulação vacinal também foi observado em camundongos *knockouts* para linfócitos T CD4⁺. A formulação vacinal baseada na proteína E7 coadministrada ao poly(I:C) não foi capaz de ativar linfócitos T CD8⁺ nem proteger os camundongos do desenvolvimento do tumor. Diante disso, o papel da proteína gD no desenvolvimento da resposta antitumoral efetora por meio do seu efeito em células dendríticas foi investigado.

A apresentação de antígenos via moléculas de MHC classe I para linfócitos T CD8⁺ permite que o sistema imune identifique células transformadas ou infectadas por meio da apresentação de peptídeos derivados de proteínas próprias modificadas ou proteínas provenientes de patógenos, respectivamente. Quando as células apresentadoras de antígenos (APCs) não estão diretamente infectadas, elas são capazes de adquirir antígenos exógenos do agente infeccioso e apresentá-los via MHC-I para linfócitos T CD8⁺, por um mecanismo conhecido como apresentação cruzada de antígenos (JOFFRE et al., 2012). Embora outros tipos de APCs possam realizar a apresentação cruzada de antígenos, estudos *in vivo* indicaram que as DCs são as principais células a exercerem esta função (JUNG et al. 2002). No entanto, foi demonstrado mais recentemente, que somente algumas subpopulações de DCs fazem a apresentação cruzada de antígenos com maior eficiência. Dentre as DCs convencionais (cDCs), residentes em órgãos linfóides, a subpopulação CD11c⁺ CD8α⁺ promove a apresentação cruzada de antígenos com maior eficiência do que a subpopulação CD11c⁺ CD8α⁻ em camundongos (HEATH et al., 2004; SHORTMAN; HEATH, 2010).

A capacidade de interação das proteínas recombinantes gD, gDE7 e E7 com as subpopulações CD11c⁺ CD8α⁺ e CD11c⁺ CD8α⁻ de DCs foi avaliada por ensaios de ligação. A ligação dessas proteínas na superfície das DCs, por sua vez, foi quantificada pela marcação com anticorpo monoclonal anti-histidina (todas as proteínas apresentam cauda de 6 aminoácidos histidina geneticamente fusionada à sua porção C-terminal) seguida da marcação secundária do anticorpo anti-IgG-PE. Ou seja, a mediana de intensidade de fluorescência (MFI) do PE demonstra a capacidade de ligação das proteínas recombinantes nas subpopulações de DCs (**Figura 21A-B**). Como demonstrado na **figura 21B**, a proteína gD liga com grande afinidade nas duas subpopulações de DCs testadas. Por outro lado, a proteína gDE7 interage com essas subpopulações com afinidade intermediária comparada à proteína gD. É possível que este fenômeno ocorra devido à alteração de conformação promovida pela fusão do antígeno E7 na proteína gD. Por sua vez, a proteína E7 liga com baixa afinidade em ambas subpopulações de

DCs, em níveis estatisticamente semelhantes aos das DCs incubadas somente com salina (iDC). É importante destacar que tanto a proteína gD quanto a gDE7 ligam com maior eficiência na subpopulação CD11c⁺ CD8α⁺ de DCs, demonstrando que a afinidade por esta subpopulação é uma característica da proteína gD (**Figura 21B**). Além disso, esse resultado sugere que o componente gD da proteína de fusão gDE7 pode atuar direcionando o antígeno E7 do HPV-16 para a subpopulação CD11c⁺CD8α⁺ de DCs, especializada em apresentação cruzada de antígenos para linfócitos T CD8⁺.

Além de avaliar a capacidade de ligação, nós também analisamos a capacidade de ativação das subpopulações de DCs mediada pelas proteínas recombinantes. Antes do contato com as DCs, quantidades equimolares das proteínas recombinantes foram tratadas com polimixina B para neutralizar os efeitos do LPS residual *in vitro* (TYNAN et al., 2012). A ativação das subpopulações de DCs foi mensurada pelo aumento da expressão das moléculas coestimulatórias CD40 e CD86, bem como a produção de IL-12 (**Figuras 21C-E**). As proteínas gD e gDE7 também ativaram mais eficientemente a subpopulação CD11c⁺ CD8α⁺ de DCs do que a subpopulação CD11c⁺ CD8α⁻. As proteínas gD e gDE7 induziram um aumento da expressão de CD40 e CD86 na subpopulação CD11c⁺CD8α⁺ de DCs em relação à proteína E7. Os níveis de expressão dessas moléculas em resposta à proteína E7 ficaram semelhantes aos das DCs incubadas somente com polimixina B.

Conforme dados disponíveis na literatura (FARRAND et al., 2009; HOCHREIN et al., 2001), a subpopulação CD11c⁺ CD8α⁺ de DCs possui maior capacidade de produção de IL-12 em relação à subpopulação CD11c⁺CD8α⁻ de DCs (**Figura. 21E**). Foi observado um aumento significativo na porcentagem de células produtoras de IL-12 em resposta às proteínas gD e gDE7 ($p < 0.05$ para ambas proteínas), mas não em resposta à E7, em ambas subpopulações de DCs em relação ao controle incubado somente com polimixina B. Por outro lado, não foram encontradas diferenças significativas nas porcentagens de células produtoras de IL-12 entre DCs incubadas com gD/gDE7 e E7 em ambas subpopulações de DCs em nossas condições experimentais. Os controles LPS, LPS + polimixina B e DCs não tratadas (iDC) estão representados na **figura 23**.

Coletivamente, esses resultados sugerem que o componente gD da proteína de fusão gDE7 pode direcionar o antígeno E7 do HPV-16 para a subpopulação CD11c⁺ CD8α⁺ de DCs. Além disto, esse componente parece promover a ativação diferencial desta subpopulação de

DCs pelo aumento da expressão de moléculas coestimulatórias e produção de IL-12, importantes para a diferenciação de linfócitos T CD8⁺ efetores/citotóxicos.

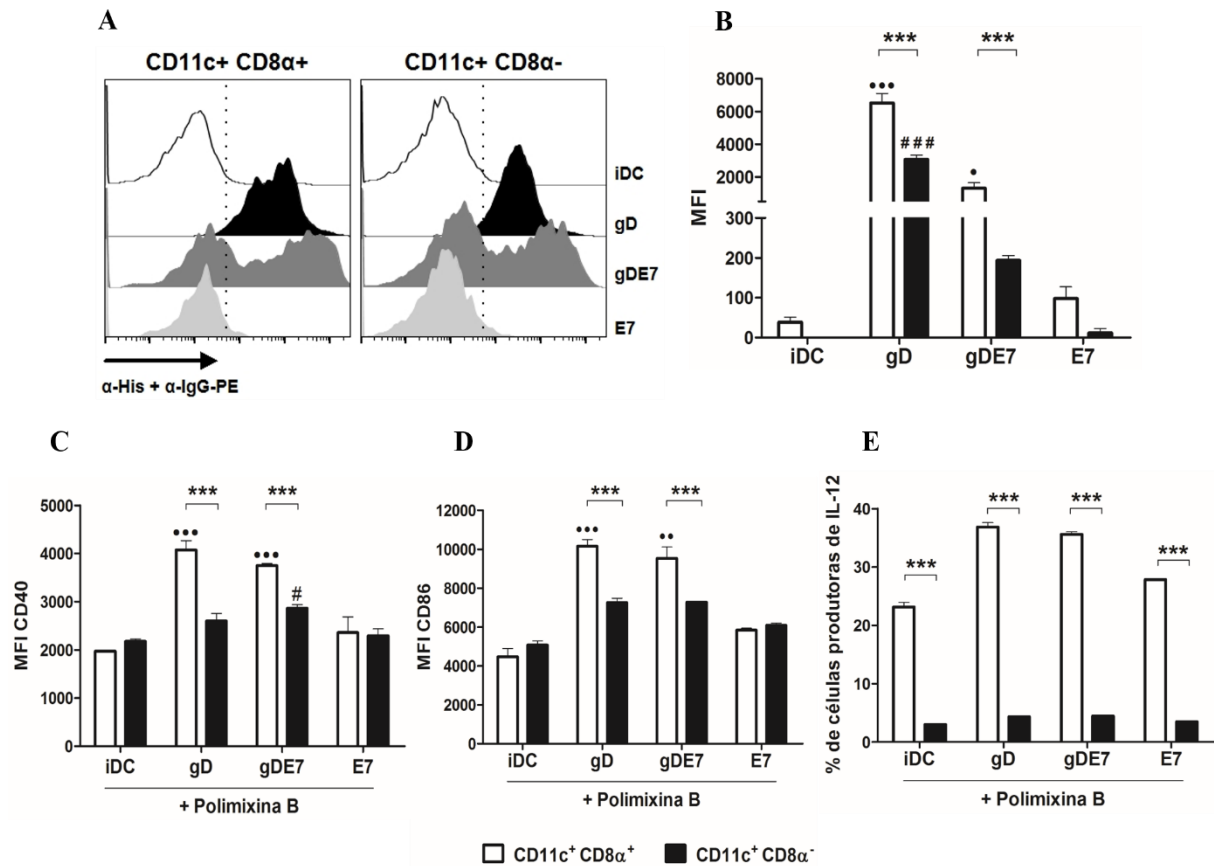


Figura 21. A proteína gDE7 liga e ativa com maior eficiência a subpopulação CD11c⁺ CD8α⁺ de células dendríticas em relação à proteína E7. (A) As DCs isoladas (4×10^5 células) foram incubadas com quantidades equimolares das proteínas gD, gDE7 ou E7 por 40 min no gelo. A ligação das proteínas nas subpopulações de DCs foi detectada em 10^5 células utilizando anticorpo monoclonal purificado anti-His e o anticorpo anti-IgG-PE. (B) Determinação da MFI da ligação das proteínas nas subpopulações CD11c⁺ CD8α⁺ e CD11c⁺ CD8α⁻ de DCs. Os dados representam a média de triplicatas \pm desvio padrão. Os resultados são representativos de um de dois experimentos independentes realizados com resultados semelhantes. *** $p < 0.001$; • $p < 0,05$ e ••• $p < 0.001$ versus E7 na subpopulação CD11c⁺ CD8α⁺ de DCs; ### $p < 0.001$ versus E7 na subpopulação CD11c⁺ CD8α⁻ de DCs. A ativação das DCs foi realizada com quantidades equimolares das proteínas, previamente incubadas com polimixina B, durante 48h a 37 °C. Foram analisadas o aumento da expressão de CD40 e CD86 além da produção de IL-12. Determinação da MFI de CD40 (C) e CD86 (D) e da produção de IL-12 (E) nas subpopulações CD11c⁺ CD8α⁺ e CD11c⁺ CD8α⁻ de DCs. Os dados representam a média de duplicatas \pm desvio padrão de um de dois experimentos independentes realizados com resultados semelhantes. *** $p < 0.001$; •• $p < 0.01$ e ••• $p < 0.001$ versus E7 na população CD11c⁺ CD8α⁺ de DCs; # $p < 0.05$ versus E7 na população CD11c⁺ CD8α⁻ de DCs. (ANOVA, post test: Bonferroni).

Não foi possível observar a ligação das proteínas gD, gDE7 previamente incubadas com a polimixina B nas subpopulações de DCs. Possivelmente, o complexo formado pelo LPS contaminante e a polimixina B pode ter impedido a ligação do anticorpo anti-His, impossibilitando a marcação das proteínas ligadas nas células. É pouco provável que o tratamento com a polimixina B tenha impedido a ligação das proteínas nas células, visto que estas continuam sendo ativadas pelas proteínas tratadas com a polimixina B. Para descartar a hipótese de que a ligação das proteínas nas DCs foi mediada pelo LPS residual, foram realizados ensaios de ligação das proteínas em DCs a partir de células totais de baço de camundongos selvagens e TLR4 KO (**Figura 22A**). Novamente, a mediana de intensidade de fluorescência (MFI) do PE demonstra a capacidade de ligação das proteínas recombinantes nas subpopulações de DCs de baço de camundongos selvagens e TLR4 KO (**Figura 22B**).

De forma semelhante ao demonstrado com as DCs isoladas, a proteína gD liga com maior afinidade nas duas subpopulações de DCs de células totais de baço de camundongos selvagens. A proteína gDE7 interage com essas subpopulações com afinidade intermediária e a proteína E7 liga com menor afinidade em ambas subpopulações de DCs, em níveis comparáveis aos das DCs incubadas somente com salina (iDC) (**Figura 22C**). Esse mesmo fenômeno foi observado em DCs de camundongos TLR4 KO, mostrando que a ligação das proteínas nas DCs independe do reconhecimento clássico do LPS, via TLR 4 (**Figura 22D**). Foi observado novamente que as proteínas gD e gDE7 ligam com eficiência significativa na subpopulação CD11c⁺CD8α⁺ de DCs de camundongos selvagens, reforçando a hipótese de que a afinidade por essa subpopulação celular é uma característica da proteína gD. Entretanto, este fenômeno foi observado somente para a proteína gD em DCs de camundongos TLR4 KO. Esses resultados reforçam a ideia de que o componente gD da proteína de fusão gDE7 pode direcionar o antígeno E7 do HPV-16 para a subpopulação de DCs especializada em promover a apresentação cruzada de antígenos para linfócitos T CD8⁺.

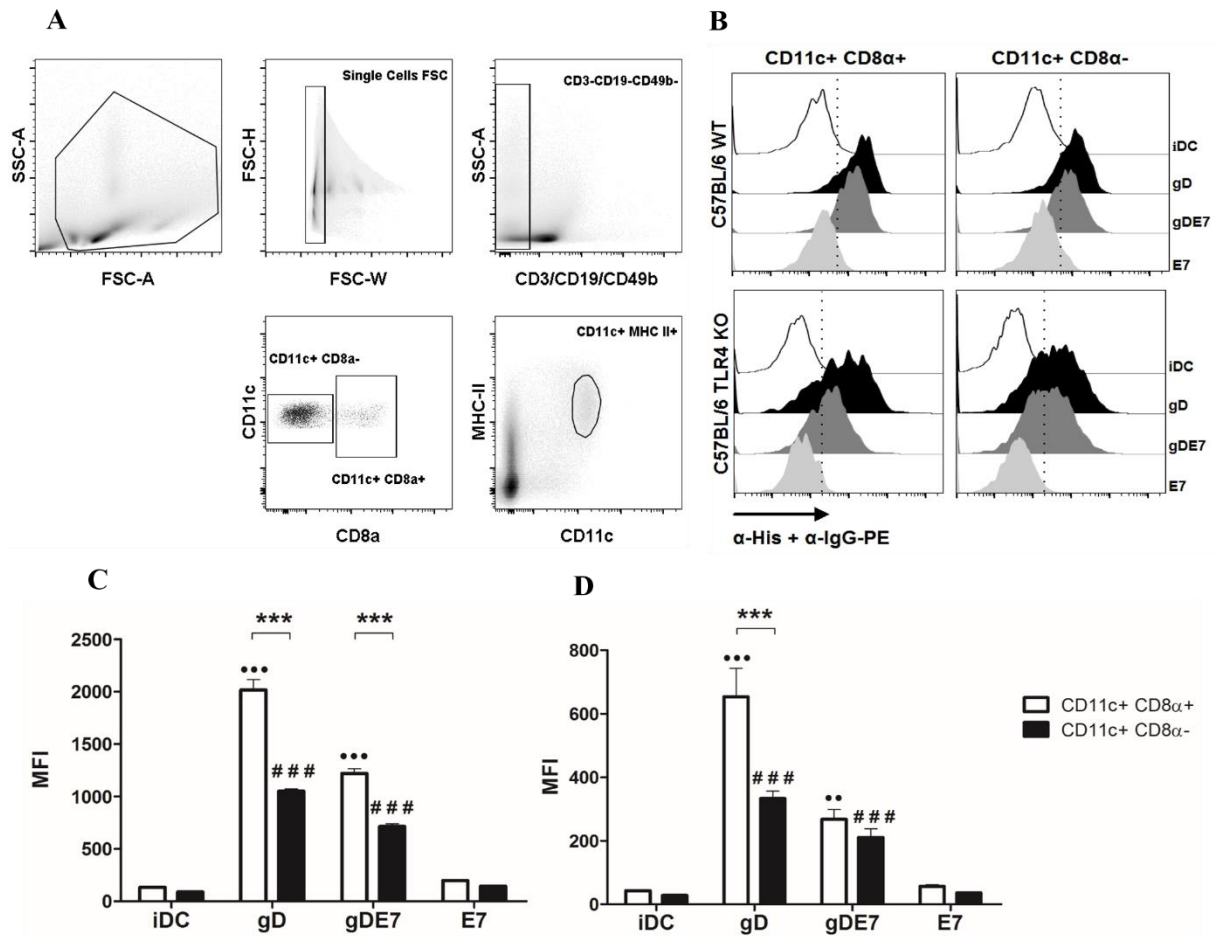


Figura 22. A proteína gDE7 liga com maior eficiência a subpopulação CD11c⁺ CD8α⁺ de DCs em relação à proteína E7. Células totais de baço (5×10^6 células) de camundongos selvagem e TLR4 KO foram incubadas com quantidades equimolares das proteínas recombinantes e marcadas com uma mistura de anticorpos monoclonais. **(A)** Estratégia de análise por citometria de fluxo para avaliação da ligação das proteínas nas subpopulações de DCs. Células agregadas, linfócitos T, B e NK foram excluídos da análise e células CD11c⁺ MHCII⁺ foram separadas pela expressão de CD8α. **(B)** A ligação das proteínas foi detectada nas subpopulações CD11c⁺ CD8α⁺ e CD11c⁺ CD8α⁻ de DCs de camundongos selvagem (painéis superiores) e TLR4 KO (painéis inferiores). As MFIs da ligação das proteínas nas subpopulações CD11c⁺ CD8α⁺ e CD11c⁺ CD8α⁻ de DCs de camundongos selvagem **(C)** e TLR4 KO **(D)** foram determinadas. Os dados representam a média de triplicatas \pm desvio padrão de um de dois experimentos independentes realizados com resultados semelhantes. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ versus E7 na subpopulação CD11c⁺ CD8α⁺ de DCs; ### $p < 0.001$ versus E7 na subpopulação CD11c⁺ CD8α⁻ de DCs. (ANOVA, post test: Bonferroni).

4.5.1.1 A polimixina B neutraliza os efeitos do LPS “in vitro” em culturas de células dendríticas de camundongos

A ativação de células dendríticas é frequentemente utilizada como medida do potencial imunomodulatório de diferentes moléculas. No entanto, a contaminação residual de LPS é um problema frequente e nem sempre é levado em consideração. Neste sentido, a polimixina B é

muito utilizada para neutralizar os efeitos do LPS contaminante principalmente em ensaios *in vitro*.

Antes de serem incubados com as DCs, as proteínas e o LPS foram tratados com a polimixina B durante 2 horas a 37 °C. Em seguida, 50 µl de cada solução foram incubados com as DCs por 48 horas. As concentrações de uso das soluções estão descritas na metodologia. O LPS sem tratamento prévio com polimixina B foi utilizado como controle positivo de ativação de DCs. Conforme mostrado na **figura 23**, o tratamento prévio com a polimixina B neutralizou eficientemente os efeitos de 100 ng/ml de LPS em culturas de DCs murinas, mantendo os níveis de expressão de CD40 e CD86 (**Figuras 23A-B**) e a produção de IL-12 (**Figura 23C**) estatisticamente semelhantes aos das DCs não estimuladas (iDC). Pelo fato da concentração do LPS nas soluções das proteínas não alcançar 100 ng/mL, podemos concluir que a ativação observada nas DCs não se deve a presença do LPS, e sim pela presença das proteínas recombinantes.

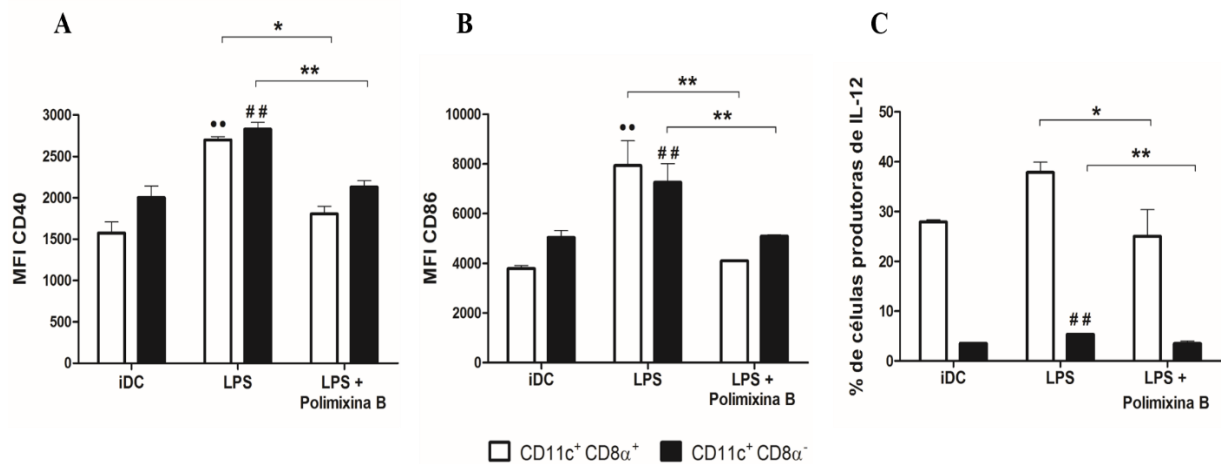


Figura 23. A polimixina B inibe a ativação induzida pelo LPS em DCs de camundongos. A polimixina B (200 µg/ml) foi incubada com LPS (2 µg/ml) durante 2 horas a 37 °C. Em seguida, as DCs isoladas de camundongos foram incubadas com 50 µl de solução salina apirogênica (iDC) ou 50 µl de LPS (concentração de uso: 100 ng/ml) ou 50 µl de LPS + polimixina B (concentrações de uso: 100 ng/ml e 10 µg/ml, respectivamente). A expressão das moléculas coestimulatórias CD40 (**A**) e CD86 (**B**) e a produção de IL-12 (**C**) foram avaliadas nas DCs de camundongos após 48 horas de incubação. Os dados representam a média ± desvio padrão de duplicatas de um de dois experimentos independentes com resultados semelhantes * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$; ** $p < 0.01$ versus iDC na subpopulação CD11c⁺ CD8α⁺ e # # $p < 0.01$ versus iDC na subpopulação CD11c⁺ CD8α⁻ de DCs. (ANOVA, post test: Bonferroni).

4.5.2 Efeito das proteínas gD, gDE7 e E7 em células dendríticas derivadas de monócitos (MoDCs) e subpopulações de células dendríticas sanguíneas humanas

Levando em consideração os resultados de ativação das células dendríticas de camundongos mediada pelas proteínas gD e gDE7, procurou-se analisar o efeito destas proteínas também em células dendríticas humanas. Para este fim, o efeito das proteínas gD, gDE7 e E7 foi analisado em células dendríticas diferenciadas *in vitro* de monócitos (Mo-DCs) e células dendríticas do sangue BDCA1⁺ e BDCA3⁺, a partir de doadores humanos saudáveis.

O fenótipo das DCs humanas tem sido extensivamente estudado nos últimos anos. Como em camundongos, as DCs humanas também são agrupadas em DCs plasmocitóides (pDCs) e DCs convencionais (cDCs). Dentre as cDCs humanas, três fenótipos são conhecidos: CD1c⁺ (BDCA1⁺), CD16⁺, e CD141⁺ (BDCA3⁺) (JU et al., 2010). Análises meticolosas de expressão gênica sugeriram que as cDCs BDCA3⁺ correspondem às cDCs CD11c⁺ CD8α⁺ de camundongos (ROBBINS et al., 2008). Mais recentemente, Bachem et al. (2010) mostraram que dentre as cDCs, as BDCA3⁺ se sobressaem na realização de apresentação cruzada de antígenos, e por isso, estas células foram reconhecidas como homólogas às cDCs CD11c⁺ CD8α⁺ de camundongo. A capacidade das cDCs BDCA3⁺ humanas em realizar a apresentação cruzada de antígenos para linfócitos T CD8⁺ desperta grande interesse para o desenvolvimento de imunoterapias ativas contra tumores em seres humanos.

As células dendríticas foram obtidas a partir de sangue de doadores saudáveis proveniente do Banco de Sangue do Hospital Oswaldo Cruz da cidade de São Paulo. As células foram processadas, estimuladas e analisadas pela equipe do laboratório do Prof. Dr. José Alexandre Barbuto do Departamento de Imunologia do ICB. Brevemente, a obtenção das Mo-DCs, utilizadas como controle dos experimentos, os monócitos foram separados a partir do sangue periférico e então cultivados na presença de GM-CSF e IL-4 por 7 dias para a diferenciação em células dendríticas. No dia 6, as Mo-DCs foram estimuladas com quantidades equimolares das proteínas gD, gDE7 e E7, previamente tratadas com a polimixina B, e analisadas para o aumento da produção de TNF-α. Por sua vez, as células dendríticas do sangue BDCA1⁺ e BDCA3⁺ foram separadas a partir de sangue periférico e diretamente estimuladas com as proteínas gD, gDE7 e E7 e então analisadas para o aumento da produção de TNF-α.

Como podemos observar na **figura 24**, as proteínas gD e gDE7 aumentaram significativamente a frequência de DCs BDCA3⁺ produtoras de TNF-α em relação às DCs

BDCA1⁺. A diferença foi ainda mais significativa entre as DCs BDCA3⁺ e as Mo-DCs (**Figura 24A-B**). É interessante salientar que as frequências das DCs BDCA3⁺ no sangue humano são extremamente baixas, e ainda, a frequência destas DCs é aproximadamente 10X menor do que das DCs BDCA1⁺ (BACHEM et al., 2010 e **figura 24A**), o que demonstra maior especificidade da ativação desta subpopulação de DCs mediada pelas proteínas gD e gDE7. Em contraste, o aumento da frequência das DCs BDCA3⁺ produtoras de TNF- α promovido pela proteína E7 não foi estatisticamente significativo em relação às DCs BDCA1⁺. Desta forma, esses dados indicam que a ativação diferencial da subpopulação de DCs especializada em apresentação cruzada de antígenos, observada primeiramente em DCs de camundongos (**Figura 21C-E**), também se reproduz em DCs sanguíneas humanas. Essa observação reforça a hipótese de que o componente gD presente na proteína de fusão gDE7 é responsável por esse fenômeno. Os controles LPS, LPS + polimixina B e DCs não tratadas estão representados na **figura 25**.

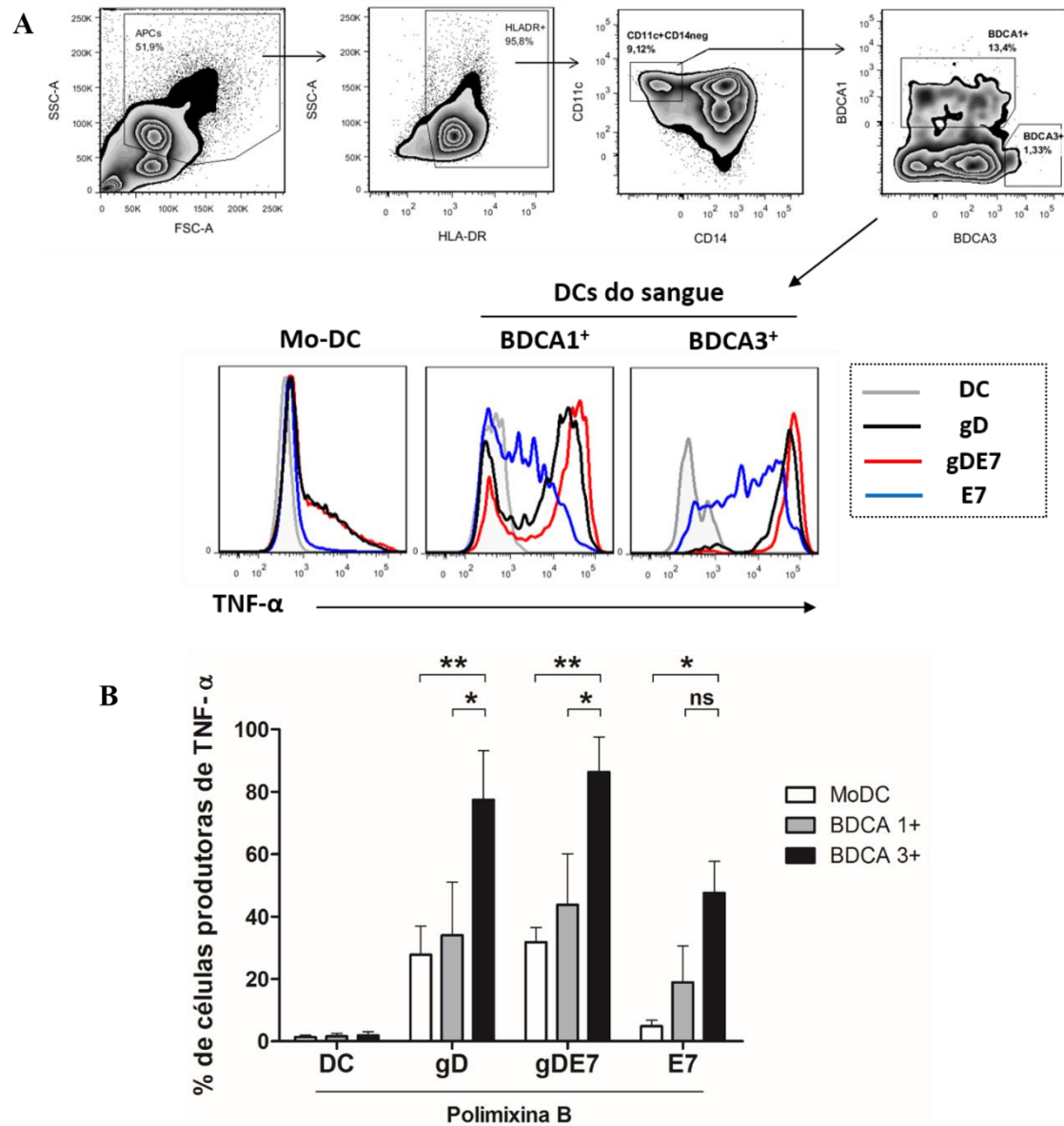


Figura 24. A subpopulação BDCA3⁺ de células dendríticas sanguíneas humanas são ativadas mais eficientemente após a incubação com as proteínas gD e gDE7. A ativação das DCs humanas foi induzida por quantidades equimolares das proteínas gD, gDE7 e E7, previamente incubadas com polimixina B, por 6h a 37 °C. Após a incubação, as DCs BDCA1⁺ e BDCA3⁺ foram identificadas por citometria de fluxo (A) e analisadas para a produção intracelular de TNF- α (A e B). Os dados representam a média \pm erro padrão de três doadores saudáveis realizados como três experimentos independentes. * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$. ns: estatisticamente não significativo. (ANOVA post test: Bonferroni).

4.5.2.1 A polimixina B neutraliza os efeitos do LPS “in vitro” em culturas de células dendríticas humanas

Antes de serem incubados com as DCs humanas, as proteínas e o LPS foram tratados com a polimixina B durante 2 horas a 37 °C. Em seguida, 50 µl de cada solução foram incubados com as DCs humanas por 6 horas para análise de produção do TNF- α . As concentrações de uso das soluções estão descritas na metodologia. O LPS sem tratamento prévio com polimixina B foi utilizado como controle positivo de ativação de DCs. Conforme mostrado na **figura 25**, o tratamento prévio com a polimixina B neutralizou eficientemente os efeitos de 100 ng/ml de LPS em culturas de DCs humanas, mantendo os níveis de produção de TNF- α estatisticamente semelhantes aos das DCs não estimuladas (DC). Pelo fato da concentração do LPS nas soluções das proteínas não alcançar 100 ng/mL, podemos concluir que a ativação observada nas DCs humanas não se deve a presença do LPS, e sim pela presença das proteínas recombinantes.

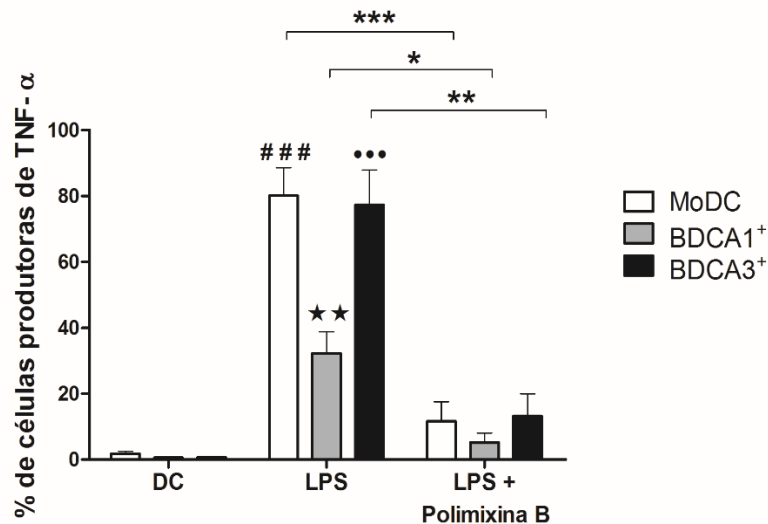


Figura 25. A Polimixina B inibe a ativação induzida pelo LPS em DCs derivadas de monócitos e sanguíneas humanas *in vitro*. A polimixina B (200 µg/ml) foi incubada com LPS (2 µg/ml) durante 2 horas a 37 °C. Em seguida, as MoDCs e as DCs provenientes do sangue foram incubadas com 50 µl de solução salina apirogênica (DC) ou 50 µl de LPS (concentração de uso: 100 ng/ml) ou de LPS + polimixina B (concentrações de uso: 100 ng/ml e 10 µg/ml, respectivamente). A produção de TNF- α foi avaliada nas DCs após 6 horas de incubação. Os dados representam a média \pm erro padrão de três dados saudáveis realizados como três experimentos independentes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$. ### $p < 0.001$ versus DC em MoDc; ★★ $p < 0.01$ versus DC na subpopulação BDCA1⁺ e ●●● $p < 0.001$ versus DC na subpopulação BDCA3⁺. (ANOVA post test: Bonferroni).

5 DISCUSSÃO

Esta tese de doutoramento demonstrou o desenvolvimento de uma estratégia imunoterapêutica inédita para o controle de tumores associados ao HPV-16. A estratégia estudada está baseada no emprego de uma proteína recombinante purificada composta pela oncoproteína E7 do HPV-16 geneticamente fusionada à glicoproteína D (gD) do HSV-1, coadministrada ao adjuvante vacinal poly(I:C). Os resultados incluem a obtenção do antígeno pela expressão em sistema procarioto, a escolha do melhor adjuvante vacinal e o estudo das respostas imunes humoral e celular desencadeadas pelas formulações vacinais testadas. A tese foi um desdobramento de um estudo prévio realizado pela aluna durante o seu mestrado no Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas, publicado durante o período de doutoramento. O trabalho publicado no ano de 2011 e intitulado: “Purified Herpes Simplex Type 1 Glycoprotein D (gD) Genetically Fused with the Type 16 Human Papillomavirus E7 Oncoprotein Enhances Antigen-Specific CD8⁺ T Cell Responses and Confers Protective Antitumor Immunity” foi anexado ao final desta tese.

A proteção contra tumores induzidos pela linhagem TC-1 correlaciona estritamente com a ativação de linfócitos T CD8⁺ efetores (CHENG et al., 2003; LIU et al., 2007) com capacidade de reconhecer o epítipo imunodominante da proteína E7 que se associa a moléculas de MHC classe I do haplótipo H-2Db (FELTKAMP et al., 1993). No entanto, vacinas baseadas somente na oncoproteína E7 não são eficazes na indução da resposta de linfócitos T CD8⁺ E7-específica e não conferem proteção antitumoral aos camundongos desafiados com as células TC-1. Conforme mencionado anteriormente, a oncoproteína E7 possui curta meia-vida intracelular sendo rapidamente degradada via proteassomos (ROMAN; MUNGER, 2013; SMOTKIN; WETTSTEIN, 1987; VALDOVINOS-TORRES et al., 2008), o que sugere que pode haver pouca apresentação do antígeno E7 para linfócitos T CD8⁺. Diante deste obstáculo, diversos grupos de pesquisas desenvolveram estratégias para elevar a imunogenicidade do antígeno E7 por meio do aumento da sua apresentação via MHC de classe I e II. A fusão dos antígenos do HPV a outras proteínas é justamente umas destas estratégias. Podemos citar, por exemplo: **I**) a fusão das oncoproteínas E6 e E7 de HPV-16 e 18 a proteína do L2 do capsídeo viral de HPV-16 (TA-CIN) testada em um estudo clínico de fase II contra lesões de alto grau de vulva (DAAYANA et al., 2010); **II**) a fusão da oncoproteína E7 de HPV-16 a Hsp65 de *Mycobacterium bovis* (SGN-00101) testada em estudos de fase I e II contra neoplasias

intraepiteliais cervicais (ROMAN et al., 2007), papilomatose respiratória recorrente (DERKAY et al., 2005) e verrugas anogenitais (GOLDSTONE et al., 2002); **III**) a fusão da oncoproteína E7 de HPV-16 a proteína D de *Haemophilus influenza* (PD-E7) testada em estudos de fase I/II em pacientes com neoplasias intraepiteliais cervicais (HALLEZ et al., 2004); entre outras.

Os resultados alcançados com a primeira versão da vacina (PORCHIA et al., 2011), levaram à concepção de uma nova formulação composta pela proteína de fusão gDE7 associada a um adjuvante vacinal que melhorasse o efeito antitumoral terapêutico deste antígeno e que favorecesse a ativação de linfócitos T CD8⁺ efetores. Respostas imunes celulares, principalmente de linfócitos T citotóxicos antígeno-específicos, são fundamentais para o controle de tumores e de infecções mediadas por patógenos intracelulares. A indução desse braço da resposta imune é um desafio da vacinologia atual e tem sido difícil encontrar adjuvantes que induzam respostas de linfócitos T CD8⁺ contra antígenos coadministrados (SEDER; HILL, 2000). Na presente tese de doutoramento foram testados os seguintes adjuvantes: o CpG 1826, o peptídeo LAH4, a LTK63 e o poly(I:C).

O CpC é um oligonucleotídeo sintético que contém motivos não metilados muito frequentes no DNA bacteriano. Os CpGs são reconhecidos por receptores TLR 9 e modulam a resposta imune contra um antígeno para o braço Th-1, importante para a atividade citotóxica de linfócitos TCD8⁺, característica que o torna um bom adjuvante em imunoterapias contra tumores (BODE et al., 2011). O peptídeo LAH4 é uma pequena molécula de característica anfipática usada para entrega de macromoléculas no interior de células, e é utilizado para facilitar a apresentação cruzada de antígenos proteicos pelas células dendríticas. Zhang et al. (2012) utilizaram o peptídeo em associação ou não com o CpG em uma estratégia vacinal terapêutica contra o modelo tumoral murino B16, que expressa OVA como antígeno principal. Os resultados deste trabalho foram animadores quanto à ativação de linfócitos TCD8⁺ OVA-específicos bem como os níveis de sobrevivência após o desafio. Por sua vez, as toxinas LTs de ETEC têm um longo histórico de utilização em testes imunológicos pelas vias parenterais, de mucosa e transcutânea. Diferentes mutantes produzidos em condições laboratoriais possuem o efeito tóxico reduzido, mas o efeito adjuvante relativamente preservado. O mutante LTK63 é um exemplo que apresenta características estruturais da toxina parental, mas a atividade enzimática é completamente abolida. Um estudo realizado por nosso grupo de pesquisa sugeriu que a LTK63 tende a polarizar a resposta imune contra um antígeno para o braço Th-1 (RODRIGUES et al., 2011), importante para imunoterapias ativas contra tumores. Por fim, o

poly(I:C) é um análogo sintético de RNA de fita dupla, ligante de TLR 3 e MDA-5 que ativa o sistema imune inato e adaptativo. A interação do poly(I:C) com TLR 3 em células do sistema imune culmina na ativação do fator de transcrição NFκB, a produção de IFN do tipo I e citocinas inflamatórias. Os IFNs do tipo I podem ativar células NK, potencializar as respostas mediadas por linfócitos TCD8⁺ e maturar células dendríticas. Por outro lado, a interação poly(I:C)/TLR3 pode também induzir apoptose em células tumorais (CHENG; XU, 2010).

Em nossas condições experimentais a formulação que conferiu maior proteção antitumoral terapêutica aos camundongos previamente desafiados com as células TC-1 foi a proteína gDE7 coadministrada ao adjuvante poly(I:C). Foi demonstrado que duas doses desta formulação vacinal foram suficientes para manter 100% dos camundongos previamente desafiados livres do desenvolvimento tumoral até o final do período de acompanhamento. Além disso, a proteção antitumoral terapêutica foi mantida completa mesmo quando o intervalo entre o desafio e o início das imunizações foi de até 7 dias. O microambiente supressor promovido pelo tumor dificulta o desencadeamento de uma resposta imune protetora, e desta forma, quanto maior o intervalo entre o desafio e as doses vacinais, maior a dificuldade de visualização do efeito terapêutico e da resposta imunológica desencadeada por novos candidatos imunoterápicos. Este é um fator que dificulta a visualização da eficácia de novas imunoterapias contra tumores cervicais também em ensaios clínicos. Usualmente, os testes clínicos de novas imunoterapias baseadas na indução de resposta imune celular são realizados em mulheres com neoplasias intraepiteliais cervicais de alto grau ou com o câncer cervical já estabelecido. Para obtenção de melhores resultados, duas estratégias devem ser consideradas: **I**) recrutamento de pacientes com lesões/tumores cervicais em estágios mais precoces ou **II**) consorcio de outras modalidades terapêuticas como a quimioterapia, a radioterapia, cirurgia e imunoterapia passiva.

Um dos principais agentes quimioterápicos utilizados no tratamento do câncer cervical é a cisplatina. O seu efeito citotóxico é causado pela inibição da transcrição e replicação do DNA das células tumorais resultando em apoptose. A morte das células tumorais induzida pela cisplatina libera as oncoproteínas E6 e E7 que podem ser capturadas por APCs e apresentadas para linfócitos T CD8⁺. Deste modo, a cisplatina pode contribuir, de forma indireta, para a ativação de linfócitos T CD8⁺ E6 ou E7-específicos. Chen et al. (2014) demonstraram que o consorcio da cisplatina à imunoterapia ativa, baseada nas oncoproteínas E6 ou E7 de HPV-16 fusionadas a um domínio da exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*, resultou em melhor efeito terapêutico em camundongos comparado às proteínas isoladas. Uma outra estratégia

promissora foi o consorcio da imunoterapia ativa à imunoterapia passiva. Estes tratamentos visam à utilização de moléculas reguladoras de respostas de linfócitos T. Ao bloquear moléculas inibidoras ou, em contrapartida, ativar moléculas estimuladoras, esses tratamentos modulam a resposta antitumoral de linfócitos T pré-existente. Atualmente, um estudo clínico de fase I/II realizado pela Advaxis Inc, utiliza a vacina ADXS11-001 baseada em *Listeria monocytogenes* recombinante que expressa a oncoproteína E7 de HPV-16 associada a um inibidor de PD-L1, uma molécula supressora de resposta de linfócitos T e B (ADVAXIS INC, 2014). Esse inibidor impede a ligação do PD-L1 no receptor PD-1 e, desta forma, bloqueia a inibição da resposta de linfócitos T. Além do PD-L1, outras moléculas são utilizadas como alvos da imunoterapia passiva: CTLA-4, OX40, 4-1BB, GITR, entre outras. A estratégia vacinal apresentada nesta tese de doutorado também atua neste sentido visto que a proteína gD, pela sua interação com HVEM, pode inibir os mecanismos supressores desencadeados pela ligação do BTLA e do CD160 neste receptor (LASARO et al., 2008, LASARO; ERTL, 2009).

Trabalhos prévios realizados no Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas mostraram que a fusão de antígenos próximos à região C-terminal da proteína gD melhorou a resposta de linfócitos T e B contra os seguintes antígenos em abordagens compostas por vacinas de DNA: **I**) CFA/I de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ALVES et al., 2000), **II**) E6 ou E7 de HPV-16 (LASARO et al., 2005), **III**) E7, E6 e E5 de HPV-16 (DINIZ et al., 2010) e **IV**) p24 do HIV-1 (SANTANA et al., 2013). Do ponto de vista molecular, a inserção de sequências próximo à região C-terminal da proteína gD geraram mudanças conformacionais que expõem o sítio de interação com o receptor HVEM, tornando a ligação entre estas moléculas mais eficiente (LASARO et al., 2008). No presente trabalho de tese, estão demonstrados diversos aspectos da resposta imunológica gerada pela proteína de fusão gDE7 purificada e o papel adjuvante do componente gD nas formulações vacinais testadas. Além de aumentar o efeito terapêutico, a imunização com a proteína gDE7 coadministrada ao poly(I:C) promoveu a ativação dos linfócitos T CD8⁺ E7-específicos mais eficientemente do que a imunização com o antígeno E7 coadministrado ao poly(I:C). Além disso, os linfócitos T CD8⁺ E7-específicos ativados pela formulação vacinal composta pela gDE7 coadministrada ao poly(I:C) possuíam forte atividade citotóxica, em contrapartida, não foi possível detectar linfócitos E7-específicos citotóxicos nos camundongos imunizados com o antígeno E7 coadministrado ao poly(I:C). Além disso, a formulação vacinal compreendida pela proteína gDE7 coadministrada ao poly(I:C) induziu maior proporção de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos polifuncionais e com

fenótipo de memória efetora / efetor, característica que torna estes linfócitos capazes de migrarem e responderem ao encontro com as células tumorais com funções efetoras. De fato, foram encontradas frequências maiores de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos infiltrados na região de implantação das células tumorais/matrigel nos camundongos imunizados com a proteína gDE7coadministrada ao poly(I:C), em relação aos camundongos imunizados com o antígeno E7 coadministrado ao poly(I:C). Portanto, em conjunto com os estudos prévios citados, este trabalho de tese consolida a utilização da proteína gD como plataforma para o desenvolvimento de vacinas cujo objetivo seja a ativação da resposta imune celular efetora, tanto na forma de vacina de DNA como de proteína recombinante purificada.

Alguns fatores do microambiente tumoral limitam a eficácia de vacinas terapêuticas contra tumores associados ao HPV-16. A condição imunossupressora estabelecida dificulta a apresentação de antígenos e conseqüentemente a ativação de linfócitos T. Os tumores cervicais podem produzir quantidades significativas de TGF- β (SHEU et al., 2001). O TGF- β induz a diferenciação de linfócitos T regulatórios (RAO; PETRONE; PONATH, 2005), e desta forma, deve ser um dos mecanismos que leva ao aumento da frequência destas células em pacientes com câncer cervical. Em camundongos saudáveis, os linfócitos T regulatórios representam aproximadamente 2% das células do baço (CHEN et al., 2005). Zurkova et al. (2011) demonstraram a presença de RNAm de TGF- β em células TC-1, o que pode elevar a frequência dos linfócitos T regulatórios também em camundongos com tumores em desenvolvimento. Além dos linfócitos T regulatórios, as MDSCs também contribuem com a imunossupressão mediada por tumores. Em camundongos saudáveis, as MDSCs representam < 4% das células do sangue ou do baço (BRONTE et al., 2000, KUSMARTSEV; GABRILOVICH, 2003; MIKYSKOVA et al., 2012). Distúrbios no balanço de citocinas induzidos pelo crescimento tumoral, infecções, inflamação ou estresse imunológico alteram o equilíbrio dessa população e levam ao acúmulo de MDSCs nos órgãos linfóides e no sangue (SERAFINI et al., 2003). Foi reportado neste trabalho de tese que as frequências dos linfócitos T regulatórios e de MDSCs nos baços dos camundongos imunizados com a proteína gDE7 coadministrada ao poly(I:C) se mantiveram próximas das proporções de camundongos saudáveis, descritas na literatura. Portanto, o controle do desenvolvimento tumoral mediado por essa formulação vacinal teve um impacto negativo na expansão dessas células imunossupressoras.

Lasaro et al. (2008) relacionaram o efeito adjuvante da proteína gD com a capacidade de ligação desta proteína ao receptor HVEM. Os autores sugeriram que o efeito adjuvante da

proteína gD, particularmente para linfócitos T CD8⁺, está relacionado com o bloqueio de sinais inibitórios disparados pela ligação de BTLA (*B and T lymphocyte attenuator*) no receptor HVEM. Em contraste, a ligação da proteína gD no HVEM não interfere na interação de ligantes como LIGHT e LT- α neste receptor, fato que desencadeia sinais coestimuladores para linfócitos e células dendríticas (MURPHY; MURPHY, 2010). Portanto, a proteína gD pode modular a complexa via de sinalização mediada pelo receptor HVEM e, desta forma, beneficiar vias estimuladoras do sistema imune. Adicionalmente, foi proposto que a ligação da proteína gD no receptor HVEM ativa o fator de transcrição NF- κ B (CHEUNG et al., 2009). O efeito das proteínas gD, gDE7 e E7 em células dendríticas foi avaliado neste trabalho de tese. Foi demonstrado que as proteínas gD e gDE7 ligam e ativam mais eficientemente as subpopulações CD11c⁺ CD8 α ⁺ de DCs de camundongos e BDCA3⁺ de DCs humanas, em relação à proteína E7. Essas subpopulações de DCs são reconhecidas pela maior eficiência em apresentação cruzada de antígenos, o que ajudaria a explicar a ativação de resposta robusta de linfócitos T CD8⁺ mediada por um antígeno solúvel. Embora os mecanismos moleculares não tenham sido avaliados neste trabalho, a ativação da subpopulação especializada em apresentação de antígenos mediada pelo componente gD da proteína de fusão gDE7 certamente contribuiu para a elevada proteção antitumoral terapêutica observada nos camundongos imunizados com a formulação gDE7 coadministrada ao poly(I:C).

Os resultados expressos neste trabalho de tese reforçam o papel adjuvante da proteína gD na ativação de linfócitos T CD8⁺ específicos ao antígeno fusionado. Foi mostrado ainda que a proteína de fusão gDE7 coadministrada ao adjuvante poly(I:C) apresentou um efeito sinérgico na montagem e na magnitude das respostas imunológicas E7-específicas bem como na proteção antitumoral terapêutica. Além disso, os resultados sugerem que um dos aspectos do papel adjuvante da proteína gD seja o direcionamento de antígenos a ela fusionados para subpopulações de células dendríticas especializadas em apresentação cruzada de antígenos para linfócitos T CD8⁺, fato que ajuda a explicar a proteção antitumoral terapêutica observada no modelo experimental e de significativa importância para a rejeição de tumores cervicais em humanos.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho de tese realizou avanços importantes na elucidação dos efeitos adjuvantes da proteína gD do HSV-1 nas respostas celulares voltadas a antígenos a ela fusionados. Com base nos dados obtidos e em conjunto com trabalhos disponíveis na literatura, consolida-se a utilização da proteína gD como plataforma para o desenvolvimento de vacinas voltadas para a ativação de respostas celulares efetoras, tanto em abordagens baseadas em vacina de DNA como na proteína recombinante purificada. Nossos resultados indicam ainda que o potencial adjuvante da proteína gD do HSV-1, particularmente para linfócitos T CD8⁺, pode estar relacionado à capacidade de direcionamento do antígeno a ela fusionado para subpopulações de células dendríticas especializadas em apresentação cruzada de antígenos. Embora os mecanismos moleculares não tenham sido analisados especificamente neste trabalho, eles serão objeto de estudos futuros da equipe de pesquisa. O conjunto de dados aqui apresentados abre perspectivas para o emprego da proteína gD do HSV-1 como plataforma vacinal para o controle de tumores induzidos pelo HPV-16.

Por fim é importante destacar que parte dos resultados gerados durante a execução deste trabalho foram divulgados oralmente no 8th *Vaccine and ISV Congress* realizado em 2014, na Philadelphia - Estados Unidos, e na 2^a Bienal Internacional de Oncologia do Hospital A.C Camargo em São Paulo, também em 2014, ocasião em que o trabalho ganhou o prêmio Dr. Fernando Gentil da instituição. Além disso, os resultados apresentados serão publicados em breve em um periódico científico na área.

REFERÊNCIAS*

ADVAXIS INC. **Phase 1-2 Study of ADXS11-001 or MEDI4736 Alone or Combo In Cervical or HPV+ Head & Neck Cancer.** Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02291055>>. Acesso em: 1 set. 2015.

ALVES, A. M. B et al. DNA immunisation against the CFA/I fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). **Vaccine**, v. 19, n. 7, p. 788-795, 2000.

AMMI, R. et al. Poly(I:C) as cancer vaccine adjuvant: knocking on the door of medical breakthroughs. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 146, p. 120-131, 2015.

BACHEM, A. et al. Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c+ CD141+ cells as homologues of mouse CD8+ dendritic cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 207, n. 6, p. 1273-1281, 2010.

BAGARAZZI, M. L. et al. Immunotherapy against HPV16/18 generates potent TH1 and cytotoxic cellular immune responses. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 155, p. 155ra138-155ra138, 2012.

BALDWIN, P. J. et al. Vaccinia-expressed human papillomavirus 16 and 18 e6 and e7 as a therapeutic vaccination for vulval and vaginal intraepithelial neoplasia. **Clinical Cancer Research**, v. 9, n. 14, p. 5205-5213, 2003.

BARBER, D. L.; WHERREY, E.J.; AHMED, R. Cutting Edge: in vivo killing by memory CD8 T cells. **Journal of Immunology**, v.171, p. 27-31, 2003.

BARRIOS, K.; CELIS, E. TriVax-HPV: an improved peptide-based therapeutic vaccination strategy against human papillomavirus-induced cancers. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 61, n. 8, p. 1307-1317, 2012.

BATTAGLIA, A. et al. Metastatic tumour cells favour the generation of a tolerogenic milieu in tumour draining lymph node in patients with early cervical cancer. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 58, n. 9, p. 1363-1373, 2009.

BENWELL, R. K. et al. Double stranded RNA-relative to other TLR ligand-activated dendritic cells induce extremely polarized human Th1 responses. **Cellular Immunology**, v. 264, n. 2, p. 119-126, 2010.

*De acordo com:

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

BEVAN, M. J. Helping the CD8⁺ T-cell response. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 8, p. 595-602, 2004.

BODE, C. et al. CpG DNA as a vaccine adjuvant. **Expert Reviews Vaccines**, v. 10, n. 4, p. 499-511, 2011.

BOLPETTI, A. et al. Interleukin-10 production by tumor infiltrating macrophages plays a role in Human Papillomavirus 16 tumor growth. **BMC immunology**, v. 11, n. 1, p. 27, 2010.

BORECKÝ, L.; LACKOVIC, V.; ROVENSKÝ, J. Therapeutic use of double-stranded RNAs in man. **Texas Reports on Biology and Medicine**, v. 41, p. 575-581, 1980.

BORYSIEWICZ, L. K. et al. A recombinant vaccinia virus encoding human papillomavirus types 16 and 18, E6 and E7 proteins as immunotherapy for cervical cancer. **The Lancet**, v. 347, n. 9014, p. 1523-1527, 1996.

BRONTE, V. et al. Identification of a CD11b⁺/Gr-1⁺/CD31⁺ myeloid progenitor capable of activating or suppressing CD8⁺ T cells. **Blood**, v. 96, n. 12, p. 3838-3846, 2000.

BRONTE, V. et al. Tumor-induced immune dysfunctions caused by myeloid suppressor cells. **Journal of Immunotherapy**, v. 24, n. 6, p. 431-446, 2001.

BUONAGURO, L. et al. Translating tumor antigens into cancer vaccines. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 18, n. 1, p. 23-34, 2011.

CAI, G. et al. CD160 inhibits activation of human CD4⁺ T cells through interaction with herpesvirus entry mediator. **Nature Immunology**, v. 9, n. 2, p. 176-185, 2008.

CAI, G. FREEMAN, G. J. The CD160, BTLA, LIGHT/HVEM pathway: a bidirectional switch regulating T-cell activation. **Immunological Reviews**, v. 229, n. 1, p. 244-258, 2009.

CARTER, W. A.; DE CLERCQ, E. Viral infection and host defense. **Science**, v. 186, n. 4170, p. 1172-1178, 1974.

CARTER, W. A. et al. An Integrated and Comparative Study of the Antiviral Effects and Other Biological Properties of the Polyinosinic· Polycytidylic Acid Duplex and Its Mismatched Analogues III. Chronic Effects and Immunological Features. **Molecular Pharmacology**, v. 12, n. 3, p. 440-453, 1976.

CHANG, L. et al. Toll-like receptor 9 agonist enhances anti-tumor immunity and inhibits tumor-associated immunosuppressive cells numbers in a mouse cervical cancer model following recombinant lipoprotein therapy. **Molecular Cancer**, v. 13, n. 1, p. 1-13, 2014.

CHEEVER, M. A. Twelve immunotherapy drugs that could cure cancers. **Immunological Reviews**, v. 222, n. 1, p. 357-368, 2008.

CHEN, X.; OPPENHEIM, J. J.; HOWARD, O. M. Z. BALB/c mice have more CD4+ CD25+ T regulatory cells and show greater susceptibility to suppression of their CD4+ CD25- responder T cells than C57BL/6 mice. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 78, n. 1, p. 114-121, 2005.

CHEN, S. et al. De-oncogenic HPV E6/E7 vaccine gets enhanced antigenicity and promotes tumoricidal synergy with cisplatin. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 46, n. 1, p. 6-14, 2014.

CHENG, W. F. et al. CD8+ T cells, NK cells and IFN- γ are important for control of tumor with downregulated MHC class I expression by DNA vaccination. **Gene Therapy**, v. 10, n. 16, p. 1311-1320, 2003.

CHENG, Y.; XU, F. Anticancer function of polyinosinic-polycytidylic acid. **Cancer Biology & Therapy**, v. 10, n. 12, p. 1219-1223, 2010.

CHEUNG, T. C. et al. Unconventional ligand activation of herpesvirus entry mediator signals cell survival. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 15, 6244-6249, 2009.

CHO, H. et al. BiVax: a peptide/poly-IC subunit vaccine that mimics an acute infection elicits vast and effective anti-tumor CD8 T-cell responses. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 62, n. 4, p. 787-799, 2013.

CHU, N. R. et al. Immunotherapy of a human papillomavirus (HPV) type 16 E7-expressing tumour by administration of fusion protein comprising Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guérin (BCG) hsp65 and HPV16 E7. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 121, n. 2, p. 216-225, 2000.

CHUANG, C. et al. Treatment with Imiquimod enhances antitumor immunity induced by therapeutic HPV DNA vaccination. **Journal of Biomedical Science**, v.17, n. 32, 2010.

DAAYANA, S. et al. Phase II trial of imiquimod and HPV therapeutic vaccination in patients with vulval intraepithelial neoplasia. **British Journal of Cancer**, v. 102, n. 7, p. 1129-1136, 2010.

DAVIDSON, E. J. et al. Effect of TA-CIN (HPV 16 L2E6E7) booster immunisation in vulval intraepithelial neoplasia patients previously vaccinated with TA-HPV (vaccinia virus encoding HPV 16/18 E6E7). **Vaccine**, v. 22, n. 21, p. 2722-2729, 2004.

DE ALENCAR, B. C. G. et al. Perforin and gamma interferon expression are required for CD4+ and CD8+ T-cell-dependent protective immunity against a human parasite, *Trypanosoma cruzi*, elicited by heterologous plasmid DNA prime-recombinant adenovirus 5 boost vaccination. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 10, p. 4383-4395, 2009.

DE CLERCQ, E. Interferon and its inducers—a never-ending story: “old” and “new” data in a new perspective. **Journal of Infectious Diseases**, v. 194, p. S19-S26, 2006. Supp 1.

DE JONG, A. et al. Enhancement of human papillomavirus (HPV) type 16 E6 and E7-specific T-cell immunity in healthy volunteers through vaccination with TA-CIN, an HPV16 L2E7E6 fusion protein vaccine. **Vaccine**, v. 20, n. 29, p. 3456-3464, 2002.

DELIGEOROGLOU, E. et al. HPV infection: immunological aspects and their utility in future therapy. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, v. 2013, 2013.

DEL RIO, M. L. et al. HVEM/LIGHT/BTLA/CD160 cosignaling pathways as targets for immune regulation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 87, p. 223-235, 2010.

DERKAY, C. S. et al. HspE7 treatment of pediatric recurrent respiratory papillomatosis: final results of an open-label trial. **Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology**, v. 114, n. 9, p. 730-737, 2005.

DE ROSA, S. C. et al. Vaccination in humans generates broad T cell cytokine responses. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 9, p. 5372-5380, 2004.

DING, Z. et al. Polyfunctional CD4⁺ T cells are essential for eradicating advanced B-cell lymphoma after chemotherapy. **Blood**, v. 120, n. 11, p. 2229-2239, 2012.

DINIZ, M. O. et al. Immune responses and therapeutic antitumor effects of an experimental DNA vaccine encoding human papillomavirus type 16 oncoproteins genetically fused to herpesvirus glycoprotein D. **Clinical Vaccine Immunology**, v. 17, n. 10, p. 1576-1583, 2010.

DINIZ, M. O. et al. Enhanced therapeutic effects conferred by an experimental DNA vaccine targeting human papillomavirus-induced tumors. **Human Gene Therapy**, v. 24, n. 10, p. 861-870, 2013.

DOMINGOS-PEREIRA, S. et al. Intravaginal TLR agonists increase local vaccine-specific CD8 T cells and human papillomavirus-associated genital-tumor regression in mice. **Mucosal Immunology**, v. 6, n. 2, p. 393-404, 2013.

DÜRST, M. et al. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 80, n. 12, p. 3812-3815, 1983.

EGAWA, N. et al. Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia. **Viruses**, v. 7, n. 7, p. 3863-3890, 2015.

FARRAND, K. J. et al. Langerin⁺ CD8 α ⁺ dendritic cells are critical for cross-priming and IL-12 production in response to systemic antigens. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 12, p. 7732-7742, 2009.

FELTKAMP, M. C. W. et al. Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope-containing peptide protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16-transformed cells. **European Journal of Immunology**, v. 23, n. 9, p. 2242-2249, 1993.

FRAZER, I. H. et al. Phase 1 study of HPV16-specific immunotherapy with E6E7 fusion protein and ISCOMATRIX™ adjuvant in women with cervical intraepithelial neoplasia. **Vaccine**, v. 23, n. 2, p. 172-181, 2004.

GABRILOVICH, D. Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 12, p. 941-952, 2004.

GERBERICK, G. F. et al. Selective modulation of T cell memory markers CD62L and CD44 on murine draining lymph node cells following allergen and irritant treatment. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 146, n. 1, p. 1-10, 1997.

GETT, A. V. et al. T cell fitness determined by signal strength. **Nature Immunology**, v. 4, n. 4, p. 355-360, 2003.

GISSMANN, L.; ZUR HAUSEN, H. Partial characterization of viral DNA from human genital warts (*Condylomata acuminata*). **International Journal of Cancer**, v. 25, n. 5, p. 605-609, 1980.

GOLDSTONE, S. E. et al. Activity of HspE7, a novel immunotherapy, in patients with anogenital warts. **Diseases of the Colon & Rectum**, v. 45, n. 4, p. 502-507, 2002.

HALLEZ, S. et al. Phase I/II trial of immunogenicity of a human papillomavirus (HPV) type 16 E7 protein-based vaccine in women with oncogenic HPV-positive cervical intraepithelial neoplasia. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 53, n. 7, p. 642-650, 2004.

HAMMES, L. S. et al. Macrophages, inflammation and risk of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) progression—clinicopathological correlation. **Gynecologic Oncology**, v. 105, n. 1, p. 157-165, 2007.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HARARI, A. et al. Functional signatures of protective antiviral T-cell immunity in human virus infections. **Immunological Reviews**, v. 211, n. 1, p. 236-254, 2006.

HEATH, W. R. et al. Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. **Immunological Reviews**, v. 199, n. 1, p. 9-26, 2004.

HELDWEIN, E. E.; KRUMMENACHER, C. Entry of herpesviruses into mammalian cells. **Cell Molecular Life Sciences**. v. 65, n. 11, p. 1653-1668, 2008.

HERVAS-STUBBS, S. et al. TLR3 ligand stimulates fully functional memory CD8+ T cells in the absence of CD4+ T-cell help. **Blood**, v. 109, n. 12, p. 5318-5326, 2007.

HOCHREIN, H. et al. Differential production of IL-12, IFN- α , and IFN- γ by mouse dendritic cell subsets. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 9, p. 5448-5455, 2001.

HOMAN, E. R. et al. Studies on poly I: C toxicity in experimental animals. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 23, n. 4, p. 579-588, 1972.

HOWLEY, P. M. Role of the human papillomaviruses in human cancer. **Cancer Research**, v. 51, n. 18, p. 5019s-5022s, 1991. Suppl.

HUNG, C. F. et al. DNA vaccines for cervical cancer: from bench to bedside. **Experimental & Molecular Medicine**. v. 39, n. 6, p. 679-689, 2007.

IEZZI, G.; SCHEIDEGGER, D.; LANZAVECCHIA, A. Migration and function of antigen-primed nonpolarized T lymphocytes in vivo. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 193, n. 8, p. 987-994, 2001.

JACKSON, S. et al. Role of Bak in UV-induced apoptosis in skin cancer and abrogation by HPV E6 proteins. **Genes & Development**, v. 14, n. 23, p. 3065-3073, 2000.

JANSSEN, E. M. et al. CD4 T cells are required for secondary expansion and memory in CD8 T lymphocytes. **Nature** v. 421, p. 852–856. 2003.

JOFFRE, O. P. et al. Cross-presentation by dendritic cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 8, p. 557-569, 2012.

JU, X.; CLARK, G.; HART, D. N. J. Review of human DC subtypes. In: NAIK, S. H. (Ed.) **Dendritic Cell Protocols**. Humana Press, 2010. p. 3-20.

JUNG, S. et al. In vivo depletion of CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens. **Immunity**, v. 17, n. 2, p. 211-220, 2002.

KAUFMANN, A. M. et al. Safety and immunogenicity of TA-HPV, a recombinant vaccinia virus expressing modified human papillomavirus (HPV)-16 and HPV-18 E6 and E7 genes, in women with progressive cervical cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 8, n. 12, p. 3676-3685, 2002.

KENTER, G. G. et al. Phase I immunotherapeutic trial with long peptides spanning the E6 and E7 sequences of high-risk human papillomavirus 16 in end-stage cervical cancer patients shows low toxicity and robust immunogenicity. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 1, p. 169-177, 2008.

KIM, T. J. et al. Clearance of persistent HPV infection and cervical lesion by therapeutic DNA vaccine in CIN3 patients. **Nature Communications**, v. 5, 2014.

KIMA, D. et al., DNA vaccine with β -galactosylceramide at prime phase enhances anti-tumor immunity after boosting with antigen-expressing dendritic cells. **Vaccine**, v. 28, n. 45, p. 7297–7305, 2010.

KOBAYASHI, A. et al. Evolving immunosuppressive microenvironment during human cervical carcinogenesis. **Mucosal Immunology**, v. 1, n. 5, p. 412-420, 2008.

KUSMARTSEV, S.; GABRILOVICH, D. I. Immature myeloid cells and cancer-associated immune suppression. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 51, n. 6, p. 293-298, 2002.

KUSMARTSEV, S.; GABRILOVICH, D. I. Inhibition of myeloid cell differentiation in cancer: the role of reactive oxygen species. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 74, n. 2, p. 186-196, 2003.

LANGENKAMP, A. et al. T cell priming by dendritic cells: thresholds for proliferation, differentiation and death and intraclonal functional diversification. **European Journal of Immunology**, v. 32, n. 7, p. 2046-2054, 2002.

LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F. Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells. **Science**, v. 290, n. 5489, p. 92-97, 2000.

LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F. Progressive differentiation and selection of the fittest in the immune response. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 12, p. 982-987, 2002.

LASARO, M. O. et al. Anti-tumor DNA vaccines based on the expression of human papillomavirus-16 E6/E7 oncoproteins genetically fused with the glycoprotein D from herpes simplex virus-1. **Microbes and Infection**, v. 7, n. 15, p. 1541-1550, 2005.

LASARO, M. O. et al. Targeting of antigen to the herpesvirus entry mediator augments primary adaptive immune responses. **Nature Medicine**, v. 14, n. 2, p. 205-212, 2008.

LASARO, M. O.; ERTL, H. C. J. Potentiating vaccine immunogenicity by manipulating the HVEM/BTLA pathway and other co-stimulatory and co-inhibitory signals of the immune system. **Human Vaccines**, v. 5, n. 1, p. 6-14, 2009.

LION, E. et al. Poly (I: C) enhances the susceptibility of leukemic cells to NK cell cytotoxicity and phagocytosis by DC. **PloS One**, v. 6, n. 6, p. e20952, 2011.

LIN, K. Y. et al. Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. **Cancer Research**, v. 56, p. 21-26, 1996.

LIN, K et al. Therapeutic HPV DNA vaccines. **Immunologic Research**, v. 47, n. 1-3, p. 86-112, 2010.

LIU, H. et al. Induction of CD4-independent E7-specific CD8+ memory response by heat shock fusion protein. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 8, p. 1013-1023, 2007.

LONGHI, M. P. et al. Dendritic cells require a systemic type I interferon response to mature and induce CD4+ Th1 immunity with poly IC as adjuvant. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 206, n. 7, p. 1589-1602, 2009.

MANJUNATH, N. et al. Effector differentiation is not prerequisite for generation of memory cytotoxic T lymphocytes. **Journal of Clinical Investigation**, v. 108, n. 6, p. 871, 2001.

MATSUMOTO, M.; SEYA, T. TLR3: interferon induction by double-stranded RNA including poly (I: C). **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 7, p. 805-812, 2008.

MCBRIDE, S. et al. Cell-associated double-stranded RNA enhances antitumor activity through the production of type I IFN. **Journal of Immunology**, v. 177, n. 9, p. 6122-6128, 2006.

MIKYŠKOVÁ, R. et al. Cyclophosphamide-induced myeloid-derived suppressor cell population is immunosuppressive but not identical to myeloid-derived suppressor cells induced by growing TC-1 tumors. **Journal of Immunotherapy**, v. 35, n. 5, p. 374-384, 2012.

MOSCICKI, A.B. et al. Persistence of human papillomavirus infection in HIV-infected and uninfected adolescent girls: risk factors and differences, by phylogenetic type. **Journal of Infectious Diseases**, v. 190, n. 1, p. 37-45, 2004.

MURPHY, T. L.; MURPHY, K.M. Slow down and survive: Enigmatic immunoregulation by BTLA and HVEM. **Annual Reviews Immunology**. v. 28, p. 389-411, 2010.

NATALE, C. et al. Computer-assisted analysis of molecular mimicry between human papillomavirus 16 E7 oncoprotein and human protein sequences. **Immunology and Cell Biology**, v. 78, n. 6, p. 580-585, 2000.

NVENTA BIOPHARMACEUTICALS. **Safety study to test the safety of HspE7 and Poly-ICLC given in patients with cervical intraepithelial neoplasia**. Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00493545>>. Acesso em: 30 ago. 2015.

OBAR, J. J.; LEFRANÇOIS, L. Memory CD8+ T cell differentiation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1183, n. 1, p. 251-266, 2010.

PETSCH, D.; ANSPACH, F. B. Endotoxin removal from protein solutions. **Journal of Biotechnology**, v. 76, n. 2, p. 97-119, 2000.

PINTO, L. A. et al. HPV-16 L1 VLP vaccine elicits a broad-spectrum of cytokine responses in whole blood. **Vaccine**, v. 23, n. 27, p. 3555-3564, 2005.

PINTO, L. A. et al. Cellular immune responses to human papillomavirus (HPV) -16 L1 in healthy volunteers immunized with recombinant HPV-16 L1 virus-like particles. **Journal of Infectious Disease**, v. 188, p. 327-38, 2005.

PICHLMAIR, A.; REIS E SOUSA, C. Innate recognition of viruses. **Immunity**, v. 27, n. 3, p. 370-383, 2007.

PIERSMA, S. J. et al. High number of intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes is associated with the absence of lymph node metastases in patients with large early-stage cervical cancer. **Cancer Research**, v. 67, n. 1, p. 354-361, 2007.

PHILLIPS, B. M. et al. Systemic toxicity of polyinosinic acid: polycytidylic acid in rodents and dogs. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 18, n. 1, p. 220-230, 1971.

POLLARA, G. et al. Herpes simplex virus type-1-induced activation of myeloid dendritic cells: the roles of virus cell interaction and paracrine type I IFN secretion. **Journal of Immunology**, v. 173, p. 4.108-4.119, 2004.

PORCHIA, B. F. M. M. et al. Purified Herpes Simplex Type 1 Glycoprotein D (gD) Genetically Fused with the Type 16 Human Papillomavirus E7 Oncoprotein Enhances Antigen-Specific CD8+ T Cell Responses and Confers Protective Antitumor Immunity. **Molecular Pharmaceutics**, v. 8, n. 6, p. 2320-2330, 2011.

PRECOPIO, M. L. et al. 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, 2007.

RAO, P. E.; PETRONE, A. L.; PONATH, P. D. Differentiation and expansion of T cells with regulatory function from human peripheral lymphocytes by stimulation in the presence of TGF- β . **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 3, p. 1446-1455, 2005.

RIZZUTO, G. A. et al. 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, 2009.

ROBBINS, S. H. et al. Novel insights into the relationships between dendritic cell subsets in human and mouse revealed by genome-wide expression profiling. **Genome Biology**, v. 9, n. 1, p. R17, 2008.

ROBSON, N. C. et al. Presentation of tumour antigens by dendritic cells and challenges faced. **Current Opinion in Immunology**, v. 22, n. 1, p. 137-144, 2010.

ROCHE, P. A.; FURUTA, K. The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 4, p. 203-216, 2015.

RODRIGUES, J. F. et al. Functional diversity of heat-labile toxins (LT) produced by Enterotoxigenic *Escherichia coli*: differential enzymatic and immunological activities of LT1 (hLT) and LT4 (pLT). **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 7, p. 5222-5233, 2011.

ROMAN, L. D. et al. A phase II study of Hsp-7 (SGN-00101) in women with high-grade cervical intraepithelial neoplasia. **Gynecologic Oncology**, v. 106, n. 3, p. 558-566, 2007.

ROMAN A.; MUNGER, K. The papillomavirus E7 proteins. **Virology**, v. 445, p. 138-168, 2013.

ROSA, D. S. et al. A DNA vaccine encoding multiple HIV CD4 epitopes elicits vigorous polyfunctional, long-lived CD4+ and CD8+ T cell responses. **PLoS One**, v. 6, n. 2, p. e16921, 2011.

SALEM, M. L. et al. The TLR3 agonist poly (I: C) targets CD8+ T cells and augments their antigen-specific responses upon their adoptive transfer into naive recipient mice. **Vaccine**, v. 27, n. 4, p. 549-557, 2009.

SALLUSTO, F. et al. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. **Nature**, v. 401, n. 6754, p. 708-712, 1999.

SALLUSTO, F.; GEGINAT, J.; LANZAVECCHIA, A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. **Annual Review Immunology**, v. 22, p. 745-763, 2004.

SANTANA, V. C. et al. Bicistronic DNA vaccines simultaneously encoding HIV, HSV and HPV antigens promote CD8 (+) T cell responses and protective immunity. **PloS One**, v. 8, n. 8, p. e71322, 2013.

SCIORTINO, M. T. et al. Involvement of HVEM receptor in activation of nuclear factor kappa B by herpes simplex virus 1 glycoprotein D. **Cell Microbiology**, v. 10, n. 11, p. 2297-2311, 2008.

SCIORTINO, M. T. et al. Involvement of gD/HVEM interaction in NF-kB-dependent inhibition of apoptosis by HSV-1 gD. **Biochemical Pharmacology**, v. 76, n.11, p. 1522-1532, 2008.

SCOTT, M. E. et al. Diminished IFN- γ and IL-10 and elevated Foxp3 mRNA expression in the cervix are associated with CIN 2 or 3. **International Journal of Cancer**, v. 124, n. 6, p. 1379-1383, 2009.

SEDER, R. A.; HILL, A. V. Vaccines against intracellular infections requiring cellular immunity. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 793-798, 2000.

ŠEDÝ, J. R.; SPEAR, P. G.; WARE, C. F. Cross-regulation between herpesviruses and the TNF superfamily members. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 11, p. 861-873, 2008.

SEO, S. et al. Optimal induction of HPV DNA vaccine-induced CD8+ T cell responses and therapeutic antitumor effect by antigen engineering and electroporation. **Vaccine**, v. 27, n. 42, p. 5906-5912, 2009.

SERAFINI, P. et al. Derangement of immune responses by myeloid suppressor cells. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 53, n. 2, p. 64-72, 2004.

SHARMA, R. K. et al. SA-4-1BBL as the immunomodulatory component of a HPV-16 E7 protein based vaccine shows robust therapeutic efficacy in a mouse cervical cancer model. **Vaccine**, v. 28, n. 36, p. 5794-5802, 2010.

SHEETS, E. E. et al. Immunotherapy of human cervical high-grade cervical intraepithelial neoplasia with microparticle-delivered human papillomavirus 16 E7 plasmid DNA. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 188, n. 4, p. 916-926, 2003.

SHEU, B. et al. Predominant Th2/Tc2 polarity of tumor-infiltrating lymphocytes in human cervical cancer. **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 5, p. 2972-2978, 2001.

SHORTMAN, K.; HEATH, W. R. The CD8+ dendritic cell subset. **Immunological Reviews**, v. 234, n. 1, p. 18-31, 2010.

SINHA, P. et al. Tumor immunity: a balancing act between T cell activation, macrophage activation and tumor-induced immune suppression. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 54, n. 11, p. 1137-1142, 2005.

SMITH, J. S. et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: A meta-analysis update. **International Journal of Cancer**, v. 121, n. 3, p. 621-632, 2007.

SMITS, E. L. J. M. et al. Proinflammatory response of human leukemic cells to dsRNA transfection linked to activation of dendritic cells. **Leukemia**, v. 21, n. 8, p. 1691-1699, 2007.

SMOTKIN, D.; WETTSTEIN, F. O. The major human papillomavirus protein in cervical cancers is a cytoplasmic phosphoprotein. **Journal of Virology**, v. 61, n. 5, p. 1686-1689, 1987.

STEELE, J. C. et al. T-cell responses to human papillomavirus type 16 among women with different grades of cervical neoplasia. **British Journal of Cancer**, v. 93, n. 2, p. 248-259, 2005.

STILES, K. M. et al. Herpes simplex virus glycoprotein D interferes with binding of herpesvirus entry mediator to its ligands through downregulation and direct competition. **Journal of Virology**, v. 84, n. 22, p. 11646-11660, 2010.

STONE, S. C. et al. HPV16-associated tumors control myeloid cell homeostasis in lymphoid organs, generating a suppressor environment for T cells. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 96, n. 4, p. 619-631, 2014.

SUN, J. C.; BEVAN, M. J. Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. **Science**, v. 300, n. 5617, p. 339-342, 2003.

SWANN, J. B.; SMYTH, M. J. Immune surveillance of tumors. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 5, p. 1137, 2007.

TANIGUCHI, T.; MINAMI, Y. The IL-2/IL-2 receptor system: a current overview. **Cell**, v. 73, n. 1, p. 5-8, 1993.

TAO R. et al. Regulatory T cell expression of herpesvirus entry mediator suppresses the function of B and T lymphocyte attenuator-positive effector T cells. **Journal of Immunology**, v. 180, n. 10, p. 6649-6655, 2008.

TINDLE, R. W. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 1, p. 59-64, 2002.

TRIMBLE, C. L. et al. Naturally occurring systemic immune responses to HPV antigens do not predict regression of CIN2/3. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 59, n. 5, p. 799-803, 2010.

TYNAN, G. A. et al. Polymyxin B inadequately quenches the effects of contaminating lipopolysaccharide on murine dendritic cells. **PloS One**, v. 7, n. 5, p. e37261, 2012.

VALDOVINOS-TORRES, H. et al. Different isoforms of HPV-16 E7 protein are present in cytoplasm and nucleus. **The Open Virology Journal**, v. 2, p. 15, 2008.

VAN DER BURG, S. H. et al. 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, 2007.

VAN DER BURG, S. H.; PALEFSKY, J. M. Human immunodeficiency virus and human papilloma virus-why HPV-induced lesions do not spontaneously resolve and why therapeutic vaccination can be successful. **Journal of Translational Medicine**, v. 7, p. 108, 2009.

VAN DER BURG, S. H.; MELIEF, C. J. M. Therapeutic vaccination against human papilloma virus induced malignancies. **Current Opinion in Immunology**, v. 23, n. 2, p. 252-257, 2011.

VAN DUIKEREN, S. et al. Vaccine-induced effector-memory CD8+ T cell responses predict therapeutic efficacy against tumors. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 7, p. 3397-3403, 2012.

VELDMAN, T. et al. Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. **Journal of Virology**, v. 75, n. 9, p. 4467-4472, 2001.

VILLA, L. L. et al. Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomized double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. **Lancet Oncology**, v. 6, p. 271-278, 2005.

VILLA, L.L. et al. Immunologic responses following administration of a vaccine targeting human papillomavirus types 6, 11, 16 and 18. **Vaccine**, v. 24, p. 5571-5583, 2006.

WANG, Y. et al. The role of herpesvirus entry mediator as a negative regulator of T cell-mediated responses. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 3, p. 711-717, 2005.

WELTERS, M. J. P. et al. 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, 2006.

WELTERS, M. J. P. et al. Induction of tumor-specific CD4+ and CD8+ T-cell immunity in cervical cancer patients by a human papillomavirus type 16 E6 and E7 long peptides vaccine. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 1, p. 178-187, 2008.

WENINGER, W. et al. Migratory properties of naive, effector, and memory CD8+ T cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 194, n. 7, p. 953-966, 2001.

WILCOX, R. A. Cancer-associated myeloproliferation: old association, new therapeutic target. In: **Mayo Clinic Proceedings**. Elsevier, 2010. p. 656-663.

WILLIAMS, M. A.; BEVAN, M. J. Effector and memory CTL differentiation. **Annual Reviews Immunology**, v. 25, p. 171-192, 2007.

WU, C. et al. Distinct lineages of TH1 cells have differential capacities for memory cell generation in vivo. **Nature Immunology**, v. 3, n. 9, p. 852-858, 2002.

YOUN, J. et al. Characterization of the nature of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 91, n. 1, p. 167-181, 2012.

YUGAWA, T; KIYONO, T. Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins. **Reviews in Medical Virology**, v. 19, n. 2, p. 97-113, 2009.

ZHANG, T. T. et al. LAH4 enhances CD8+ T cell immunity of protein/peptide-based vaccines. **Vaccine**, v. 30, n. 4, p. 784-793, 2012.

ZUR HAUSEN, H. Papillomavirus infections—a major cause of human cancers. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-reviews on cancer**, v. 1288, n. 2, p. F55-F78, 1996.

ZUR HAUSEN, H. Perspectives of contemporary papillomavirus research. **Vaccine**, v. 24, p. iii-iv, 2006.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses in the causation of human cancers—a brief historical account. **Virology**, v. 384, n. 2, p. 260-265, 2009.

ZURKOVA, K. et al. Expression of soluble TGF- β receptor II by recombinant Vaccinia virus enhances E7 specific immunotherapy of HPV16 tumors. **Neoplasma**, v. 58, n. 3, p. 181, 2011.

APÊNDICE A – Súmula Curricular

1) **Formação**

Ano Título ou atividade Instituição

2005	Graduação	Faculdade de Ciências e Letras de Assis - UNESP
2010	Mestrado	Instituto de Ciências Biomédicas - USP
Atual	Doutorado	Instituto de Ciências Biomédicas – USP

2) **Histórico profissional.**

- 2007-2010 - Mestrado, Instituto de Ciências Biomédicas, USP, São Paulo, sob orientação de Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira.
- 2011-atual – Doutorado, Instituto de Ciências Biomédicas, USP, São Paulo, sob orientação de Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira.

3) **Artigos Publicados**

- FARINHA-ARCIERI, L. E., **PORCHIA, B. M.**, CARROMEU, C., SIMABUCO, F. M., TAMURA, R. E., FERREIRA, L. C., ... & VENTURA, A. M. (2008). Expression and purification of a recombinant adenovirus fiber knob in a baculovirus system. *Intervirology*, 51(3), 189-195.
- AMORIM, J. H., **PORCHIA, B. F.**, BALAN, A., CAVALCANTE, R. C., DA COSTA, S. M., DE BARCELOS ALVES, A. M., & DE SOUZA FERREIRA, L. C. (2010). Refolded dengue virus type 2 NS1 protein expressed in *Escherichia coli* preserves structural and immunological properties of the native protein. *Journal of virological methods*, 167(2), 186-192.
- ALBERTS CC, RIBEIRO-PAES JT, ARANDA-SELVERIO G, CURSINO-SANTOS JR, MORENO-COTULIO VR, OLIVEIRA AL, **PORCHIA BF**, SANTOS WF, SOUZA EB. (2010). DNA extraction from hair shafts of wild Brazilian felids and canids. *Genet Mol Res.* 9(4), 2429-35.

- **PORCHIA, B. F.**, DINIZ, M. O., CARIRI, F. A., SANTANA, V. C., AMORIM, J. H., BALAN, A., ... & FERREIRA, L. C. S. (2011). Purified Herpes Simplex Type 1 Glycoprotein D (gD) Genetically Fused with the Type 16 Human Papillomavirus E7 Oncoprotein Enhances Antigen-Specific CD8+ T Cell Responses and Confers Protective Antitumor Immunity. *Molecular pharmaceutics*, 8(6), 2320-2330.
- APS, L. R., DINIZ, M. O., **PORCHIA, B. F.**, SALES, N. S., MORENO, A. C. R., & FERREIRA, L. C. (2015). Bacillus subtilis spores as adjuvants for DNA vaccines. *Vaccine*, 33(20), 2328-2334.

4) **Participações em Congressos**

- Comunicações com congressos: 8 nacional
- Apresentação oral em congressos: 1 nacional, 1 internacional

Outras informações:

Premiações

- Prêmio Dr. Fernando Gentil - II Bienal Internacional em Oncologia. Melhor trabalho em oncologia. Título: “Impacto de uma formulação vacinal terapêutica na ativação de células dendríticas e indução de resposta imune efetora mediada por linfócitos T CD8 específicos: uma alternativa inovadora para o controle. A. C. Camargo Cancer Center – 06 a 08/11/2014.

Depósito de pedido de patente

- “ Proteína híbrida, sequência de ácidos nucléicos recombinante, vetores/plasmídeos, formulações farmacêuticas e/ou veterinárias e seus usos no controle de tumores induzidos pelo vírus do papiloma humano e/ou doenças infecciosas ou degenerativas”. PI 1003749-7 A2

Purified Herpes Simplex Type 1 Glycoprotein D (gD) Genetically Fused with the Type 16 Human Papillomavirus E7 Oncoprotein Enhances Antigen-Specific CD8⁺ T Cell Responses and Confers Protective Antitumor Immunity

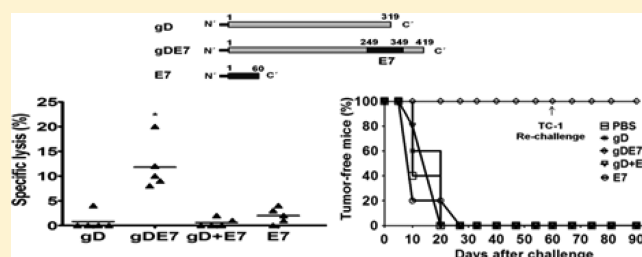
Bruna F. M. M. Porchia,^{†,‡} Mariana O. Diniz,^{†,‡} Francisco A. M. O. Cariri,[†] Vinícius C. Santana,[†] Jaime H. Amorim,[†] Andrea Balan,[§] Catarina J. M. Braga,[†] and Luís Carlos S. Ferreira^{*,†}

[†]Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

[§]Center of Research in Energy and Materials, Brazilian National Laboratory of Biosciences (LNBio), Campinas, São Paulo, Brazil

ABSTRACT: Type 1 herpes virus (HSV-1) glycoprotein D (gD) enhances antigen-specific immune responses, particularly CD8⁺ T cell responses, in mice immunized with DNA vaccines encoding hybrid proteins genetically fused with the target antigen at a site near the C-terminal end. These effects are attributed to the interaction of gD with the herpes virus entry mediator (HVEM) and the concomitant blockade of a coinhibitory mechanism mediated by the B- and T-lymphocyte attenuator (BTLA). However, questions concerning the requirement for endogenous synthesis of the antigen or the adjuvant/antigen fusion itself have not been addressed so far. In the present study, we investigated these points using purified recombinant gDs, genetically fused or not with type 16 papilloma virus (HPV-16) E7 oncoprotein. Soluble recombinant gDs, but not denatured forms, retained the ability to bind surface-exposed cellular receptors of HVEM-expressing U937 cells. In addition, *in vivo* administration of the recombinant proteins, particularly gD genetically fused with E7 (gDE7), promoted the activation of dendritic cells (DC) and antigen-specific cytotoxic CD8⁺ T cells. More relevantly, mice immunized with the gDE7 protein developed complete preventive and partial therapeutic antitumor protection, as measured in mice following the implantation of TC-1 cells expressing HPV-16 oncoproteins. Collectively, these results demonstrate that the T cell adjuvant effects of the HSV-1 gD protein did not require endogenous synthesis and could be demonstrated in mice immunized with purified recombinant proteins.

KEYWORDS: HPV-16, papillomavirus vaccines, gD, HSV-1, E7 oncoprotein, anticancer vaccines



1. INTRODUCTION

Modulation of T cell activity is a challenge for modern vaccinology, and the search for new adjuvants that can induce appropriate activation of T cells, particularly antigen-specific cytotoxic CD8⁺ T cells, is a top priority.^{1,2} Recent results demonstrated that modulation of herpes virus entry mediator (HVEM), a member of the tumor necrosis factor receptor (TNFR) family, can exert strong immunomodulatory effects that influence the survival, proliferation, and differentiation of T cells.³ HVEM, as well as its agonists, is broadly expressed on a variety of immune system cells, including hematopoietic cells such as resting T cells, monocytes and immature dendritic cells (DC).^{4–8} When bound to LIGHT or lymphotoxin α (LT α), which are members of the TNF superfamily, HVEM deploys costimulatory signals that ultimately lead to T cell activation following an encounter with an activated APC.^{9,10} However, when bound to B and T lymphocyte attenuator (BTLA) or CD160, which are members of the immunoglobulin superfamily, HVEM triggers coinhibitory signals that dampen T cell activation, leading to an anergic state.^{7,11}

In addition to binding to endogenous ligands, HVEM acts as a virus receptor and is recognized by the herpes simplex

virus (HSV) glycoprotein D (gD).¹² HVEM binding to gD competitively excludes binding of the coinhibitory factors but does not interfere with the costimulatory agonists. Therefore, in addition to mediating virus entry into different immune system cells, gD binding alters the complex signaling regulatory pathways mediated by HVEM during infection with HSV-1 or HSV-2.¹³ The HSV-1 gD protein is an outer-face envelope protein consisting of 394 amino acids with a signal peptide of 20 amino acids; following processing, HSV-1 gD yields a mature protein of 374 amino acids. Most of the protein is located on the outer side of the membrane (amino acids 1 to 319), with a short membrane anchor sequence (amino acids 320 to 344) followed by a C-terminal cytoplasmic tail (amino acids 344 to 374).¹⁴ Structural analyses and experiments using monoclonal antibodies with known binding sites demonstrated that gD binding to HVEM is mediated by two N-terminal stretches defined by amino acid residues 7 to 15 and 24 to 32, which are located in a

Received: April 14, 2011

Accepted: October 10, 2011

Revised: July 25, 2011

Published: October 10, 2011

conformational flexible domain that folds back to the surface-exposed distal portion of the protein.^{15–17} Indeed, *in vitro* studies showed that the interaction of gD with the HVEM receptor are drastically increased after the deletion of a C-terminal portion of the protein, suggesting that, under native conditions, HVEM binding requires complex conformational changes that involve the C-terminal portion of the protein.¹⁸

Previous reports based on experimental immunizations with DNA vaccines or recombinant adenovirus vectors showed that expression of the HSV-1 gD protein genetically fused with type 16 human papilloma virus (HPV-16) oncoproteins at a specific site near the gD C-terminal end induces enhanced and long-lived antigen-specific CD8⁺ T cell responses.^{19–21} These responses could not be achieved with vaccines encoding only the HPV-16 oncoproteins. Indeed, the enhanced CD8⁺ T cell responses induced by the E7 protein correlated with preventive and therapeutic antitumor effects observed in mice immunized with DNA vaccines encoding hybrid gD proteins.^{19,21} The search for therapeutic vaccines specifically targeting HPV-induced tumors has been significantly boosted by the availability of a murine challenge model based on TC-1 cells that constitutively express the HPV-16 E7 and E6 oncoproteins.^{22,23} Based on this experimental model, candidate vaccines that show anticancer effects can easily be screened and improved before selection for clinical trials.²⁴

In the present study, we set up conditions to evaluate the immunogenicity and adjuvant effects of purified recombinant gD protein that has been engineered to delete part of the C-terminal end and, thus, favor production of a soluble protein in a prokaryotic expression system. The recombinant gD forms, either admixed or genetically fused with the HPV-16 E7 oncoprotein, were tested for adjuvant effects on the induced antibody and T cell-mediated responses in vaccinated mice. The induced E7-specific immune responses as well as the observed antitumor effects demonstrate that purified gDE7 exerts CD8⁺ T cell adjuvant effects and offers encouraging prospects for the development of new tools for modulating T cell responses.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Mice, Cell Lines and Antibodies. Male C57BL/6 mice (6–8 weeks old) were provided by the animal facility unit of the Department of Parasitology at the University of São Paulo. All animal handling and immunization procedures were approved by the ethics committee for animal experimentation and followed standard rules approved by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA). The TC-1 tumor cell line, derived from C57BL/6 lung epithelial cells transformed with the v-Haras oncogene and HPV-16 E6 and E7, was provided by Dr. T. C. Wu at Johns Hopkins University, Baltimore, MD. The TC-1 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 50 units/mL penicillin/streptomycin and kept at 37 °C and 5% CO₂. For the tumor challenge experiments, TC-1 cells were harvested by trypsinization, washed twice, and suspended in serum-free media at appropriate concentrations for injection. The U937 cell line was kindly provided by Dr. A. Condino Neto from the Department of Immunology at the University of São Paulo, São Paulo, Brazil. The U937 cells were propagated in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS and 50 units/mL of penicillin/streptomycin and kept at 37 °C and 5% CO₂. Anti-gD monoclonal antibody (mAb) DL-6 and anti-HVEM mAbs CW1, CW3

and CW7 were kindly provided by Dr. Gary H. Cohen and Dr. Roselyn J. Eisenberg at the University of Pennsylvania, Philadelphia, PA. The anti-E7 monoclonal antibody was purchased at Calbiochem, and fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-mouse IgG was purchased at BD Biosciences.

2.2. Cloning of the gD, gDE7 and E7 Coding Sequences. The pRE4 and pRE4E7 plasmids, carrying HSV-1 gD or gD genetically fused with the HPV-16 E7 oncoprotein-encoding genes, respectively, were used as templates for PCR reactions.¹⁹ The upstream FwBamHIgD primer (5' TCG TCA TAG TGG GAT CCC ATG GGG GT 3', BamHI restriction site underlined) bound immediately after the sequence corresponding to the gD signal sequence and the downstream RvXhoIgD primer (5' TCA GCT CGA GGT TGT TCG GGG TG 3', XhoI restriction site underlined) just before the membrane anchoring domain. The resulting DNA fragments encompass the gD-coding sequence without the signal sequence and the transmembrane anchor sequence (corresponding to amino acids 1 to 319 of the mature gD protein). The fragment amplified from pRE4E7 encompasses the gD coding sequence plus the HPV-16 E7-coding sequence cloned into the unique *ApaI* restriction site of gD (100 amino acids fused immediately after the 249th amino acid of the gD sequence of the hybrid protein). The encoded hybrid gDE7 protein contains a total of 419 amino acids. The amplification reactions resulted in two fragments with 957 bp or 1,257 bp, corresponding to the gD or gDE7 encoding genes, respectively, each of which were flanked by BamHI and XhoI restriction sites. The amplified DNA fragments were purified with the Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Life Sciences), digested with BamHI and XhoI, and cloned into the pET28a(+) expression vector (Novagen, Darmstadt, Germany), which was previously treated with BamHI and XhoI restriction enzymes. The recombinant plasmids were named pETgD and pETgDE7. The plasmid inserts were sequenced and matched the gD sequence data available at the NCBI bank (accession no. L09242). The recombinant plasmids encoding the correct inserts were subsequently transformed into chemically competent *Escherichia coli* BL21 (DE3) cells. The gene encoding a truncated E7 protein, encompassing the first 60 N-terminal amino acids of the native protein, was amplified and cloned into the BamHI and XhoI restriction sites of the pET28a(+) vector using primers FwBamHIE7_2 (5' GGA TCC CAT GGA GAT ACA CCT AC 3') and RvXhoIE7_2 (5' CTC GAG TTA AAA GGT TAC AAT ATT G 3') (restriction sites underlined). The encoded protein carries the H-2K^b-restricted CD8⁺ T cell-specific epitope RAHYNIVTF_{49–57} as well as both T helper- and B cell-specific epitopes of the HPV-16 E7 protein.²⁵ In contrast to the complete E7 protein, expression of the truncated E7 protein resulted in a partially soluble protein that could be purified from recombinant *E. coli* cells.

2.3. Purification of the Recombinant gD, gDE7 and E7 Proteins Expressed in *E. coli*. The *E. coli* BL21gD, BL21gDE7 and BL21E7 strains were cultivated overnight in LB medium at 37 °C in an orbital shaker set at 200 rpm. After inoculation of 1 L of fresh LB medium and incubation for approximately 3 h (0.5 OD₆₀₀), IPTG was added at a final concentration of 0.1 mM, and the cells were incubated for an additional 3 h with aeration. The cells were harvested and suspended in buffer A (100 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 9 for the gD protein or 100 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 7.5 for the gDE7 and E7 proteins) and lysed by mechanical shearing using an APLAB-10 homogenizer (ARTEPEÇAS, Brazil). For the purification of gD and gDE7,

differential centrifugation was performed and the inclusion bodies were collected, suspended in 10 mL of buffer A₁ (8 M urea, 100 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 9 or 8 M urea, 100 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 7.5 for the gD and gDE7 proteins, respectively) and gently shaken overnight at 4 °C. The solutions were centrifuged and the supernatant was filtered with a Sartorius Stedim apparatus with cellulose acetate 0.22 μm mesh filters (Biotech). Filtrates containing the recombinant proteins were purified by nickel affinity chromatography using a HisTrap FF column (GE Healthcare Life Sciences) previously equilibrated with buffer A₁ in an FPLC device (Akta model, Amersham Pharmacia Biotech). The column was washed using a linear gradient of buffer A₁ to B (8 M urea, 100 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl and 1 M imidazole, pH 9 or 8 M urea, 100 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl and 1 M imidazole pH, 7.5 for gD and gDE7 proteins, respectively). The gD protein was eluted at imidazole concentrations ranging from 200 mM and 550 mM, and the gDE7 protein was eluted with imidazole concentrations ranging between 200 mM and 700 mM. The eluted fractions were collected, pooled and refolded using a procedure in which the denaturing agent was gradually removed following dialysis with buffers containing decreasing urea concentrations (4 M, 2 M, 1 M and 0 M). The refolding process was carried out in a cross-flow filtration device (Millipore LabScale TFF System) with 30K Pellicon membranes (Millipore). For the purification of E7, the supernatant was collected after differential centrifugation, filtered with cellulose acetate 0.22 μm mesh filters and purified by nickel affinity chromatography using the HisTrap FF column previously washed with buffer A in an FPLC device. Bound proteins were eluted from the column using a linear gradient of buffer A to B (100 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl 1 M imidazole, pH 7.5), and E7 protein was eluted with 100 mM imidazole. The final protein yield was determined with a GeneQuant spectrophotometer (GE Amersham Biosciences) and visualized on polyacrylamide gels concomitantly loaded with known BSA (bovine serum albumin) concentrations. Endotoxin levels of the protein preparations were determined using the Chromogenic Limulus Amebocyte Lysate assay (Cambrex Bio Science). The endotoxin concentrations in the preparations were equal or below 1.0 EU/μg of protein.

2.4. Immunoblot and ELISA Analyses. Protein extracts from the BL21gD, BL21gDE7 and BL21E7 strains were separated on polyacrylamide gels by SDS-PAGE electrophoresis and transferred to nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences) in transfer buffer (39 mM glycine, 20% methanol, 0.0375% SDS, 48 mM Tris-HCl pH 7.8) at 30 mAmp. The nonspecific membrane binding sites were blocked with PBS-Tween 0.05% buffer (PBS-T) plus 1% BSA. After blocking, membranes were washed and incubated with either anti-gD (DL-6) or anti-E7 for 90 min. The membrane was washed again and incubated with peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse IgG. Reactive bands were visualized with a chemiluminescence kit (Super Signal, Pierce), as specified by the manufacturer, and exposed to Kodak X-Omat film for 1–5 min. ELISA assays were performed with 250 ng of solid phase-bound purified gD or E7 using Maxisorp or Polysorb (Nunc) microtiter plates, respectively. After overnight incubation at 4 °C, plates were blocked with PBS-T plus 1% BSA. Serial dilutions of serum samples collected one week after each immunization dose were incubated at 37 °C for 90 min, and then incubated with peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse IgG. The optical densities were measured at 492 nm using a MultiScan EX ELISA reader (Labsystems). The individual titers were

considered to be the highest dilution of serum that gave an OD₄₉₂ higher than 0.1. The results are presented as the mean of log antibody titers ± SD with five animals per group.

2.5. gD Cell-Binding Assays. The gD cell-binding assays were performed using monocyte-derived U937 cells known to express HVEM.^{26,27} Approximately 10⁶ cells were propagated in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum at 37 °C and 5% CO₂. Cells were incubated with 2 μg of either gD or gDE7 protein for one hour in serum-free medium at 37 °C. Cells were washed with medium to remove unbound proteins and incubated with an anti-gD monoclonal antibody (DL-6) for 30 min. Cells were washed to remove unbound antibody and incubated with FITC-conjugated goat anti-mouse IgG for 30 min. The labeled cells were analyzed by flow cytometry.

2.6. Immunization Regimens and TC-1 Tumor Challenge. Mice were subcutaneously (sc) immunized in the flank with 4 doses of the recombinant proteins administered at weekly intervals. The recombinant gD, gDE7 and E7 proteins were suspended in PBS in a final volume of 100 μL. The experimental groups were immunized with (i) PBS; (ii) purified gD (10 μg/dose); (iii) purified gDE7 (30 μg/dose); (iv) purified gD + purified E7 (10 μg of gD + 10 μg of E7); or (v) purified E7 (10 μg/dose). The higher concentration of inoculated gDE7 with regard to gD was established in order to keep the same amount of E7 administered to the immunized mice. Mice immunized with purified gD and E7 received the two proteins as a mixture which was inoculated in the same injection site. To determine whether preventive antitumor protection could be induced, mice were inoculated with 7.5 × 10⁴ TC-1 cells/mouse by subcutaneous injection in the right flank two weeks after the last immunization. The development of therapeutic antitumor protection was determined by inoculating with the same number of TC-1 cells one day before the administration of the first vaccine dose. Groups of five mice were used to evaluate the antitumor protection effect and the induction of cellular immune responses. Tumor growth was monitored by visual inspection and palpation once a week through at least 60 days, and cellular immune responses were analyzed two weeks after TC-1 challenge.

2.7. Determination of the CD8⁺/IFN-γ⁺ T Cell Response by Intracellular Cytokine Staining. Intracellular IFN-γ staining of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) was performed two weeks after challenge with TC-1 cells. Blood cells were harvested and treated with ACK lysis buffer for 5 min on ice to eliminate red blood cells. Cells were washed once with DMEM medium supplemented with 1% FBS and incubated at 37 °C for 6 h in 96-well, round-bottom microtiter plates (BD Biosciences) in 200 μL of complete DMEM medium with brefeldin A (Golgi Plug; BD Biosciences) at a final concentration of 1 μL/mL. The MHC-I-restricted, E7-specific CD8⁺ T cell epitope E7_{49–57} (RAHYNIVTF) (GenScript) was used for *in vitro* stimulation at a concentration of 3 μg/mL. After washing, the cells were incubated for 30 min at 4 °C with 100 μL of a 1:100 dilution of FITC-conjugated anti-mouse CD8a mAb (BD Biosciences), washed again with PBS containing 2% FBS, fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min and then permeabilized with 0.5% saponin for 20 min at 4 °C. Cells were incubated for 30 min at 4 °C with a 1:100 dilution of a PE-labeled anti-mouse-IFN-γ mAb (BD Biosciences). After washing, the cells were suspended in PBS containing 2% FBS and examined using a FACSCalibur cytometer (BD Biosciences). The data were analyzed by FlowJo software (Tree Star), and the percentage

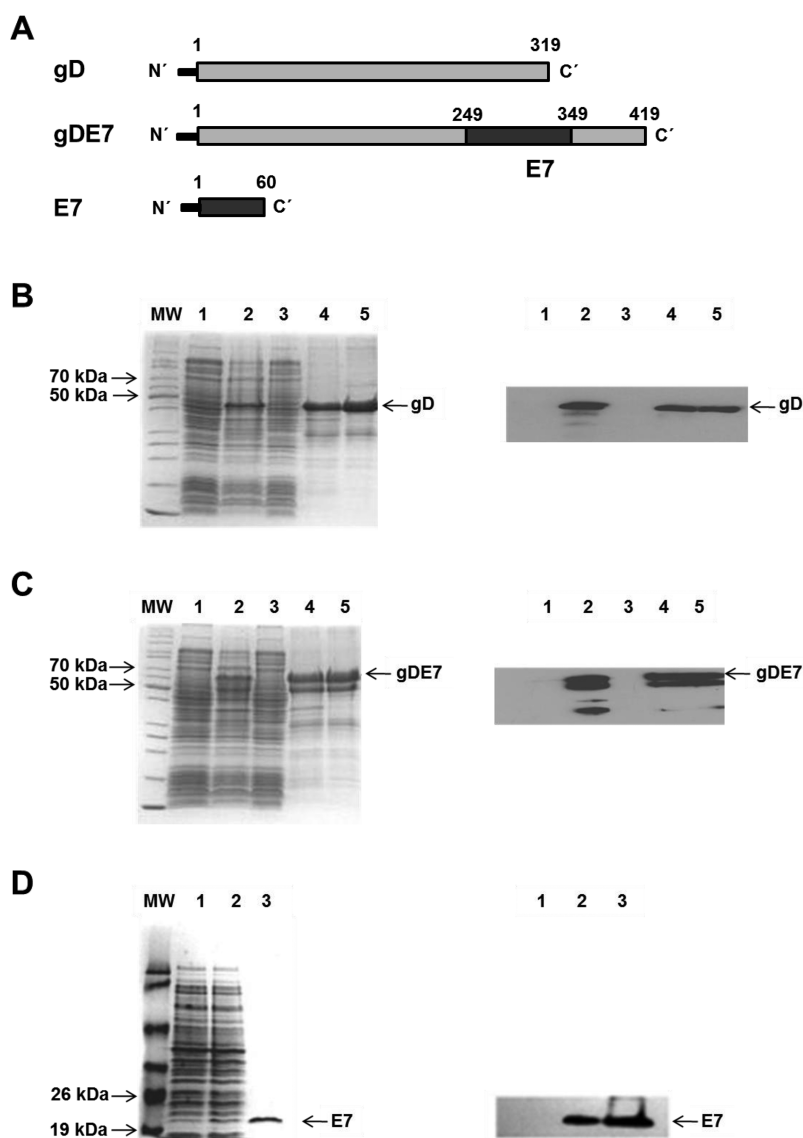


Figure 1. Expression and purification of gD, gDE7 and the truncated E7 protein. (A) Schematic representation of the purified proteins used in the *in vitro* and *in vivo* experiments: gD (consisting of the first 319 amino acids of HSV-1 glycoprotein D), gDE7 (a chimeric protein which contains the entire HPV-16 E7 protein inserted into HSV-1 gD after amino acid 249) and E7 (composed of the first 60 N-terminal amino acids of the HPV-16 E7 oncoprotein). Expression and purification of gD (B), gDE7 (C) and E7 (D) recombinant proteins were monitored by SDS-PAGE (left panels) and immunoblotting (right panels). (B, C) Samples: MW, molecular weight markers; 1, whole-cell extract of noninduced *E. coli* strains; 2, whole-cell extract of the *E. coli* strains after 3 h incubation with IPTG; 3, soluble protein fraction of IPTG-induced *E. coli* strains; 4, insoluble protein fraction of IPTG-induced *E. coli* strains; 5, purified protein following denaturation and refolding steps. (D) Samples: 1, whole-cell extract of noninduced *E. coli* strain; 2, whole-cell extract of recombinant *E. coli* strain after incubation with IPTG for 3 h; 3, purified soluble E7 protein.

of E7-specific CD8⁺ T cells that stained positive for IFN- γ was determined relative to all CD8⁺ T cells.

2.8. In Vivo Cytotoxicity Assay and Cytokine Dosage. *In vivo* cytotoxicity tests were carried out two weeks after challenge with TC-1 cells, as previously described.^{28,29} Briefly, splenocytes collected from naive mice were stained with 0.5 μ M or 5 μ M of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) (Invitrogen). Cells labeled with 5 μ M CFSE, but not those labeled with 0.5 μ M CFSE, were pulsed with 2.5 μ g/mL of the E7_{49–57} peptide for 40 min at 37 °C. The same numbers of cells from both populations (2×10^7 cells) were intravenously (iv) injected into mice undergoing the different immunization regimens. One day later, the spleens of inoculated mice were isolated and

the splenocytes were examined by flow cytometry. Target cell killing by E7-specific cytotoxic CD8⁺ T lymphocytes (CTL) was evaluated. The production of cytokines by spleen cells harvested from immunized mice was measured two weeks after TC-1 cell challenge. For *in vitro* stimulation, 1.5 μ g/mL of E7_{49–57} peptide or 10 μ g/mL of the purified truncated E7 protein was used. Spleen cells were cultured at a final concentration of 10^7 cells/mL in a CO₂ incubator at 37 °C for 72 h. After the incubation time, the supernatants were harvested and stored at –80 °C until the cytokine concentrations were measured by ELISA. ELISAs were performed according to the manufacturer's instructions (BD Biosciences).

2.9. In Vivo Activation of Dendritic Cells. Spleen cells from mice intraperitoneally (ip) inoculated with 5 μ g of *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide (LPS) (Sigma) or 50 μ g of gD or gDE7 were collected 24 h after the immunization, washed twice with RPMI containing 10% FBS and stained with PE-labeled anti-CD11c and either APC-labeled anti-CD86, APC-labeled anti-CD40, APC-labeled anti-CD80, FITC-labeled anti-H2K^b (MHC-I), or FITC-labeled anti-H2IA^b (MHC-II) (BD Biosciences). Labeled cells were suspended in PBS containing 2% FBS and analyzed by flow cytometry (1.5×10^6 events/sample). The data were analyzed using FlowJo software. Groups of mice were inoculated with PBS or heat-denatured gD or gDE7 (50 μ g) as controls.

2.10. Statistical Analyses. All data are expressed as the mean \pm SD and represent at least three mice per group. ANOVA and Bonferroni tests were applied, and differences for which $p \leq 0.05$ were considered statistically significant.

3. RESULTS

3.1. Expression and Purification of the Recombinant gD, gDE7 and E7 Proteins. The coding sequences of gD, gDE7 and truncated E7 were cloned into the pET28a(+) expression vector, and the resulting plasmids, pETgD, pETgDE7 and pETE7, were introduced into *E. coli* BL21 (DE3) host cells, generating the recombinant strains BL21gD, BL21gDE7 and BL21E7, which expressed gD, gDE7 and E7 respectively (Figure 1A). Whole cell extracts of the recombinant strains were cultured in the presence of IPTG for 3 h and analyzed by SDS-PAGE and Western blot (Figure 1B–D). The recombinant gD protein had a molecular mass of approximately 44 kDa, as predicted based on the amino acid sequence (Figure 1B). However, the gDE7 protein, with a predicted molecular mass of 55 kDa, showed altered electrophoretic mobility, and two bands of approximately 55 and 65 kDa were observed (Figure 1C). The same protein showed a single peak with an apparent molecular weight of 55 kDa after size exclusion chromatography (data not shown). This observation is consistent with previous data showing anomalous electrophoretic behavior of the HPV-16 E7 protein when expressed by *E. coli*.³⁰ Western blots performed with an anti-gD monoclonal antibody (DL-6) confirmed the identity of the 44 kDa band and the 55 and 65 kDa bands, corresponding to gD and gDE7, respectively (Figure 1B,C). The gD and gDE7 proteins were found only in the insoluble fraction of *E. coli* although different attempts to change the induction conditions of the recombinant strains have been tested (data not shown). From 1 L of culture we achieved a total yield of approximately 0.12 g/L for gD and 0.14 g/L for gDE7. Purification of the recombinant gD and gDE7 yielded 0.055 g/L and 0.050 g/L, respectively, of the insoluble proteins. Production of soluble gD and gDE7 was achieved after denaturation of the inclusion bodies and subsequent refolding. After the refolding step, the protein yield dropped to approximately 10 mg/L for both proteins. The recombinant truncated E7 protein appeared to have a molecular mass of approximately 20 kDa, and its identity was confirmed by Western blot using an anti-E7 monoclonal antibody. Purification steps generated a soluble protein with a final recovery yield of approximately 10 mg/L (Figure 1D).

3.2. Cell-Binding Activity of the Recombinant gD Proteins. Expression of the HVEM receptor on the surface of nonpermeabilized U937 cells was first confirmed by flow cytometry after labeling with three different specific anti-HVEM monoclonal

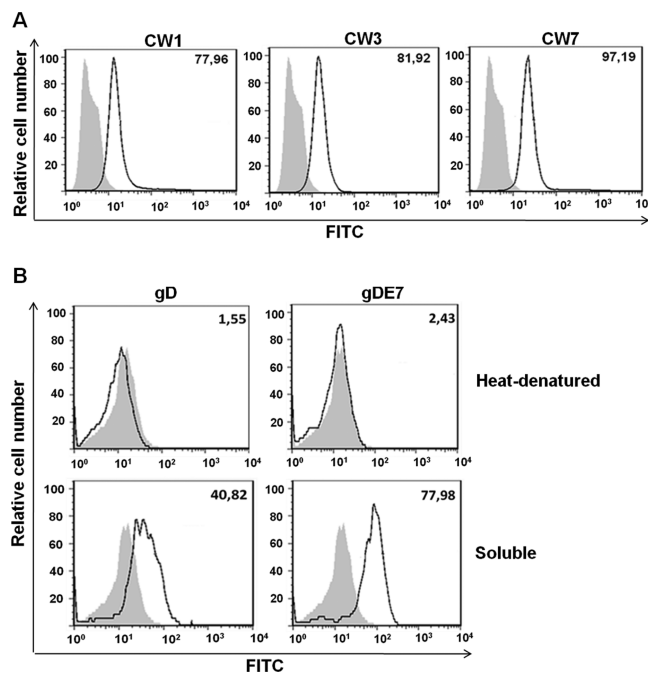


Figure 2. Recombinant gD and gDE7 proteins bind HVEM-expressing U937 cells. (A) Cells were labeled with the anti-HVEM monoclonal antibodies CW1, CW3 and CW7, followed by FITC-labeled anti-IgG. (B) Cells were incubated with heat-denatured or soluble gD and gDE7 proteins for one hour and subsequently labeled with anti-gD monoclonal antibody (DL-6), followed by FITC-labeled anti-IgG. Cells were examined by flow cytometry, and the data were analyzed with the Flow Jo software package. Histograms indicated by black lines and gray-shaded curves show labeled and nonlabeled cells, respectively. Numbers in each panel indicate the percentage of positively stained cells. Results are based on a representative experiment of two independently performed experiments.

antibodies (CW1, CW3, CW7) and subsequent incubation with FITC-labeled anti-IgG (Figure 2A). As a second step, we determined the ability of recombinant gD or gDE7 to bind the U937 cells. Cells were incubated with 2 μ g of each recombinant protein and labeled with a specific anti-gD monoclonal antibody (DL-6) and FITC-labeled anti-IgG. As shown in Figure 2B, both recombinant gD and gDE7 bound to the U937 cells, but gDE7 bound cells more efficiently than gD (40% of cells were labeled with gD and 78% of cells were labeled with gDE7). As a control, the binding assay was performed with the recombinant proteins after heat-denaturation, and no specific binding was detected (Figure 2B). These results indicated that the recombinant gD and gDE7 proteins retained receptor-binding activities that were lost after denaturation of the proteins. In addition, fusion of gD to E7 enhanced the receptor-binding affinity of the recombinant protein relative to the nonfused gD.

3.3. Activation of CD11c⁺ Cells in Mice Inoculated with gD and gDE7. DC activation is a key step in mounting productive adaptive immune responses mediated by T and B cells. Because DCs are known to express the HVEM receptor, we tested recombinant gD and gDE7 to see whether they promote activation of DC *in vivo*. For that purpose, mice were ip injected with purified gD, gDE7, LPS or PBS, and CD11c⁺ cells harvested from the spleens of vaccinated mice were monitored for the expression of MHC-I and MHC-II molecules, as well as CD80, CD86 and CD40, by flow cytometry. As shown in Figure 3,

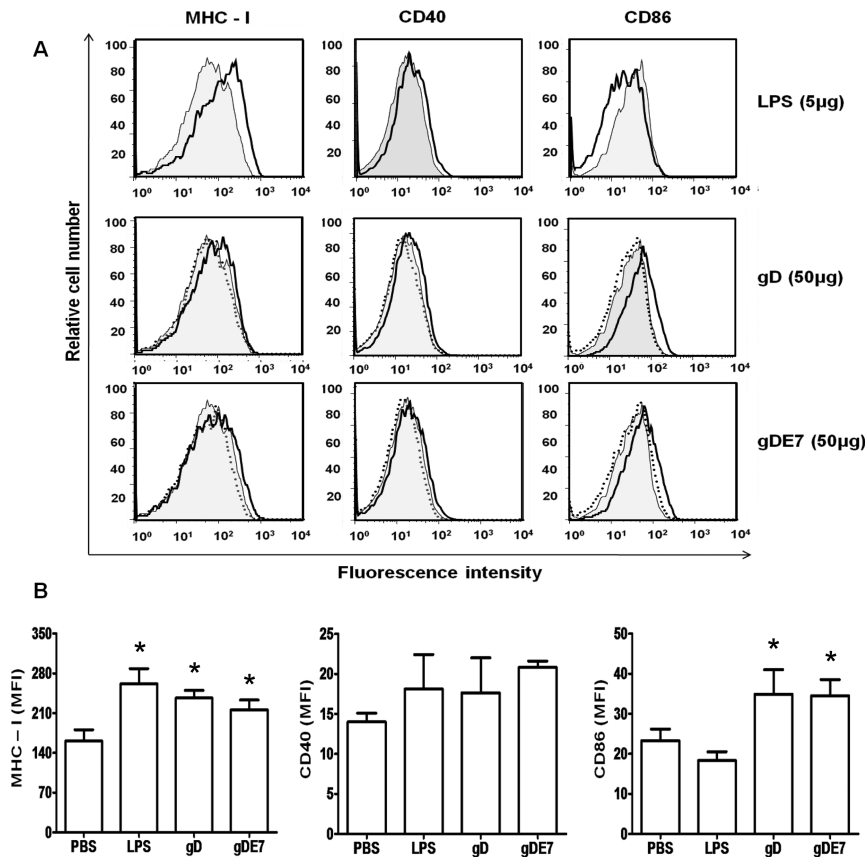


Figure 3. *In vivo* activation of DCs in mice treated with recombinant gD or gDE7. C57BL/6 mice were ip inoculated with LPS (5 μ g), gD (50 μ g) or gDE7 (50 μ g). Twenty-four hours after injection, spleen cells were stained with anti-CD11c, anti-CD86, anti-CD40, anti-CD80, anti-H2K^b, or anti-H2IA^b and analyzed by flow cytometry. Histograms representing samples collected from nontreated mice are indicated by lines outlining gray-shadowed curves. Samples collected from mice undergoing the different treatments are represented by curves outlined in black. Samples collected from mice inoculated with denatured recombinant proteins are represented by curves delimited by dotted lines. The expression of surface markers was analyzed by acquiring 1.5×10^6 events. (A) Histograms representing cells gated for CD11c⁺ expression. (B) Values expressed as mean fluorescence intensity. * $p \leq 0.05$ compared with nontreated mice. The experiment was repeated twice, and the results represent the mean of three mice \pm SD per group.

CD11c⁺ cells harvested from mice inoculated with gD, gDE7 or LPS expressed increased levels of MHC-I. Moreover, DCs isolated from mice treated with gD or gDE7 showed statistically significant expression of CD86 but not of CD40, when compared with cells harvested from mice that received LPS or nontreated animals (Figure 3B). Control experiments carried out with heat-denatured gD or gDE7 did not induce significant differences in the expression of the coactivator markers relative to nontreated mice (Figure 3A). No alteration in the expression of MHC-II and CD80 molecules was detected in mice treated with gD or gDE7 (data not shown). These results indicate that the recombinant gDE7 protein and, to a lesser extent, the recombinant gD protein promote the activation of DCs *in vivo*.

3.4. Effect of gD Fusion on Induced Antibody and Th Responses. Because the recombinant gDs proved to be effective for the *in vivo* activation of murine DCs, we evaluated the induced antibody responses directed toward a target antigen (E7) to see whether they would be increased following administration with gD, either as a coadministered adjuvant or as a genetically fused hybrid protein. As indicated in Figure 4A, no relevant differences were detected in the anti-gD IgG titers in sera from mice immunized with gD, gD plus E7 or gDE7. Similarly, there was a small, but not statistically significant, difference in the anti-E7 IgG titers in mice immunized with two or more doses of gDE7

compared with mice immunized only with E7 (Figure 4B). In contrast, we observed a clear shift in the T helper cell response of mice immunized with gDE7, as inferred by the anti-E7 IgG subclass distribution, when compared with mice immunized with E7 or gD plus E7. Sera from mice immunized with gDE7 showed an IgG1/IgG2c subclass ratio of 1.2, while mice immunized with gD plus E7 or only E7 showed IgG1/IgG2c ratios of 643 and 653, respectively (Figure 4C). Similar responses were observed when the E7-specific cytokine secretion profiles were examined. Spleen cells from mice immunized with gDE7 showed high levels of IFN- γ secretion and no detectable IL-10 when spleen cells from vaccinated mice were stimulated with the recombinant E7 protein, whereas cells harvested from mice immunized with E7 secreted high levels of IL-10 and no detectable IFN- γ (Figure 4D). These results indicate that fusion of gD to the E7 protein did not affect the immunogenicity of the antigen with regard to the production of antigen-specific antibodies, but there is a clear modulation of the T helper response toward a more biased type 1 immunity pattern.

3.5. Activation of E7-specific CD8⁺ T Cell Response in Mice Immunized with the Recombinant gD Proteins. The immunomodulatory effects of the recombinant gD protein on the activation of E7-specific CD8⁺ T cell responses was examined in mice immunized with four doses of gD, gDE7, gD plus E7, or

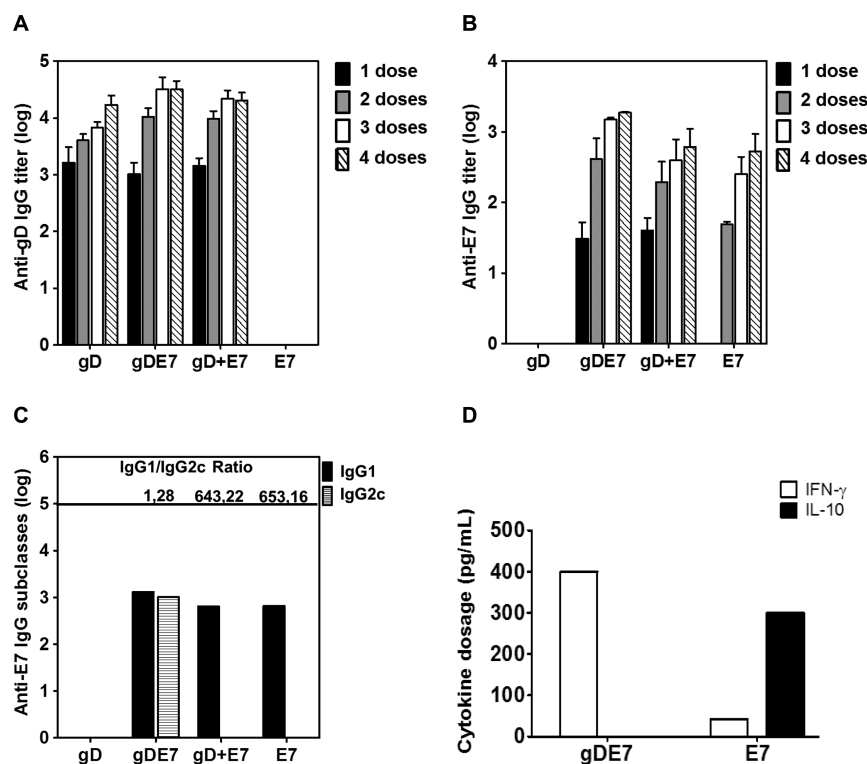


Figure 4. Induced gD- and E7-specific antibody responses and T helper profiles in mice immunized with recombinant E7. (A) gD-specific IgG response elicited in mice immunized with one to four doses of the different vaccine formulations. (B) E7-specific IgG responses elicited in mice immunized with one to four doses of the different vaccine formulations. Serum samples were collected one week after each dose. (C) Anti-E7 IgG subclass responses. Sera used in these test were collected one week after the fourth immunization dose. (D) IFN- γ and IL-10 production detected in the supernatant of spleen cells harvested from vaccinated mice two weeks after TC-1 cell challenge following stimulation with 10 μ g purified E7 protein for 72 h. The experiment was repeated twice. The results represent the mean of five mice \pm SD per group.

E7 two weeks after challenge with TC-1 cells. As shown in Figure 5A, mice immunized with gDE7, but not those immunized with E7 or gD plus E7, showed increased activation of E7-specific CD8⁺ T cells when compared with mice immunized only with gD. Similarly, significant IFN- γ production was detected only in supernatants from spleen cells harvested from mice immunized with gDE7 following stimulation with the MHC-I-restricted CD8⁺ T cell-specific E7_{49–57} peptide (Figure 5B). To evaluate the functional state of the E7-specific CD8⁺ T cells induced in mice immunized with gDE7, spleen cells from nonimmunized mice were labeled with two different CFSE concentrations. Cells labeled with the highest CFSE concentration were also pulsed with the E7_{49–57} peptide, mixed with the same amount of the CFSE_{low}-labeled cells and iv injected into mice undergoing the different immunization regimens. As shown in Figure 5C, all mice immunized with gDE7, but not those immunized with the other vaccine formulations, mounted E7-specific *in vivo* cytotoxic responses, as demonstrated by the reduction in the number of cells labeled with the E7-specific peptide relative to the population of cells not pulsed with the E7-derived peptide.

3.6. Antitumor Effects Elicited in Mice Immunized with gDE7. Induction of E7-specific CD8⁺ T cell responses is an essential feature of effective anticancer vaccines based on the TC-1 tumor cells.²³ The antitumor effects conferred by vaccination with the gDE7 protein were determined under two different sets of experimental conditions. The preventive antitumor effects were evaluated by vaccinating mice with the different tested vaccine formulations, followed by injection with the TC-1 cells.

Therapeutic antitumor effects, on the other hand, were investigated in mice first inoculated with the TC-1 cells and subsequently treated with four vaccine doses. As observed in Figure 6A, only mice immunized with four doses of gDE7 developed complete preventive protection to TC-1 cells (100% survival), while animals immunized with gD, E7 or gD plus E7 developed tumors after injection with the TC-1 cells. Two months after challenge with the TC-1 cells, mice immunized with gDE7 received a second injection of tumor cells in order to evaluate the longevity of the protective antitumor responses. Under such conditions, all of the vaccinated mice were protected during an additional observation period of one month and showed increased activation of IFN- γ -producing CD8⁺ T cells (Figures 6A and 5D). In an attempt to decrease the number of vaccine doses used in the immunization regimen, the prophylactic antitumor effects induced by gDE7 were determined in animals immunized with lower numbers of vaccine doses, but only animals receiving four doses were fully protected against tumor growth (Figure 6B). Analyses of the therapeutic antitumor effects elicited in mice showed that 30% of the animals vaccinated with 4 doses of gDE7 controlled tumor development (Figure 6C). These results demonstrate that the recombinant gDE7 protein confers antitumor protection effects on vaccinated mice under both prophylactic and therapeutic conditions.

4. DISCUSSION

Cervical cancer is the second most common cause of cancer death in women, and although two preventive vaccines based on capsid proteins are available, the expected benefits for those

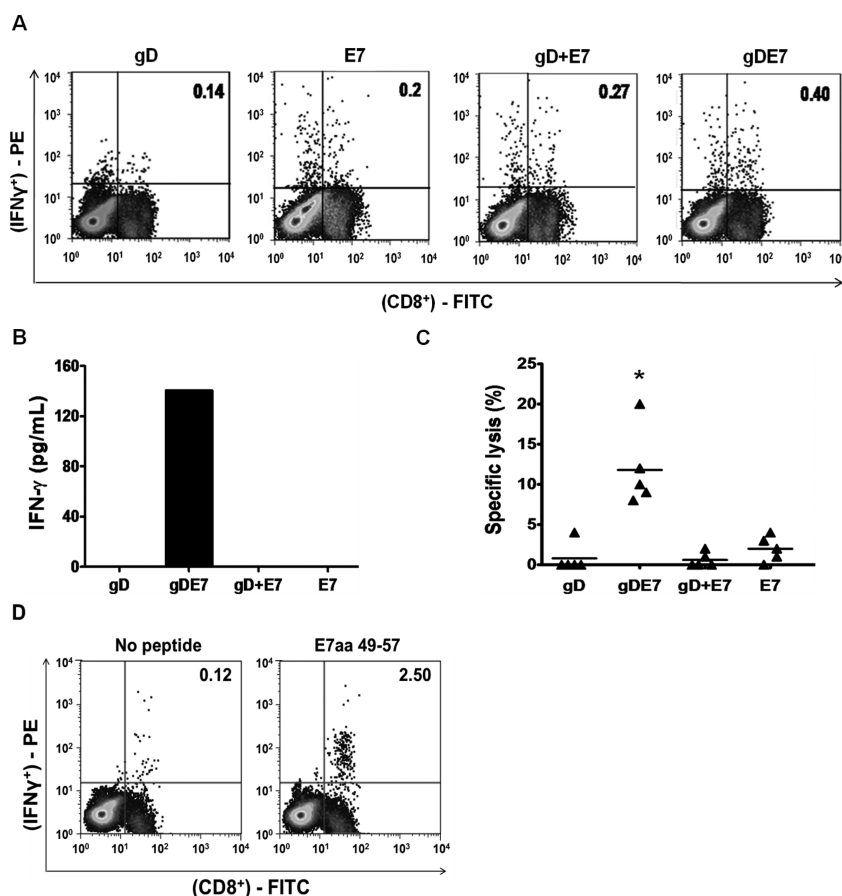


Figure 5. Determination of E7-specific responses mediated by CD8⁺ T cells. Mice were immunized with four doses of gD, gDE7, gD plus E7 or E7 recombinant proteins and subsequently challenged with 7.5×10^4 TC-1 cells/mouse. Samples were collected two weeks after challenge. (A) Peripheral blood lymphocytes from immunized mice were stimulated *in vitro* with the E7_{49–57} (RAHYNIVTF) peptide, representing the single CD8⁺ T cell-specific epitope of the E7 protein and used for monitoring of intracellular IFN- γ accumulation. The numbers in the upper right quadrant indicate the percentage of CD8⁺/IFN- γ ⁺ lymphocytes relative to the total number of assayed CD8⁺ T cells. (B) Production of IFN- γ was detected in the supernatant of splenocytes harvested from immunized mice incubated with the RAHYNIVTF peptide. (C) *In vivo* cytotoxic activity of E7-specific CD8⁺ T lymphocytes from mice immunized with the different vaccine formulations. The result represents the mean percentage of killed target cells labeled with the RAHYNIVTF peptide from five mice per group. * $p \leq 0.05$. (D) Intracellular IFN- γ staining of E7-specific CD8⁺ T cells performed in PBMCs from mice immunized with gDE7 recombinant protein that were fully protected in the prophylactic TC-1 cell challenge and reinjected with a second dose of cells (7.5×10^4 TC-1 cells/mouse) 60 days later. Samples were collected two weeks after the rechallenge. The numbers in the upper right quadrant indicate the percentage of CD8⁺/IFN- γ ⁺ lymphocytes relative to the total number of CD8⁺ T cells assayed.

already infected or those who cannot afford the high costs of the vaccines are certainly small. Thus, the search for alternative vaccines, particularly those targeting HPV-induced tumors or virus-infected cells, has been a priority for several laboratories around the world.^{24,31} Our previous observations showed that DNA vaccines encoding chimeric HPV-16 oncoproteins, particularly E7, genetically fused at a specific site near the C-terminal end of the HSV-1 gD protein increased the activation of E7-specific CD8⁺ T cells and, more relevantly, enhanced the protective antitumor effects in an experimental murine model.¹⁹ These findings rouse interest in the elucidation of the specific mechanisms behind the strong adjuvant effects of the gD protein on T cell-dependent responses.²⁰ Nevertheless, questions regarding the gD-mediated adjuvant effects, such as the requirement for endogenous antigen expression and the need to generate hybrid proteins, remained unanswered. In the present study, we tackled these points using purified proteins generated in a prokaryotic expression system. In this scenario we tested a hybrid gDE7 protein, folded or unfolded, and the two isolated

proteins, gD and E7. Our results demonstrate that the conformation of the hybrid gD protein and, to a lesser extent, fusion with the target antigen are essential features for the preservation of cell-binding activity, dendritic cell maturation and the activation of antigen-specific T cell responses. Moreover, our results demonstrate that parenteral administration of the chimeric gDE7 without any additional adjuvant was sufficient to induce anticancer protection in mice implanted with TC-1 cells under both preventive and therapeutic conditions. Collectively, these data represent an important step toward a better understanding of the adjuvant effects of gD and may contribute to the future development of a new generation of antitumor vaccines.

Previous observations indicated that the binding of gD to the HVEM receptor occurs through a flexible N-terminal loop that remains partially sheltered by a C-terminal portion of the molecule.^{17,18,32} Indeed, modeling of a hybrid gD with a C-terminal fusion with the HIV-1 Gag protein predicted that the C-terminal end would be displaced from the HVEM-binding site.²⁰ Our results demonstrated that binding of the recombinant

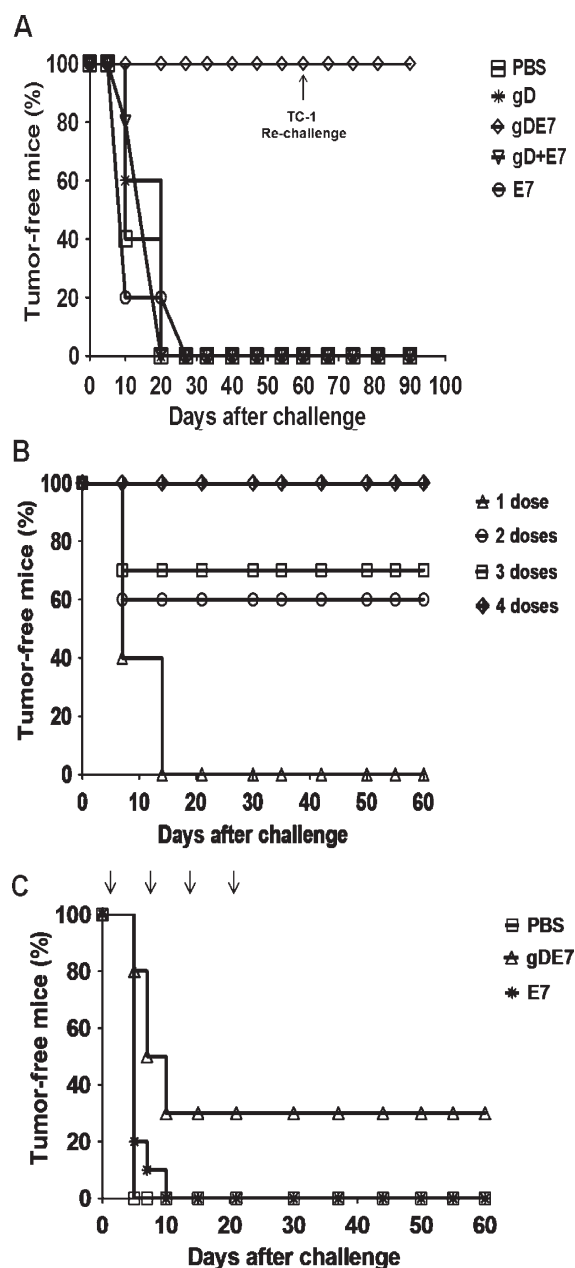


Figure 6. Preventive and therapeutic antitumor effects induced by the recombinant proteins. (A) Preventive protection in C57BL/6 mice sc immunized with four doses of the vaccine formulations administered at weekly intervals. Two weeks after the last dose, mice were challenged with 7.5×10^4 TC-1 cells. Sixty days after the first inoculation with TC-1 cells, the gDE7 group received a second tumor cell challenge (indicated by the vertical arrow). (B) Dose—response curve for tumor-protective responses in mice immunized with gDE7. Mice were immunized with one, two, three or four doses of gDE7 and subsequently inoculated with 7.5×10^4 TC-1 cells. (C) Therapeutic antitumor effects in mice vaccinated with the different vaccine formulations. Mice were inoculated with 7.5×10^4 TC-1 cells and, 24 h later, treated with the immunization regimen based on four vaccine doses administered at weekly intervals (indicated by the vertical arrows). After the TC-1 cell challenge mice were monitored for tumor development by visual inspection and palpation for at least 60 days. Results are based on a representative survival experiments with at least five mice per group.

gDE7 to surface-exposed receptors of the U937 cells, previously shown to express HVEM at the cell surface,^{26,27} is better than the

binding of the nonfused gD. For both proteins, denaturation reduced the cell-binding activity to negligible levels. The enhanced cell-binding effect may affect the *in vivo* biological activity of gD because this protein has a significantly lower binding affinity to HVEM than other ligands, including BTLA, LIGHT and CD160.¹³ These results are also in accordance with previous observations that demonstrated a higher affinity of gD for HVEM when the C-terminal region is deleted or altered.¹⁸ Our results, therefore, confirmed that the fusion of an additional sequence at the C-terminal end of the gD protein enhances its binding to host cell receptors, even without the anchoring at the cell membrane. In fact, our *in vivo* data clearly shown conformation of the gDE7 protein is also essential for the activation of dendritic cells that, otherwise, requires binding and activation the HVEM receptor. It is expected that the enhanced binding activity of the hybrid gD protein would more profoundly affect signaling mechanisms mediated by host cell receptors, particularly, the HVEM receptor. These results also demonstrate that refolding of recombinant gD proteins preserved important conformational determinants of the native protein that are required for proper binding to host cell receptors.

Secondary signals, either costimulatory or coinhibitory, result in the activation of antigen presenting cells, such as dendritic cells, and contribute to the induction of effective adaptive immune responses. Our results demonstrated that *in vivo* administration of purified gD and gDE7 enhanced the expression of MHC-I and CD86 molecules on CD11c⁺ cells. In fact, *in vitro* evidence has demonstrated that the binding of soluble gD to HVEM results in the activation of NF- κ B and a reduction in Fas-induced apoptosis in different cell lineages, features that may affect the penetration of HSV particles into host cells and the subsequent induction of immune responses.^{26,27,33} Under our testing conditions, upregulation of MHC-I and costimulatory molecules in mice exposed to gD suggests that blockade of BTLA binding would favor the activation of dendritic cells and T cells, particularly CD8⁺ T cells, in mice immunized with gD-containing vaccine formulations. In support of these results, previous experiments showed homeostatic expansion of CD4⁺ and CD8⁺ T cell populations and enhanced activation of memory CD8⁺ T cells in BTLA-deficient mice, conditions that would support the formation of a long-lived CD8⁺ memory T cell pool.³⁴

In spite of the fact that HVEM and BTLA are expressed by B and T lymphocytes, available evidence from knockout mice and the administration of soluble agonists indicated that the *in vivo* modulation of adaptive immune responses mediated by BTLA-HVEM mainly affects T cell responses.^{34,35} Our results demonstrated that the gD adjuvant effects observed in mice immunized with the soluble protein were mainly observed in T cells, with only marginal enhancement of the induced antibody responses. A clear shift in T helper responses was observed in mice immunized with gDE7 and subsequently challenged with TC-1 cells, in terms of both the E7-specific IgG subclass response and the cytokine secretion patterns. In contrast to mice with implanted tumors, mice immunized with gDE7 showed a clear type 1 immune response pattern. Administration of gD genetically fused to E7 promoted differential activation of CD4⁺ T cells without the administration of any additional immune modulator, such as innate immune agonists, which are usually required in immunization regimens with purified proteins. Resting CD4⁺ T cells express higher BTLA levels and upregulate BTLA expression faster than CD8⁺ T cells.^{35,36} We can conclude, therefore,

that parenteral administration of soluble gDE7 successfully modulated T helper responses that are required for the proper activation and maintenance of cell-mediated immune responses, particularly those mediated by antigen-specific cytotoxic CD8⁺ T cells.

Immunization of mice with purified gDE7 protein confers antitumor protection in mice challenged with TC-1 cells under both preventive and therapeutic conditions. The preventive antitumor protection in mice immunized with purified gDE7 protein was complete but required at least four sc vaccine doses while the maximal therapeutic antitumor effect was 30% obtained also after four vaccine doses. Our previous results based on DNA vaccines encoding gDE7 showed higher (70%) therapeutic antitumor protection in mice inoculated with TC-1 cells and subsequently immunized with three doses of the vaccine.²¹ It is well established that DNA vaccines, as well as attenuated viruses, are better inducers of cellular immune responses, particularly cytotoxic CD8⁺ T cells, than purified proteins.^{1,24,37} It is remarkable, therefore, that administration of purified gD protein genetically fused with the target E7 antigen could elicit a strong activation of cytotoxic E7-specific CD8⁺ T cells and confer a significant anticancer protection effect in vaccinated mice. These results demonstrate that upon further optimization of the immunization regimen, such as incorporation of adjuvants, higher antigen loads, alternative delivery routes and/or coadministration of immunomodulatory cytokines, additional enhancement of both the T-cell immunogenicity and antitumor effects could be achieved with protein-based vaccine formulations.

The successful clinical experience of HPV-specific therapeutic antitumor vaccines with long synthetic peptides³⁸ indicates that the way to achieve clinical effective anticancer vaccines may involve the development of protein-based formulation immunogens. The present findings demonstrate that a vaccine containing a hybrid gDE7 protein has some of the features required to generate an effective anticancer vaccine without the inherent risks of attenuated virus or even DNA vaccines. However, additional improvements and further testing are clearly needed before the clinical potential of the proposed vaccine strategy could be evaluated. Issues like pre-existing immunity, particularly against the gD component, and requirement of formulations capable of inducing more robust anticancer responses need further testing and will certainly receive attention in future studies.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Departamento de Microbiologia, ICB-II, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1374, Cidade Universitária, São Paulo, 05508-000, Brazil. Phone: +5511-3091-7338. E-mail: lcsf@usp.br.

Author Contributions

[†]Both authors contributed equally to the present study.

ACKNOWLEDGMENT

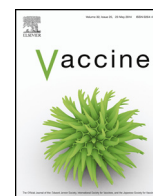
We gratefully acknowledge the helpful technical assistance of L. C. Silva, J. A. Pereira and E. Gimenez. This work was supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). B.F.M.M.P., M.O.D., F.A.M.O.C., V.C.S., J.H.A. and C.J.M.B. had fellowships granted

by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

REFERENCES

- (1) Appay, V.; Douek, D. C.; Price, D. A. CD8⁺ T cell efficacy in vaccination and disease. *Nat. Med.* **2008**, *14* (6), 623–8.
- (2) Yewdell, J. W. Designing CD8⁺ T cell vaccines: it's not rocket science (yet). *Curr. Opin. Immunol.* **2010**, *22* (3), 402–10.
- (3) Murphy, T. L.; Murphy, K. M. Slow down and survive: Enigmatic immunoregulation by BTLA and HVEM. *Annu. Rev. Immunol.* **2010**, *28*, 389–411.
- (4) Morel, Y.; Schiano de Colella, J. M.; Harrop, J.; Deen, K. C.; Holmes, S. D.; Wattam, T. A.; Khandekar, S. S.; Truneh, A.; Sweet, R. W.; Gastaut, J. A.; Olive, D.; Costello, R. T. Reciprocal expression of the TNF family receptor herpes virus entry mediator and its ligand LIGHT on activated T cells: LIGHT down-regulates its own receptor. *J. Immunol.* **2000**, *165* (8), 4397–404.
- (5) Morel, Y.; Truneh, A.; Sweet, R. W.; Olive, D.; Costello, R. T. The TNF superfamily members LIGHT and CD154 (CD154 ligand) costimulate induction of dendritic cell maturation and elicit specific CTL activity. *J. Immunol.* **2001**, *167*, 2479–86.
- (6) Tao, R.; Wang, L.; Murphy, K. M.; Fraser, C. C.; Hancock, W. W. Regulatory T cell expression of herpesvirus entry mediator suppresses the function of B and T lymphocyte attenuator-positive effector T cells. *J. Immunol.* **2008**, *180* (10), 6649–55.
- (7) Cai, G.; Anumanthan, A.; Brown, J. A.; Greenfield, E. A.; Zhu, B.; Freeman, G. J. CD160 inhibits activation of human CD4⁺ T cells through interaction with herpesvirus entry mediator. *Nat. Immunol.* **2008**, *9* (2), 176–85.
- (8) Cai, G.; Freeman, G. J. The CD160, BTLA, LIGHT/HVEM pathway: a bidirectional switch regulating T-cell activation. *Immunol. Rev.* **2009**, *229* (1), 244–58.
- (9) Masters, S. A.; Ayres, T. M.; Skubatch, M.; Gray, C. L.; Rothe, M.; Ashkenazi, A. Herpesvirus entry mediator, a member of the tumor necrosis factor receptor (TNFR) family, interacts with members of the TNFR-associated factor family and activates the transcription factors NF-κB and AP-1. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 14029–32.
- (10) del Rio, M. L.; Lucas, C. L.; Buhler, L.; Rayat, G.; Rodriguez-Barbosa, J. I. HVEM/LIGHT/BTLA/CD160 cosignaling pathways as targets for immune regulation. *J. Leukocyte Biol.* **2010**, *87* (2), 223–35.
- (11) Sedy, J. R.; Gavrieli, M.; Potter, K. G.; Hurchla, M. A.; Lindsley, R. C.; Hildner, K.; Scheu, S.; Pfeffer, K.; Ware, C. F.; Murphy, T. L.; Murphy, K. M. B and T lymphocyte attenuator regulates T cell activation through interaction with herpesvirus entry mediator. *Nat. Immunol.* **2005**, *6* (1), 90–8.
- (12) Heldwein, E. E.; Krummenacher, C. Entry of herpesviruses into mammalian cells. *Cell. Mol. Life Sci.* **2008**, *65* (11), 1653–68.
- (13) Stiles, K. M.; Whitbeck, J. C.; Lou, H.; Cohen, G. H.; Eisenberg, R. J.; Krummenacher, C. Herpes simplex virus glycoprotein D interferes with binding of herpesvirus entry mediator to its ligands through downregulation and direct competition. *J. Virol.* **2010**, *84* (22), 11646–60.
- (14) Watson, R. J.; Weis, J. H.; Salstrom, J. S.; Enquist, L. W. Herpes simplex virus type-1 glycoprotein D gene: nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli*. *Science* **1982**, *218* (4570), 381–4.
- (15) Carfi, A.; Willis, S. H.; Whitbeck, J. C.; Krummenacher, C.; Cohen, G. H.; Eisenberg, R. J.; Wiley, D. C. Herpes simplex virus glycoprotein D bound to the human receptor HveA. *Mol. Cell* **2001**, *8* (1), 169–79.
- (16) Connolly, S. A.; Landsburg, D. J.; Carfi, A.; Wiley, D. C.; Eisenberg, R. J. Cohen GH. Structure-based analysis of the herpes simplex virus glycoprotein D binding site present on herpesvirus entry mediator HveA (HVEM). *J. Virol.* **2002**, *76* (21), 10894–904.
- (17) Krummenacher, C.; Supekar, V. M.; Whitbeck, J. C.; Lazear, E.; Connolly, S. A.; Eisenberg, R. J.; Cohen, G. H.; Wiley, D. C.; Carfi, A. Structure of unliganded HSV gD reveals a mechanism for receptor-mediated activation of virus entry. *EMBO J.* **2005**, *24* (23), 4144–53.

- (18) Rux, A. H.; Willis, S. H.; Nicola, A. V.; Hou, W.; Peng, C.; Lou, H.; Cohen, G. H.; Eisenberg, R. J. Functional region IV of glycoprotein D from herpes simplex virus modulates glycoprotein binding to the herpesvirus entry mediator. *J. Virol.* **1998**, *72* (9), 7091–98.
- (19) Lasaro, M. O.; Diniz, M. O.; Reyes-Sandoval, A.; Ertl, H. C.; Ferreira, L. C. 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 Infect.* **2005**, *7* (15), 1541–50.
- (20) Lasaro, M. O.; Tatsis, N.; Hensley, S. E.; Whitbeck, J. C.; Lin, S. W.; Rux, J. J.; Wherry, E. J.; Cohen, G. H.; Eisenberg, R. J.; Ertl, H. C. Targeting of antigen to the herpesvirus entry mediator augments primary adaptive immune responses. *Nat. Med.* **2008**, *14* (2), 205–12.
- (21) Diniz, M. O.; Lasaro, M. O.; Ertl, H. C.; Ferreira, L. C. Immune responses and therapeutic antitumor effects of an experimental DNA vaccine encoding human papillomavirus type 16 oncoproteins genetically fused to herpesvirus glycoprotein D. *Clin. Vaccine Immunol.* **2010**, *17* (10), 1576–83.
- (22) Lin, K. Y.; et al. Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. *Cancer Res.* **1996**, *56*, 21–6.
- (23) Ji, H.; Chang, E. Y.; Lin, K. Y.; Kurman, R. J.; Pardoll, D. M.; Wu, T. C. Antigen-specific immunotherapy for murine lung metastatic tumors expressing human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Int. J. Cancer* **1998**, *78* (1), 41–5.
- (24) Hung, C. F.; Monie, A.; Alvarez, R. D.; Wu, T. C. DNA vaccines for cervical cancer: from bench to bedside. *Exp. Mol. Med.* **2007**, *39* (6), 679–89.
- (25) Tindle, R. W.; Fernando, G. J. P.; Sterling, J. C.; Frazer, I. H. A “public” T-helper epitope of the E7 transforming protein of human papillomavirus 16 provides cognate help for several E7 B-cell epitopes from cervical cancer-associated human papillomavirus genotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *88* (13), 5887–91.
- (26) Sciortino, M. T.; Medici, M. A.; Marino-Merlo, F.; Zaccaria D.; Giuffrè-Cuculitto, M.; Venuti, A.; Grelli, S.; Mastino, A. Involvement of HVEM receptor in activation of nuclear factor kappaB by herpes simplex virus 1 glycoprotein D. *Cell. Microbiol.* **2008**, *10* (11), 2297–311.
- (27) Sciortino, M. T.; Medici, M. A.; Marino-Merlo, F.; Zaccaria, D.; Giuffrè-Cuculitto, M.; Venuti, A.; Grelli, S.; Bramanti, P.; Mastino, A. Involvement of gD/HVEM interaction in NF-κB-dependent inhibition of apoptosis by HSV-1 gD. *Biochem. Pharmacol.* **2008**, *76* (11), 1522–32.
- (28) de Alencar, B. C., P. M.; Persechini, F. A.; Haolla, G.; de Oliveira, J. C.; Silverio, J.; Lannes-Vieira, A. V.; Machado, R. T.; Gazzinelli, O.; Bruna-Romero; Rodrigues, M. M. Perforin and gamma interferon expression are required for CD4 and CD8 T-cell-dependent protective immunity against a human parasite, *Trypanosoma cruzi*, elicited by heterologous plasmid DNA prime-recombinant adenovirus 5 boost vaccination. *Infect. Immun.* **2009**, *77*, 4383–95.
- (29) Braga, C. J. M., L. M.; Massis, M. E.; Sbrógio-Almeida, B. C. G.; Alencar, B. Y.; Bargieri, S. B.; Boscardin, M. M.; Rodrigues; Ferreira, L. C. S. CD8 T cell adjuvant effects of Salmonella FliC_D flagellin in live vaccine vectors or as purified protein. *Vaccine* **2010**, *28*, 1373–82.
- (30) Armstrong, D. J.; Roman, A. The anomalous electrophoretic behavior of the human papillomavirus type 16 E7 protein is due to the high content of acidic amino acid residues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, *192* (3), 1380–87.
- (31) Kanodia, S.; Da Silva, D. M.; Kast, W. M. Recent advances in strategies for immunotherapy of human papillomavirus-induced lesions. *Int. J. Cancer* **2008**, *122*, 247–259.
- (32) Connolly, S. A.; Landsburg, D. J.; Carfi, A.; Whitbeck, J. C.; Zuo, Y.; Wiley, D. C.; Cohen, G. H.; Eisenberg, R. J. Potential nectin-1 binding site on herpes simplex virus glycoprotein D. *J. Virol.* **2005**, *79* (2), 1282–95.
- (33) Cheung, T. C.; Steinberg, M. W.; Osborne, 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. Unconventional ligand activation of herpesvirus entry mediator signals cell survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2009**, *106* (15), 6244–49.
- (34) Krieg, C.; Boyman, O.; Fu, Y. X.; Kaye, J. B. and T lymphocyte attenuator regulates CD8+ T cell-intrinsic homeostasis and memory cell generation. *Nat. Immunol.* **2007**, *8* (2), 162–71.
- (35) Krieg, C.; Han, P.; Stone, R.; Goularte, O. D.; Kaye, J. Functional analysis of B and T lymphocyte attenuator engagement on CD4+ and CD8+ T cells. *J. Immunol.* **2005**, *175* (10), 6420–27.
- (36) Han, P.; Goularte, O. D.; Rufner, K.; Wilkinson, B.; Kaye, J. An inhibitory Ig superfamily protein expressed by lymphocytes and APCs is also an early marker of thymocyte positive selection. *J. Immunol.* **2004**, *172* (10), 5931–39.
- (37) Kutzler, M. A.; Weiner, D. B. DNA vaccines: ready for prime time? *NatRev.* **2008**, *9*, 77–788.
- (38) Van der Burg, S.; Melief, C. J. M. Therapeutic vaccination against tumor papilloma virus induced malignancies. *Curr. Opin. Immunol.* **2011**, *23*, 252–257.



Bacillus subtilis spores as adjuvants for DNA vaccines



Luana R.M.M. Aps, Mariana O. Diniz, Bruna F.M.M. Porchia, Natiely S. Sales, Ana Carolina R. Moreno, Luís C.S. Ferreira*

Vaccine Development Laboratory, Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 April 2014

Received in revised form 5 March 2015

Accepted 16 March 2015

Available online 27 March 2015

Keywords:

Bacillus subtilis

Spores

Adjuvants

DNA vaccine

HPV-16

ABSTRACT

Recently, *Bacillus subtilis* spores were shown to be endowed with strong adjuvant capacity when co-administered with purified antigenic proteins. In the present study we assessed whether spores possess adjuvant properties when combined with DNA vaccines. We showed that *B. subtilis* spores promoted the activation of dendritic cells *in vitro* and induced migration of pro-inflammatory cells after parenteral administration to mice. Likewise, co-administration of spores with a DNA vaccine encoding the human papillomavirus type 16 (HPV-16) E7 protein enhanced the activation of antigen-specific CD8⁺ T cell responses *in vivo*. Mice immunized with the DNA vaccine admixed with spores presented a protective immunity increase to previously implanted tumor cells, capable of expressing HPV-16 oncoproteins. Finally, we observed that the adjuvant effect can vary accordingly to the number of co-administered spores which may be ascribed with the ability to induce. Collectively, the present results demonstrate for the first time that *B. subtilis* spores can also confer adjuvant effects to DNA vaccines.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Adjuvants are essential elements in the composition of most vaccine formulations, particularly in subunit vaccines such as those containing purified proteins or DNA vectors, which are naturally endowed with low immunogenicity in mammalian species, especially in humans. Notably, the repertoire of adjuvants for vaccines based on purified proteins has been significantly enlarged in the last years [1,2]. Concerning DNA vaccines, several approaches have been tested to improve the immune responses induced in large mammalian hosts, such as *in vivo* electroporation [3,4], codon usage optimization of the antigen-encoding sequence [5] and co-administration of plasmids encoding cytokines [6] or agonists of innate immunity [7–9]. The association of DNA vaccines with particulate adjuvants, such as poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA) biodegradable microparticles, has been also shown to enhance the immunogenicity elicited by protein-based and DNA vaccines, which may be related to their efficient phagocytosis by antigen presenting cells (APCs) including dendritic cells (DCs) and macrophages [10,11].

Bacillus subtilis spores have been successfully used as a probiotic for both humans and animals [12]. Moreover, *B. subtilis* spores have been successfully employed as vectors for the mucosal delivery of vaccine antigens [13–16]. Recently, *B. subtilis* have been shown to induce strong adjuvant effects after co-administration with protein antigens either admixed or adsorbed at the spore coat surface [17,18]. Nonetheless, no information is available concerning the adjuvant effects of bacterial spores as adjuvants for DNA vaccines, particularly for the induction of cellular immune responses, an immunological hallmark of such vaccine strategy.

In the present study, we demonstrate that *B. subtilis* spores display dose-dependent adjuvant effects on immune responses induced in mice after parenteral administration with a DNA vaccine. As a model vaccine, we employed a DNA plasmid encoding the human papillomavirus type 16 (HPV-16) E7 oncoprotein genetically fused to the herpes simplex virus type 1 glycoprotein D (gD), previously shown to confer preventive and therapeutic anti-tumor immunity in mice [19–21]. Here we showed that *B. subtilis* spores are capable to promote activation of DCs and induce a migratory behavior of pro-inflammatory cell populations in mice. Furthermore, co-administration of spores increased both the activation of antigen-specific CD8⁺ T cells and antigen-specific antibody production. Altogether, the present evidences demonstrate that *B. subtilis* spores display adjuvant effects when co-administered with DNA vaccines.

* Corresponding author. Tel.: +55 11 30917356.
E-mail address: lcsf@usp.br (L.C.S. Ferreira).

2. Materials and methods

2.1. Mice

Male C57BL/6 mice at 6–8 weeks of age were supplied by the Animal Breeding Center of the Biomedical Sciences Institute of the University of São Paulo and housed at the Parasitology Department of the University of São Paulo. All of the procedures involving animal handling followed the recommendations for the proper use and care of laboratory animals from the University of São Paulo Ethics Committee (protocol number 95-2011).

2.2. TC-1 cell line

The TC-1 cell line was kindly provided by Dr. T.C. Wu (John Hopkins University, Baltimore, MD, USA). This cell line is transfected with retrovirus vectors encoding v-Ha-ras, HPV-16 E6 and E7 [22]. The TC-1 cells were propagated in DMEM medium supplemented with 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 2 mM non-essential amino acids, 10 mM HEPES buffer, 50 units/ml penicillin/streptomycin, 10% fetal bovine serum (FBS) and were kept at 37 °C at 5% CO₂. Prior to inoculation, the TC-1 cells were harvested by trypsinization, washed twice, and suspended in serum-free media at the proper cell concentration.

2.3. DNA vaccine

The DNA vaccine pgDE7h encodes the HPV-16 E7 oncoprotein genetically fused near the C terminal portion of the HSV-1 gD protein as previously described [20]. The gene sequence was cloned in the pUMVC3 vector (Aldevron, ND, USA), which contains a CMV promoter and a kanamycin resistance-encoding gene.

2.4. Preparation of spores

The sporulation of *B. subtilis* strain 1012 was performed by the nutrient exhaustion method [23,24]. After 7 days of sporulation, the cultures were centrifuged at 10,000 rpm for 10 min and washed three times with distilled water. The spores were suspended in water and incubated for 1 h at 68 °C. The spores were visualized under a digital microscope EVOS® (AMG) and titrated to determine the number of colony-forming units (CFU/ml). The heat-killed spores were obtained from autoclaving viable spores at 121 °C for 15 min.

2.5. In vivo migration of pro-inflammatory cells

Mice were inoculated intraperitoneally with 5×10^8 live or killed spores in 100 µl of PBS. After 24 h, the peritoneal cavity was washed with 10 ml of PBS containing 2 mM EDTA and the collected cells were then incubated for 30 min at 4 °C with PE-labeled anti-Gr1, FITC-labeled anti-CD11b, APC-labeled anti-F4/80 and PerCP-Cy5.5-labeled anti-Ly6C (BD Biosciences). The cells were examined by flow cytometry using a FACS Canto (BD Biosciences) and data were analyzed using the FlowJo software (TreeStar, OR, USA).

2.6. Stimulation and activation of mouse DCs in vitro

Spleens and lymph nodes from naïve C57BL/6 mice were collected and placed into a culture dish containing cold RPMI medium supplemented with 10% FBS, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. The spleens were carefully macerated. Large particulate matter was removed by passing the cell suspension through a cell strainer 70 µm nylon membrane. Cells were washed with ice-cold MACS buffers (PBS, 0.5% bovine serum albumin, 2 mM EDTA)

and suspended in MACS buffer. Then, cells were incubated with MicroBeads (Miltenyi Biotec) conjugated to hamster anti-mouse CD11c monoclonal antibodies according to the manufacturer's protocols. Positively selected DCs contained >90% CD11c⁺ cells. For stimulation, DC cells were incubated for 24 h in the presence of LPS (100 ng/ml), DNA (1 µg of pgDE7h) or three different concentrations of live spores (2×10^6 , 2×10^7 and 2×10^8). After this period, the cells were stained with anti-CD11c, anti-I-A[b] (anti-MHCII), anti-CD40, anti-CD80 and anti-CD86 conjugated to different fluorochromes (BD Biosciences). The cells were examined by flow cytometry using FACS Fortessa (BD Biosciences) and data were analyzed using the FlowJo software (TreeStar, OR, USA). CD40, CD80 and CD86 expression values are shown from gated CD11c⁺MHCII⁺ cells. Data are shown as median fluorescence intensity.

2.7. Cytometric bead array (CBA)

The cytokines levels in the supernatant of dendritic cells cultures were measured after 24 h of stimulation. The test was conducted with the CBA kit Th1/Th2/Th17 (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions for the quantification of IL-2, IL-4, IL-6, INF-γ, TNF-α, IL-17A and IL-10. In summary, the sample and the cytokine kit standards were mixed with microspheres coated with capture antibodies specific for the respective cytokines. Then, samples are incubated with the detection antibody labeled with phycoerythrin (PE) for 2 h at room temperature and protected from light. The flow cytometric analysis was based on the fluorescence intensity using FACS Fortessa (BD Biosciences). The data were analyzed with the aid of the FCAP Array 3.0 to determine the concentration (pg/ml) and means of fluorescence intensities (MFI) of the samples and standards.

2.8. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

The anti-gD, anti-E7 and anti-spores antibody titers were measured by ELISA as previously described [25]. Plates were coated with 250 ng/well of purified truncated E7 fragment (amino acid 1 to 60) or purified gD in MaxiSorp plates (Nunc). After incubation for 16 h at 4 °C, the plates were blocked with 3% gelatin in PBS and incubated at 37 °C for 2 h. Individual serum samples were added at the initial 1:10 dilution and subsequent two fold serial dilutions. Plates were kept at 37 °C for 1 h. After incubation, anti-mouse IgG conjugated to peroxidase (1:3000) was added and the reaction was later developed with a solution containing O-fenilenodiaminadihydrochloro (OPD). The optical densities were determined at 492 nm in Epoch™ Multi-Volume Spectrophotometer (Bio Tek Instruments). All samples were assayed in duplicates and the absorbance values of control reactions (wells without serum addition) were subtracted from results obtained with the tested serum samples. Dilution curves were drawn for each sample and the titers calculated as the reciprocal values of the highest dilution with an optical density of 0.1.

2.9. Immunization and tumor cell challenge

Groups of 5 mice were challenged subcutaneously (s.c.) with 7.5×10^4 TC-1 tumor cells suspended in 100 µl of serum-free media and injected into the right rear flank of the animals. The mice were vaccinated with one 40 µg dose of the DNA vaccine (co-administered with spores or not) 3 days after the implantation of the tumor cells. The vaccine dose was applied into the tibialis anterior muscle of each mice hind limb (divided in two 50 µl aliquots). Tumor growth was monitored by visual inspection and palpation three times a week for a period of 60 days. The animals were scored as tumor-bearing when the tumors reached a size of approximately

2 mm in diameter. The mice were euthanized once the tumors exceeded a diameter of 15 mm or became necrotic.

2.10. Intracellular cytokine staining

Intracellular IFN- γ staining was performed from blood samples collected 7, 14, 21 or 28 days after the vaccine administration, according to previously described procedures [20]. The blood samples were treated for lysis of red blood cells and cultured at a concentration of 10^6 cells/well for 6 h at 37 °C in 96-well round bottom microtiter plates with 10 μ g/ml of Brefeldin A (GolgiPlug; BD Biosciences, CA, USA) in the presence or not of 3 μ g/ml of the E7-specific RAHYNIVTF peptide (amino acids 49–57) [26]. After incubation, cells were stained with FITC-conjugated anti-CD8a antibody and after fixation and permeabilization, with PE-labeled anti-IFN- γ . The buffers and antibodies were purchased from BD Biosciences (CA, USA). The cells were examined by flow cytometry using a FACS Fortessa (BD Biosciences) and data were analyzed using FlowJo software (TreeStar, OR, USA).

2.11. Statistical analyses

The ANOVA test was applied followed by Bonferroni's post-test, when individual data points were compared.

3. Results

3.1. *B. subtilis* spores promote migration of pro-inflammatory cells and DC activation in mice

Live and heat-killed spores were tested for the migration of pro-inflammatory cells after i.p. administration and subsequent identification of different migratory cell populations. As indicated

in Fig. 1, both live (LS) and heat-killed spores (KS) induced a significant influx of CD11b⁺ and CD11b⁺Gr1⁺ cells (Fig. 1A and C), which may represent neutrophils, eosinophils or immature myeloid cells, also F4/80⁺ and F4/80⁺Ly6C^{hi} cells (Fig. 1B and D), corresponding to macrophages and inflammatory monocytes. No significant influx of CD19⁺ or CD11c⁺ cells were detected in the peritoneal cavity of mice inoculated with *B. subtilis* spores (data not shown).

In addition, we determined the capacity of spores to activate mouse DCs after *in vitro* stimulation with different quantities of spores. As presented in Fig. 2, CD11c⁺ MHCII⁺ DCs of naïve mice exposed to the intermediate spores amount (2×10^7 LS) upregulated the expression of the co-stimulatory receptors CD40 (Fig. 2A and B) and CD80 (Fig. 2C and D) with regard to PBS treated cells. No effects were observed with plasmid DNA or at a higher (2×10^8) spore dose, with no detectable fluorescence enhancement for the three tested markers. Also, DCs exposed to a lower (2×10^6) spore dose enhanced the expression of CD40 but at a reduced intensity with regard to the intermediate spore dose (Fig. 2B). Inflammatory cytokines (TNF- α and IL-6) in cell culture supernatants were detected in elevated values in cells exposed to LPS and the two highest spore concentrations. In contrast, only the sample incubated with 2×10^8 LS showed measurable IL-10 values (Fig. 2D). Altogether, these results demonstrated that *B. subtilis* spores can induce migration of murine pro-inflammatory cells and DC activation, which further support the adjuvant effects of spores co-administered with DNA vaccines.

3.2. Activation of CD8⁺ T cell responses and therapeutic anti-tumor protection in mice co-administered with spores and pgDE7h

To demonstrate that *B. subtilis* spores could also exert adjuvant effects to DNA vaccines, we inoculated mice i.m. with spores

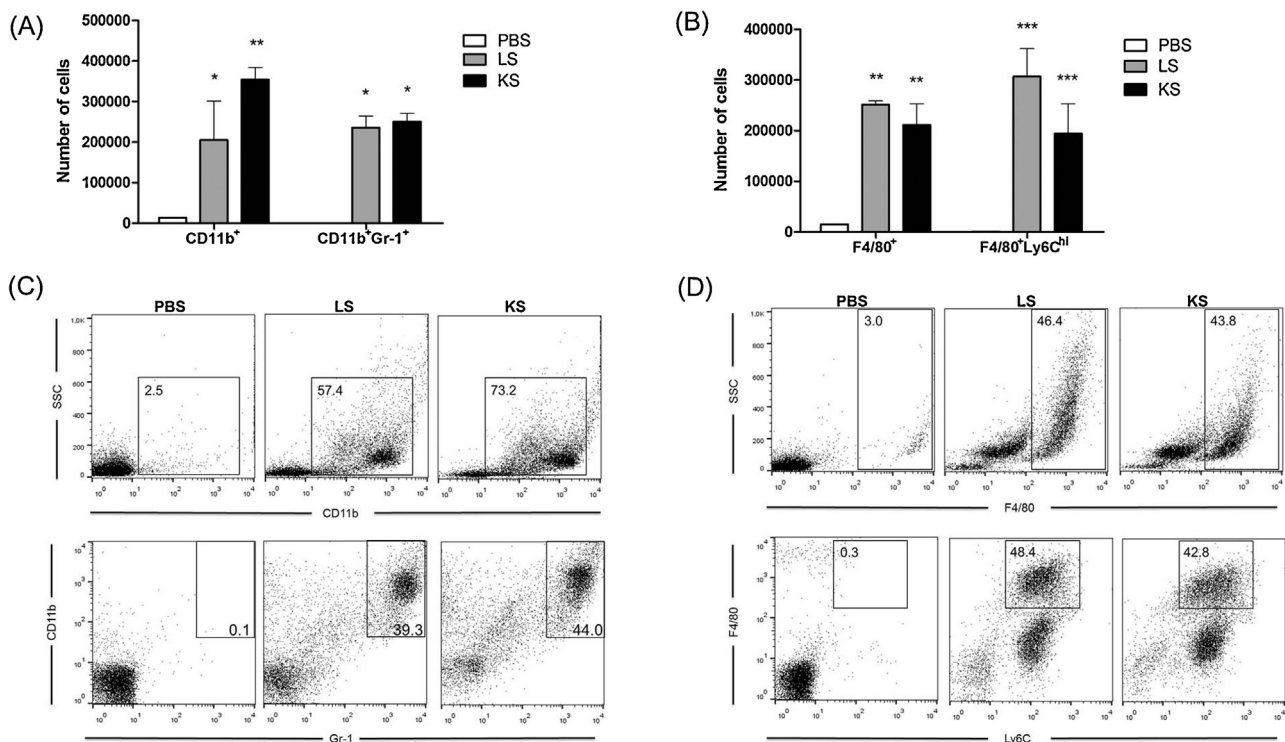


Fig. 1. *B. subtilis* spores induce pro-inflammatory cell migration in vivo. Cell recruitment in naïve C57BL/6 mice after i.p. inoculation of 5×10^8 live spores (LS) or 5×10^8 killed spores (KS). Intraperitoneal CD11b⁺ and CD11b⁺Gr-1⁺ (A and C), F4/80⁺ and F4/80⁺Ly6C^{hi} (B and D) inflammatory cells were quantified by flow cytometry 24 h after inoculation. (A and B) Number of stained cells recovered for different population as indicated. Data based on three animals per group and generated in two independent experiments with similar results. (C and D) Data are represented as dot plots from one representative mice per group. Numbers in the upper corners show the percentages of stained cells from the total recovered cells. Statistical significance: (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0.001$, versus the group treated with PBS by ANOVA.

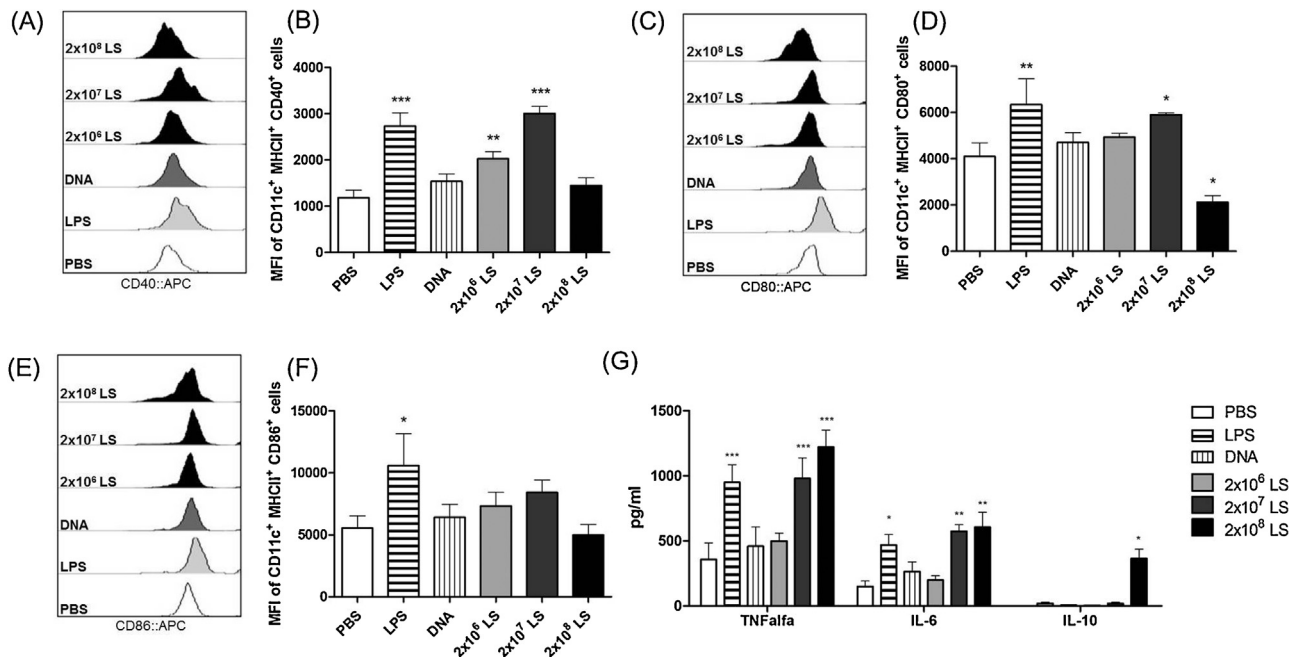


Fig. 2. *B. subtilis* spores induce in vitro DC activation after stimulation with an intermediate spore amount. DCs (2×10^5 cells) purified from naïve mice lymphoid organs were incubated with LPS (100 ng/ml), DNA (1 μ g of pgDE7h) or three different concentrations of live spores (2×10^6 , 2×10^7 and 2×10^8 LS). Non-treated cells were added with the same volume of PBS. Supernatants were collected after 24 h for measurements of cytokines production. Surface expression of CD40, CD80 and CD86 (APC) was measured by flow cytometry after gating in CD11c⁺MHCII⁺ cells. Data are shown as histograms from one representative sample (A, C and E) or as Median Fluorescence Intensity (MFI) bar graphs of CD40, CD80 and CD86 APC markers (B, D and F). (G) TNF- α , IL-6 and IL-10 induction after stimulation with the same conditions cited above. Data represented by mean values \pm SD. Results are based on two independent experiments and each one performed in triplicates. Statistical significance: (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0.001$ versus PBS group by ANOVA.

(2×10^7) admixed with a plasmid DNA (pgDE7h) at a dose capable of inducing low CD8⁺ T cell responses to the HPV-16 E7 oncoprotein and partial therapeutic protection to tumors in mice engrafted with the cells (TC-1) expressing HPV-16 oncoproteins [20]. Co-administration of spores and pgDE7h three days after implantation of TC-1 cells significantly enhanced the IFN- γ production by E7-specific CD8⁺ T cells compared to mice immunized only with the DNA vaccine or spores separately (Fig. 3A and B). Mice inoculated with live spores admixed with the pgDE7h showed higher activation of antigen-specific CD8⁺ T cells in comparison to mice co-inoculated with heat-killed spores (approximately a two-fold increase). However, co-administration of pgDE7h with both live and killed spores conferred 80% therapeutic anti-tumor immunity, a significantly higher protection values with regard to mice immunized with the same amount of DNA vaccine (40% survival) (Fig. 3C). Altogether, these results show that *B. subtilis* spores enhance the pgDE7h-induced CD8⁺ T cell activation and T cell-mediated anti-tumor protective immunity.

3.3. Dose-dependent adjuvant effects of *B. subtilis* on the immune responses induced by pgDE7h

The DC activation results suggest that the immune modulation effects of spores are dose dependent. Thus, we tested the effects exert by different number of spores co-delivered with pgDE7h regarding both activation of antigen-specific CD8⁺ T cells and antigen-specific antibody responses, as well as the anti-tumor protection effects (Fig. 4). The induction of E7-specific CD8⁺ T cell responses elicited in mice immunized with pgDE7h reached maximal values two weeks after immunization and was detected with 2×10^7 live spores (Fig. 4A). Accordingly, 80% of the mice co-inoculated with 2×10^7 spores and pgDE7h remained tumor-free, whereas mice co-administered with 10-fold less or 10-fold more spores showed lower anti-tumor protection levels (Fig. 4B).

Different results were observed after measurement of the anti-gD and anti-E7 antibody responses. Maximal anti-gD and anti-E7 serum IgG levels were achieved in mice immunized with pgDE7h admixed with 2×10^6 spores (Fig. 4C and D). Low anti-spores IgG titers were observed only in mice immunized with the higher number of spores (Fig. 4E). These results suggest that the spore adjuvant effects are dose dependent and require a specific balance of spores and DNA in order to efficiently activate the different arms (CD8⁺ T lymphocytes or antibody production) of the adaptive immune system.

4. Discussion

The adjuvant effects of *B. subtilis* spores have been previously reported using protein-based vaccines and were based on the induction of antigen-specific antibody responses. Nonetheless, no study has been previously performed to investigate the impact of spore administration in the enhancement of immune responses induced by DNA vaccines. In addition, little is known about the potential adjuvant effects of bacterial spores on the cellular immune responses induced by vaccines. In this scenario, our work has investigated both the ability of *B. subtilis* spores to increase the immune responses induced by a DNA vaccine and demonstrated experimentally that co-administration of spores enhance the induction of cytotoxic responses induced by vaccines. Based on a DNA vaccine encoding the HPV-16 E7 oncoprotein, our results demonstrated that both live and heat-killed spores increased the activation of antigen-specific CD8⁺ T cells, as well as the functionality of the induced immune response, measured by the vaccine-induced therapeutic anti-tumor effects. Moreover, we showed that *B. subtilis* spores activate DCs, recruit pro-inflammatory cells, which is in accordance with the immunomodulatory effects of spores both for purified proteins and DNA vaccines. Finally, our results indicated that, regarding to

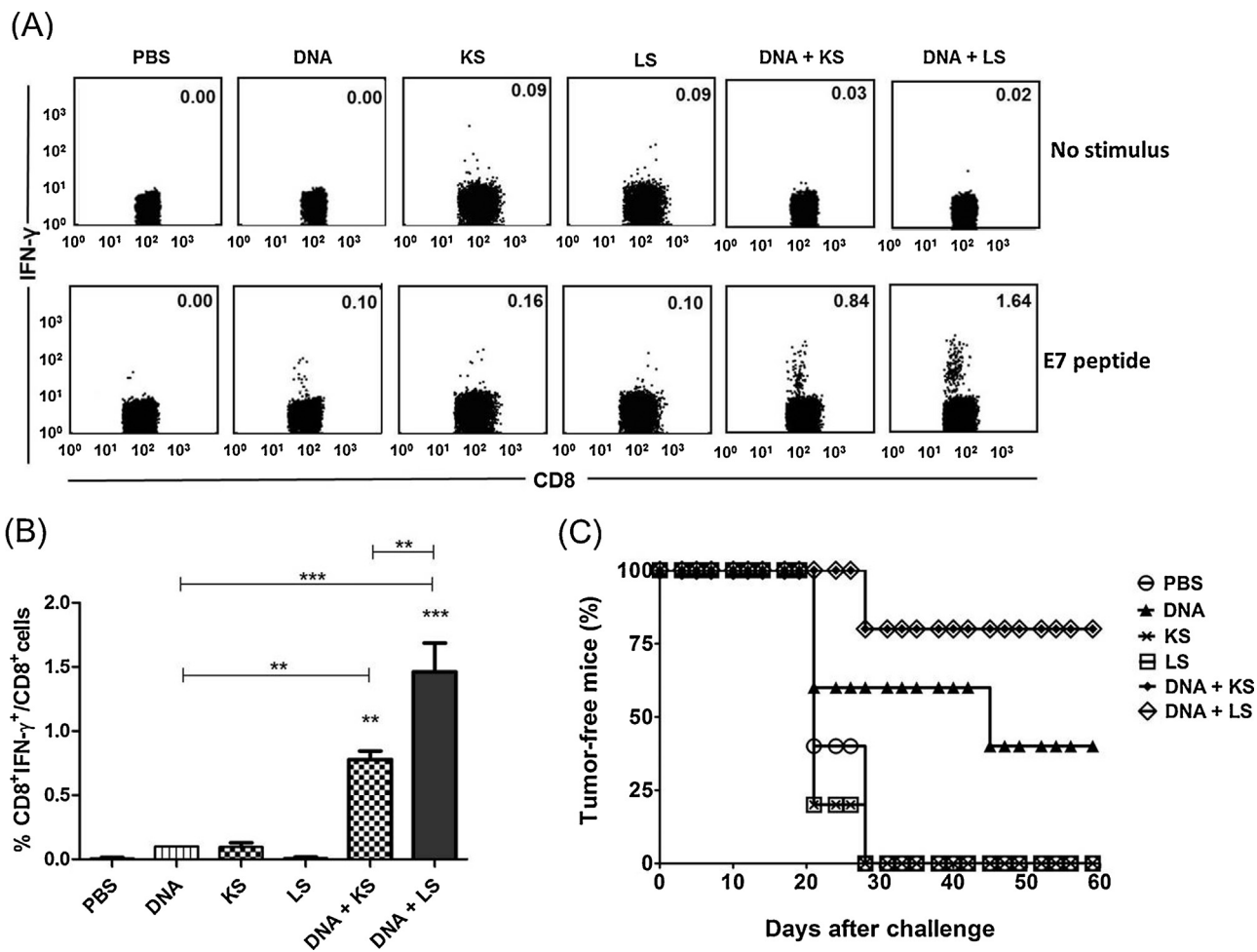


Fig. 3. Co-administration of *B. subtilis* spores and pgDE7h induce enhanced E7-specific CD8⁺ T cell responses and therapeutic anti-tumor immunity. C57BL/6 mice were immunized with 40 μ g of pgDE7h alone or admixed with 2×10^7 live (DNA+LS) or heat-killed (DNA+KS) spores or 2×10^7 LS or KS alone 3 days after the implantation of TC-1 cells. (A and B) Frequencies of IFN- γ ⁺-producing CD8⁺ T cells of PBMC pools were assessed two weeks after the immunization and after *in vitro* stimulation with or without the E7-MHC class I peptide (⁴⁹RAHYNIVTF⁵⁷). (A) Data are represented as dot plots from one representative experiment. Numbers at the upper right corner indicate the percentage of CD8⁺ IFN- γ ⁺ cells from total CD8⁺ T cells. (B) Data are presented as the percentage of CD8⁺ IFN- γ ⁺ cells from total CD8⁺ T cells. The percentages of stimulated samples were subtracted from unstimulated sample percentages. (C) Percentage of tumor-free mice 60 days after administration of the TC-1 cells. Data are based on the results obtained on two independent experiments with five mice per group of each experiment ($n = 10$). Statistical significance: (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0.001$ versus PBS group by ANOVA.

DNA vaccines, the adjuvant effects of spores, including activation antigen-specific cellular responses and antibody production, are dose-dependent in the murine host, requiring different amounts of spores to induced maximal enhancement of the induced responses.

In our work, *B. subtilis* spores induced the migration of CD11b⁺, CD11b⁺Gr1⁺, F4/80⁺ and F4/80⁺Ly6C^{hi} cells, indicating the attraction of neutrophils, immature myeloid cells, macrophages and inflammatory monocytes to the inoculated mice peritoneal cavity. Moreover, *B. subtilis* spores upregulated expression of CD40 and CD86 co-activation markers in DCs. These results reinforce the application of spores as vaccine adjuvants, since this category of molecules increase the adaptive immune responses usually by activation of cells involved with the innate immune system. This fact is especially relevant for particulate adjuvants, which require uptake by APCs for proper enhancement of adaptive immune responses. For instance, $\sim 1 \mu$ m microparticles have been shown to be taken up by APCs, such as DCs, *in vivo*, leading to migration to the T-cell area of the draining lymph nodes and subsequent maturation [27]. In particular, an efficient DC-mediated endocytosis of *B. subtilis* spores has been associated with enhanced priming of T cell responses [17]. Thus, spores seem to act as delivery system to APCs and promote direct activation of these cells, particularly for DCs. In fact, DC

exposed to *B. subtilis* spores induced up-regulation of MHC I, MHC II and co-stimulatory molecules, such as CD40, CD25 and CD86, in the absence of exogenous stimulus [28–30]. The mechanisms related to the spore adjuvant effects have also been attributed to the DCs TLR-mediated signaling, particularly the TLR2 receptor [28,30].

The interactions between spores and DCs have been shown to induce a balanced Th1 and Th2 immune response pattern when spores are co-administered with purified proteins and viral particles [17,28,29]. Moreover, the adjuvant effects of *B. subtilis* spores have been reported to occur in a dose-dependent manner [17,29]. Using diverse antigens as models, the intensity of T cell proliferation and IgA and IgG production, increased proportionally to the concentration of spores co-administered with the antigen [17,29]. In our study, both expressions of co-stimulatory molecules, CD8⁺ T cell activation and anti-tumor immunity were achieved with an intermediate spore concentration (2×10^7). On the other hand, maximal induction of antigen-specific antibody responses was achieved at a lower spore concentration. Notably, a larger amount of spores (2×10^8) promoted down-regulation or no enhancement of CD80 or CD40 and CD86 in DCs and promoted secretion of IL-10, an immunosuppressive cytokine. Also, administration of the

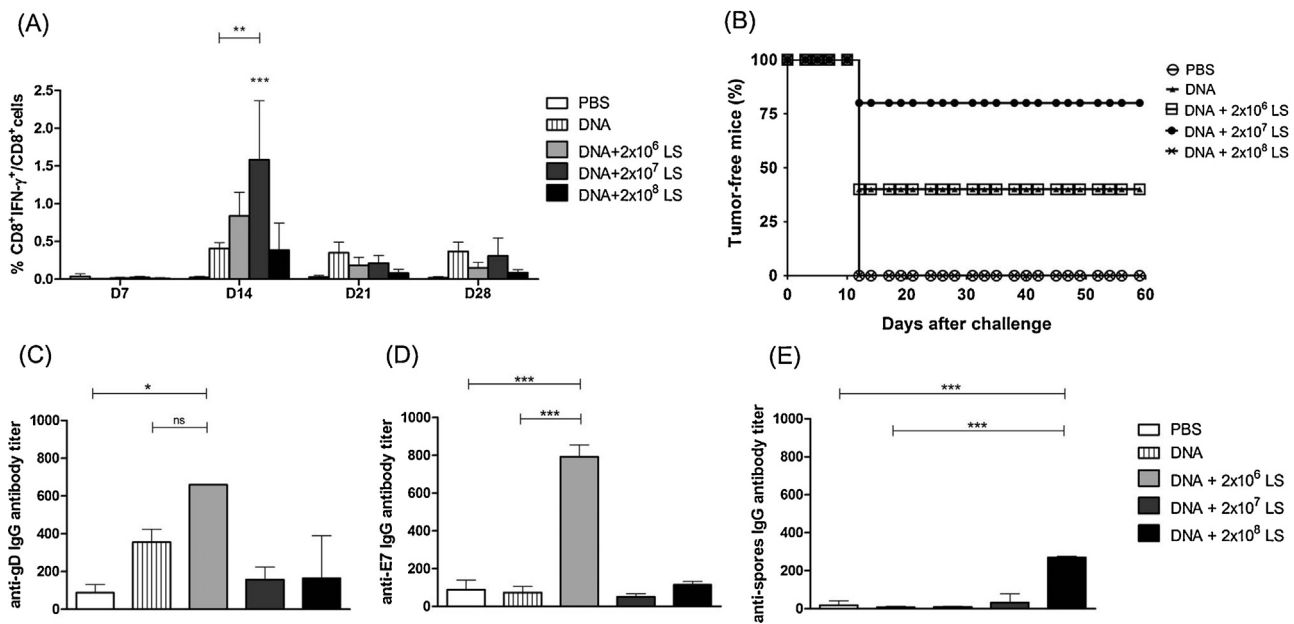


Fig. 4. Dose dependent adjuvant effects of *B. subtilis* spores. C57BL/6 mice were immunized with 40 μg of pgDE7h or mixed with 2×10^6 , 2×10^7 or 2×10^8 live spores (LS) 3 days after inoculation with TC-1 cells. (A) Data represent the percentage of CD8⁺IFN- γ ⁺ T cell/total CD8⁺ T cells in PBMC samples collected from individual mice 7, 14, 21 and 28 days after the immunization and incubated *in vitro* with or without the E7-MHC class I peptide (⁴⁹RAHYNIIVT⁵⁷). Data are based on five animals per group ($n = 5$). The percentages of stimulated samples were subtracted from unstimulated sample percentages. (B) Data represent the percentage of tumor-free mice 60 days after transplantation of tumor cells. Data were based on five animals per group of two independent experiments ($n = 10$). (C–E) Induction of anti-gD (C), anti-E7 (D) and anti-spores (E) serum IgG responses in mice immunized with pgDE7h admixed or not with different amounts of *B. subtilis* spores. Sera were analyzed individually and collected 14 days after the single dose. Data are based on five animals per group ($n = 5$). Statistical significance: (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0.001$ versus PBS group by ANOVA.

DNA vaccine combined to 2×10^8 spores did not increase tumor-specific cellular and antibody responses, neither enhanced the vaccine induced anti-tumor immunity, which may correlate with the *in vitro* immunosuppressive effects on DCs. Our study suggests, therefore, that *B. subtilis* spores enhance both humoral and cellular (cytotoxic) immune response induced by DNA vaccines but the adjuvant effects are finely tuned by the amount of co-administered spores. In conclusion, our study describes a novel immunobiological use of *B. subtilis* spores as particulate adjuvants for DNA vaccines. In particular, our results raise interesting perspectives regarding the enhancement of antigen-specific cytotoxic responses induced by DNA vaccines, thus, representing an alternative tool for anti-cancer and anti-viral vaccines.

Conflict of interest statement

We certify that there is no conflict of interest with any financial organization regarding the material discussed in the manuscript.

Acknowledgments

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—CAPES and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo—FAPESP (2011/13805-1) grants. We thankfully acknowledge the experiments performance of Souza RD and Mathias-Santos C also the technical assistance of Martins EG of Vaccine Development Laboratory, University of São Paulo, Brazil.

References

- [1] Esparza-Gonzalez SC, Troy AR, Izzo AA. Comparative analysis of *Bacillus subtilis* spores and monophosphoryl lipid A as adjuvants of protein based Mycobacterium tuberculosis based vaccines: the partial requirement for IL-17A for induction of protective immunity. *Clin Vaccine Immunol* 2014;21(4):501–8.
- [2] Chua BY, Olson MR, Bedoui S, Sekiya T, Wong CY, Turner SJ, et al. The use of a TLR2 agonist-based adjuvant for enhancing effector and memory CD8 T-cell responses. *Immunol Cell Biol* 2014;92(4):377–83.
- [3] Bagarazzi ML, Yan J, Morrow MP, Shen X, Parker RL, Lee JC, et al. Immunotherapy against HPV16/18 generates potent Th1 and cytotoxic cellular immune responses. *Sci Transl Med* 2012;10(4):155ra138.
- [4] Best SR, Peng S, Juang CM, Hung CF, Hannaman D, Saunders JR, et al. Administration of HPV DNA vaccine via electroporation elicits the strongest CD8⁺ T cell immune responses compared to intramuscular injection and intradermal gene gun delivery. *Vaccine* 2009;27(40):5450–9.
- [5] Gustafsson C, Govindarajan S, Minshull J. Codon bias and heterologous protein expression. *Trends Biotechnol* 2004;22:346–53.
- [6] Kang TH, Mao C-P, He L, Tsai Y-C, Liu K, La V, et al. Tumor-targeted delivery of IL-2 by NKG2D leads to accumulation of antigen-specific CD8⁺ T cells in the tumor loci and enhanced anti-tumor effects. *PLoS ONE* 2012;7(4):e35141.
- [7] Ohlschlager P, Spies E, Alvarez G, Quetting M, Groettrup M. The combination of TLR-9 adjuvantation and electroporation-mediated delivery enhances *in vivo* antitumor responses after vaccination with HPV-16 E7 encoding DNA. *Int J Cancer* 2011;128(2):473–81.
- [8] Saade F, Petrovsky N. Technologies for enhanced efficacy of DNA vaccine. *Expert Rev Vaccines* 2012;11(2):189–209.
- [9] Dubensky JR TW, Reed SG. Adjuvants for cancer vaccines. *Semin Immunol* 2010;22(3):155–61.
- [10] Jilek S, Merkle HP, Walter E. DNA-loaded biodegradable microparticles as vaccine delivery systems and their interaction with dendritic cells. *Adv Drug Deliv Rev* 2005;57:377–90.
- [11] O'Hagan D, Singh M, Ugozzoli M, Wild C, Barnett S, Chen M, et al. Induction of potent immune responses by cationic microparticles with adsorbed human immunodeficiency virus DNA vaccines. *J Virol* 2001;75(19):9037–43.
- [12] Hong HA, Duc LH, Cutting SM. The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiol Rev* 2005;29:813–35.
- [13] Duc LH, Hong HA, Fairweather N, Ricca E, Cutting SM. Bacterial spores as vaccine vehicles. *Infect Immun* 2003;71:2810–8.
- [14] Pancez JD, Luiz WB, Sbrogio-Almeida ME, Ferreira RCC, Schumann W, Ferreira LCS. Stable episomal expression system under control of a stress inducible promoter enhances the immunogenicity of *Bacillus subtilis* as a vector for antigen delivery. *Vaccine* 2006;24:2935–43.
- [15] Pancez JD, Nguyen HD, Luiz WB, Ferreira RCC, Sbrogio-Almeida ME, Ferreira LCS. Evaluation of different promoter sequences and antigen sorting signals on the immunogenicity of *Bacillus subtilis* vaccine vehicles. *Vaccine* 2007;25:4671–80.
- [16] Huang J-M, Hong HA, Tong HV, Hoang TH, Brisson A. Mucosal delivery of antigens using adsorption to bacterial spores. *Vaccine* 2010;28:1021–30.
- [17] Barnes AGC, Cerovic V, Hobson PS, Klavinskis LS. *Bacillus subtilis* spores: a novel microparticle adjuvant which can instruct a balanced Th1 and Th2 immune response to specific antigen. *Eur J Immunol* 2007;37:1538–47.
- [18] Liang J, Fu J, Kang H, Lin J, Yu Q, Yang Q. The stimulatory effect of TLRs ligands on maturation of chicken bone marrow-derived dendritic cells. *Vet Immunol Immunopathol* 2013;155(3):205–10.

- [19] Diniz MO, Lasaro MO, Ertl HC, Ferreira LCS. Immune responses and therapeutic anti-tumor effects of an experimental DNA vaccine encoding the human papillomavirus type-16 (HPV-16) oncoproteins genetically fused to the herpes virus glycoprotein D (gD). *Clin Vaccine Immunol* 2010;17:1576–83.
- [20] Diniz MO, Cariri FAMO, Aps LRMM, Ferreira LCS. Enhanced therapeutic effects conferred by an experimental DNA vaccine targeting human papillomavirus-induced tumors. *Hum Gene Ther* 2013;24(10):861–70.
- [21] Santana VC, Diniz MO, Cariri FAM, Ventura AM, Cunha-Neto E, Almeida RR, et al. Bicistronic DNA vaccines simultaneously encoding HIV, HSV and HPV antigens promote CD8⁺ T cell responses and protective immunity. *PLoS ONE* 2013;8(8):e71322.
- [22] Lin KY, Guarnieri FG, Staveley-O'Carroll KF, Levitsky HI, August JT, Pardoll DM, et al. Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. *Cancer Res* 1996;56(1):21–6.
- [23] Foerster HF, Foster JW. Endotrophic calcium, strontium, and barium spores of *Bacillus megaterium* and *Bacillus cereus*. *J Bacteriol* 1966;91(3):1333–44.
- [24] Tavares MB, Souza RD, Luiz WB, Cavalcante RCM, Casaroli C, Martins EG, et al. *Bacillus subtilis* endospores at high purity and recovery yields: optimization of growth conditions and purification method. *Curr Microbiol* 2013;66:279–85.
- [25] Sbrogio-Almeida ME, Mosca T, Massis LM, Abrahamsohn IA, Ferreira LCS. Host and bacterial factors affecting induction of immune responses to flagellin expressed by attenuated salmonella vaccine strains. *Infect Immun* 2004;72(5):2546–55.
- [26] Feltkamp MC, Smits HL, Vierboom MP, Minnaar RP, De Jongh BM, Drijfhout JW, et al. Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope-containing peptide protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16-transformed cells. *Eur J Immunol* 1993;23:2242–9.
- [27] O'Hagan DT, Valiante NM. Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. *Nat Rev Drug Discov* 2003;2:727–35.
- [28] Souza RD, Batista MT, Luiz WB, Cavalcante RCM, Amorim JH, Bizerra RSP, et al. *Bacillus subtilis* spores as vaccine adjuvants: further insights into the mechanisms of action. *PLoS ONE* 2014;9(1).
- [29] Song M, Hong HA, Huang JM, Colenutt C, Khang DD, Guyen TVA, et al. Killed *Bacillus subtilis* spores as a mucosal adjuvant for an H5N1 vaccine. *Vaccine* 2012;30:3266–77.
- [30] Cerovic V, Jenkins CD, Barnes AGC, Milling SWF, Macpherson GG, Klavinskis LS. Hyporesponsiveness of intestinal dendritic cells to TLR stimulation is limited to TLR4. *J Immunol* 2009;182:2405–15.