

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

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.

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 intraepiteliais 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 linfotóxina 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.

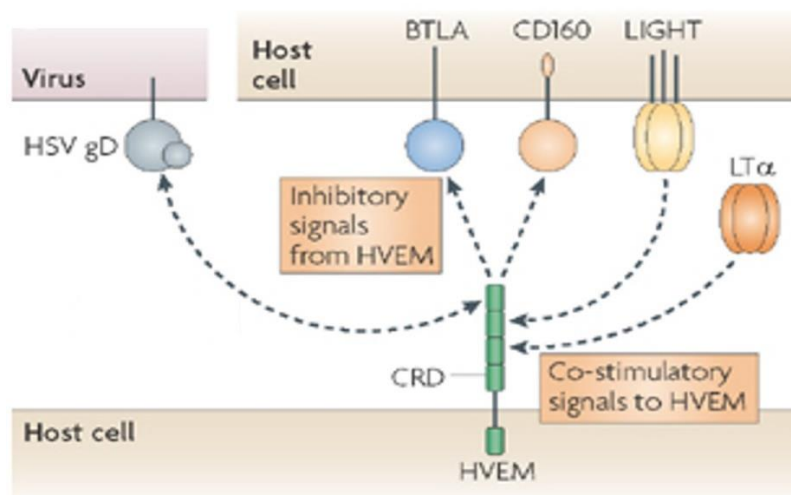


Figura 1. Regulação do sistema imune mediada pelo receptor HVEM. Os ligantes LIGHT e LT- α interagem com o receptor HVEM pelos domínios ricos em cisteína 2 e 3 (CRD2 e CRD3), o que desencadeia a sinalização coestimuladora em células que expressam este receptor. Os ligantes BTLA e CD160 interagem com 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 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.

REFERÊNCIAS¹

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.

¹De 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 -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 intracлонаl 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.