

Érica Akemi Kavati

**DESENVOLVIMENTO DE VACINA PROFILÁTICA
E TERAPÊUTICA CONTRA O HPV E CÂNCERES
ASSOCIADOS AO VÍRUS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-
graduação Interunidades em
Biotecnologia USP / Instituto Butantan /
IPT, para obtenção do Título de Doutor
em Biotecnologia.

São Paulo
– 2017 –

Érica Akemi Kavati

**DESENVOLVIMENTO DE VACINA PROFILÁTICA
E TERAPÊUTICA CONTRA O HPV E CÂNCERES
ASSOCIADOS AO VÍRUS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia USP / Instituto Butantan / IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Profa. Dra. Aurora Marques Cianciarullo

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

São Paulo
– 2017 –

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Kavati, Érica Akemi
Desenvolvimento de Vacina Profilática e
Terapêutica contra o HPV e Cânceres Associados ao
Virus / Érica Akemi Kavati; orientadora Aurora
Marques Cianciarullo. -- São Paulo, 2017.
101 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. HPV. 2. Vacinas. 3. Câncer. 4. Proteína
Recombinante. 5. DNA Recombinante. I. Cianciarullo,
Aurora Marques, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia

Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Érica Akemi Kavati

Título da Tese: DESENVOLVIMENTO DE VACINA PROFILÁTICA E TERAPÊUTICA CONTRA O HPV E CÂNCERES ASSOCIADOS AO VÍRUS.

Orientador(a): Aurora Marques Cianciarullo.

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

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

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

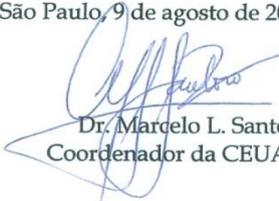
Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Desenvolvimento de vacinas recombinantes profiláticas e terapêuticas contra o HPV e os cânceres associados ao vírus", **protocolo nº 923/12**, sob a responsabilidade de Aurora Marques Cianciarullo – que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 8/8/12.

Vigência do Projeto:	Nº de animais/espécie
07/2012 - 12/2017 Laboratório de Genética	180 camundongos Balb/c 50 dias (M); 180 camundongos C57Bl/6 50 dias (M)

São Paulo, 9 de agosto de 2012


Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEUAIB

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Ryosuke e Akico por todo o amor e apoio, por estarem sempre
ao meu lado guiando os meus caminhos.

Ao meu marido, Alexandre Sasaki, que mesmo à distância, foi fundamental na
realização desse trabalho, pelas discussões científicas, dedicação, amor,
companheirismo e compreensão.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Aurora Marques Cianciarullo por todo ensinamento passado que não se limitaram à ciência e tecnologia, também transcenderam à visão crítica sobre a vida, a ciência e as pessoas. Por toda dedicação, empenho e sabedoria. Pelo respeito e amizade compartilhada ao longo desses oito anos de convívio.

À Fernanda Oliveira Bou Anni, aluna do Programa de Aperfeiçoamento Pessoal – SES/SP, por ser meu braço direito, e às vezes, esquerdo também. Pelo enorme auxílio na realização dos experimentos, pela amizade, pela confiança e pelas muitas e muitas conversas, risadas e comilanças.

À Profa. Dra. Dirce Sakauchi pelas diversas discussões sobre os protocolos e experimentos. Pelos anos de convivência e amizade.

À Fernanda Marcelli Rosa, auxiliar em saúde do Laboratório de Genética, por toda ajuda prestada no desenvolvimento do trabalho e por garantir um laboratório sempre organizado e sem que falte o essencial. Pela amizade, dedicação, conversas e muitas risadas.

Ao Tadeu da Cruz Menezes, auxiliar em saúde do Laboratório de Genética, pela ajuda na realização dos experimentos com animais, por estar sempre disponível a ajudar e criar soluções criativas para os problemas que foram surgindo ao longo do trabalho. Pela amizade, dedicação e muitas conversas.

À Vera Lúcia Aparecida R. de Farias, *in memoriam*, técnica do Laboratório de Genética, pela ajuda ao longo de seus últimos anos de vida no desenrolar de trâmites burocráticos dentro do Instituto Butantan. Pela amizade, carinho e ensinamentos.

A todas as alunas que passaram pelo Laboratório de Genética, unidade de Microscopia Eletrônica, ao longo desses últimos oito anos: Raquel Agonilha Canali, Bianca Marigliani, Heloisa B. Oliveira e Fernanda B. Andrade, que de alguma maneira sempre contribuíram para a realização desse trabalho.

À Dra. Irina Kerkis, diretora do Laboratório de Genética do Instituto Butantan, pela disponibilidade de acesso aos equipamentos de seu laboratório e pelo auxílio na aquisição de alguns reagentes necessários ao desenvolvimento do presente estudo.

Ao Dr. Ronaldo Zucatelli Mendonça e ao técnico Alexander Souza Santos, do Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan, pelo auxílio e acesso ao microscópio confocal.

Ao Dr. Luiz Carlos de Souza Ferreira e ao Dr. Paulo Lee Ho por terem cedido gentilmente a linhagem celular TC-1.

Ao Dr. Jorge Mário C. Ferreira Junior e à Dra. Denise V. Tambourgi, do Laboratório de Imunoquímica do Instituto Butantan, pelo acesso e auxílio na análise dos dados obtidos através da citometria de fluxo.

À Dra. Luciana Cerqueira Leite e Dra. Dunia del Carmen R. Soto, do Laboratório de Biotecnologia Molecular do Instituto Butantan, pelo acesso solícito ao equipamento BD FACS Canto II.

A todos os funcionários do Laboratório de Genética do Instituto Butantan por toda contribuição, em especial o Msc. Eduardo Osório Frare e Msc. Dener Madeiro de Souza pelo auxílio no uso de equipamentos e pela disponibilidade em ajudar. Aos funcionários Jovelino A. Oliveira Júnior, Ronaldo Cruz e Fátima Aparecida Cagnotto pelo cuidado com os animais utilizados no presente trabalho.

A todos os alunos do Laboratório de Genética que sempre ajudaram quando necessário, em especial ao Renato, Hebert, Samuel, Min, Nicole, Lislei, Rodrigo, mas principalmente à Milena Leinmüller pelas trocas de informações, protocolos e discussões em biologia molecular.

Aos diversos colegas que fiz dentro do Programa de Pós-Graduação em diversas disciplinas e fora delas. Em especial ao Matheus Dalcin Luchese, Keyde Cristina de Martins Melo, Luís Guilherme Virgílio Fernandes, Aline Teixeira e Cristiane Castilho pela ajuda e incentivo.

Aos membros da banca do exame de qualificação Profa. Dra. Soraia Attie Calil Jorge, Prof. Dr. Geraldo Santana Magalhães e a Profa. Dra. Maria Elisabete Sbrogio Almeida pelas fundamentais sugestões para o melhor desenvolvimento desse trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação e à Comissão de Pós-Graduação, pelo apoio na obtenção de alguns reagentes e materiais.

Aos membros da Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Fábria, Eliane e Vânia pelo auxílio em todos os momentos necessários ao longo de toda minha vida acadêmica.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização do presente estudo e o para meu desenvolvimento profissional, minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTO

O presente trabalho recebeu auxílio financeiro do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) para sua realização que permitiram seu desenvolvimento assim como possibilitaram minha participação em diversos eventos e congressos nacionais e internacionais.

Projeto número: 870051/2002-4; processo número: 140211/2013-6, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

RESUMO

KAVATI, E. A. **Desenvolvimento de vacina profilática e terapêutica contra o HPV e cânceres associados ao vírus.** 2017. 101 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

O câncer de colo do útero ou câncer cervical é o terceiro tipo de câncer mais comum em mulheres de todo o mundo, sendo a segunda principal causa de morte em mulheres por câncer. É causado principalmente pela infecção persistente por HPV (Papilomavírus humano). Estima-se que atualmente o câncer cervical atinja mais de 1,4 milhões de mulheres em todo o mundo, levando a morte mais de 300 mil mulheres por ano. Hoje, a principal forma de prevenção do câncer cervical é a realização de exames citológicos periódicos, Papanicolau, e a vacinação profilática de meninas e meninos disponibilizada recentemente pelo Ministério da Saúde. Entretanto, tais ações visam à prevenção da infecção por HPV ou a detecção de lesões causadas pelo vírus, pois não há um tratamento específico contra as infecções e lesões já estabelecidas. Dentre as proteínas expressas por HPV, destacamos aqui a L2 e E6 que serão os alvos desse trabalho. A proteína L2 está presente no capsídeo viral e é bem conservada entre diversos tipos de HPV, enquanto E6 é uma proteína oncogênica capaz de induzir a transformação maligna das células infectadas. O objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de uma vacina profilática e terapêutica capaz de proteger contra a infecção viral, assim como combater as células já modificadas pelo mesmo. Para isso, foi construído um vetor vacinal contendo peptídeos selecionados das proteínas L2 e E6 de HPV16 em que foram expressos em células de mamífero, assim como testadas em modelo murino para avaliar a eficiência da vacina em modelo profilático ou terapêutico, recebendo a vacina pcDNA3.3/L2E6 antes ou após desafio com células TC-1. Os ensaios de expressão da proteína L2E6 em células HEK 293T e 293F demonstraram a eficiência do vetor em produzir a proteína recombinante, demonstrada em ensaios de imunofluorescência indireta e *Western blotting*. Já os ensaios em modelo animal, demonstraram que a vacina foi capaz de induzir a produção de anticorpos específicos anti-L2 e anti-E6 testados em ELISA, assim como induzir a produção de citocinas TNF demonstrados por ensaios em citômetro de fluxo. Os animais que receberam a vacina 1 dia após serem inoculados com células tumorais, modelo terapêutico, demonstraram a capacidade de inibir o desenvolvimento tumoral, onde 6/10 (3 doses em intervalos de 15 dias) e 8/10 (2 doses em intervalos de 10 dias) animais não desenvolveram tumores durante todo o período analisado. Os 2 animais do grupo que receberam apenas 2 doses, desenvolveram tumores de volumes bem menores quando comparados àqueles do grupo controle, além da detecção de uma menor resposta imune na produção de anticorpos e citocinas quando comparados aos demais animais do mesmo grupo. Assim, foi possível concluir que o vetor pcDNA3.3/L2E6 foi capaz de induzir a expressão da proteína L2E6 em células de mamíferos, assim como possui a capacidade de induzir resposta imune humoral e celular em camundongos, quando utilizado como uma vacina de DNA, demonstrando alta capacidade de gerar anticorpos específicos anti-HPV, induzir a produção de citocinas antitumorais e inibir o desenvolvimento tumoral de células HPV-positivas.

Palavras-chave: HPV. Papilomavírus humano. Câncer cervical. Cânceres associados ao HPV. Vacinas. Vacinas profilática e terapêutica.

ABSTRACT

KAVATI, E. A. **Development of prophylactic and therapeutic vaccine against HPV and cancers associated with the virus.** 2017. 101 f. Thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

As far as women around the world are concerned, cervical cancer is the third most common cancer and the second deadliest one. It is estimated that cervical cancer currently affects more than 1.4 million women worldwide, being the cause of death for more than 300,000 women every year. It is mainly caused by persistent HPV (Human papillomavirus) infection. Today, the primary cervical cancer prevention method is through periodic Pap smears and the prophylactic vaccination of girls and boys, which has been recently provided free of charge by the Brazilian Ministry of Health. However, these actions are aimed towards the detection of lesions caused by the virus or preventing HPV infection, as there is no specific treatment against pre-existing infections and lesions. Among the proteins expressed by HPV, we highlight L2 and E6 herein, which will be the main focus of this work. L2 protein is present in the viral capsid and is well conserved among several types of HPV whereas E6 is an oncogenic protein, capable of inducing malignant transformations in infected cells. The goal of this work is the development of a prophylactic and therapeutic vaccine able to protect against infection by HPV as well as to combat cells already modified by HPV. A vaccine vector was constructed containing peptides selected from the HPV16 L2 and E6 proteins; which were expressed in mammalian cells and tested in a murine model in order to evaluate the vaccine's efficiency in either a prophylactic or a therapeutic model through interaction with the pcDNA3.3/L2E6 vaccine either before or after TC-1 cells challenge. L2E6 protein expression assays within HEK 293T and 293F cells demonstrated the vector's efficiency in producing the recombinant protein, which was confirmed by indirect immunofluorescence and Western blotting assays. Animal model assays, in their turn, have demonstrated that the vaccine was able to induce the production of specific anti-L2 and anti-E6 antibodies as well as TNF cytokines, which were verified through ELISA and flow cytometric assays, respectively. Animals that have been vaccinated one day after being inoculated with TC-1 tumour cells - therapeutic model - demonstrated the ability to inhibit tumour development, in which six out of ten (three doses at every fifteen days) and eight out of ten (two doses at every ten days) animals did not develop any tumours throughout the analysed period. In two animals of the two-doses-only group, the tumours developed were of a much smaller volume when compared to those in animals of the control group. Furthermore, when compared to the other animals of the same group, suggest that these animals present an immune susceptibility. Thus, it was possible to conclude that the pcDNA3.3/L2E6 vector was able to induce the expression of L2E6 protein in mammalian cells. In addition, when used as a DNA vaccine, it was also able to induce humoral and cellular immune responses in mice, therefore demonstrating an acute ability to generate specific anti-HPV antibodies, to induce anti-tumour cytokines production and to inhibit tumour development from HPV-positive cells.

Keywords: HPV. Human papillomavirus. Cervical cancer. HPV associated cancer. Vaccine. Prophylactic and therapeutic vaccine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação esquemática do genoma de HPV e do capsídeo viral.....	21
Figura 2 – E6 age sobre vários alvos celulares em diversas vias de sinalização.....	23
Figura 3 - Alvos e processos celulares alterados pela oncoproteína E7 de HPV.....	23
Figura 4 - Representação esquemática do ciclo de vida do HPV.....	24
Figura 5 – Modelo de infecção do HPV in vivo.....	25
Figura 6 – Representação esquemática da proteína L2 e seus domínios de interação.....	26
Figura 7 – Sequência de aminoácidos conservada entre diferentes tipos de papilomavírus.....	27
Figura 8 – Representação esquemática do vetor pMA-T/L2E6.....	42
Figura 9 - Mapa do vetor pcDNA3.3/L2E6.....	43
Figura 10 - Fotodocumentação do gel de agarose submetido a eletroforese para seleção das colônias contendo o vetor pcDNA3.3/L2E6.....	58
Figura 11 - Eletroferograma do fragmento recuperado da reação de PCR da colônia bacteriana transformada por pcDNA3.3/L2E6.....	59
Figura 12 - Células HEK293T expressando a proteína L2.....	60
Figura 13 - Expressão de L2E6 em células 293F.....	60
Figura 14 – Detecção de L2E6 através de ensaio de Western blotting.....	61
Figura 15 - Gráfico de pesagem dos animais no ensaio de avaliação profilática da vacina de DNA.....	62
Figura 16 - Volume dos tumores de células TC-1 nos animais imunizados previamente com a vacina de DNA.....	63
Figura 17 – Gráfico do peso dos animais do estudo terapêutico da vacina de DNA.....	64
Figura 18 – Volumes tumorais mediante o tratamento com a vacina de DNA.....	66
Figura 19 – Ensaio de detecção de anticorpos anti-L2 por ELISA.....	69
Figura 20 – Ensaio de detecção de anticorpos anti-E6 por ELISA.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência dos iniciadores utilizados para amplificação do fragmento L2E6 para seleção de colônias bacterianas transformadas pelo vetor pcDNA3.3/L2E6.	44
Tabela 2 – Propriedades físico-químicas da proteína L2E6 desenhada no presente estudo, segundo site Protein Calculator.	57
Tabela 3 – Média final dos volumes tumorais.	65
Tabela 4 – Níveis de citocinas detectadas em amostras de soro.	67
Tabela 5 - Níveis de TNF detectados no soro dos animais estudados.	67
Tabela 6 – Níveis de TNF detectados no sobrenadante da cultura de esplenócitos. ...	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Ampere
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APC	Célula apresentadora de antígeno
ATP	Adenosina trifosfato
BPV	Papilomavirus bovino
BSA	Albumina de soro bovino
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
CMV	Citomegalovírus
CTL	Linfócito T citotóxico
DAB	Diaminobenzidina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucléico
DO	Densidade óptica
DST	Doença sexualmente transmissível
E	Precoce
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FDA	"Food and Drug Administration"
HLA	Antígenos Leucocitários Humanos
HNSCC	Carcinoma de célula escamosa em cabeça e pescoço
HPV	Papilomavírus humano
Hsp	"Heat shock protein"
HSPG	Proteoglicanas de heparan sulfato
HSV-1	Vírus da Herpes simples tipo 1
IFN	Interferon
IFN-3	Fator regulador de interferon - 3
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
Kb	Kilobase
KDa	KiloDáltons
L	Tardio
LB	Luria-Bertani

LCR	“Locus control region”
M	Molaridade
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
mRNA	RNA mensageiro
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
NK	Células natural killer
NKT	Células natural killer T
OPD	o-phenylenediamine dihydrochloride
ORF	Quadro Aberto de Leitura
Ori	Origem de replicação
pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato salina
PBST	Tampão fosfato salina com Tween 20
PCR	Reação da polimerase em cadeia
PE	Ficoeritrina
PI	Iodeto de propídio
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
SBF	Soro bovino fetal
SDS	Dodecil sulfato de sódio
S.O.C.	Caldo Super Ótimo com repressão catabólita
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
TC-1	Linhagem de células tumorais - 1
TE	Tampão Tris-EDTA
TERT	“Telomerase reverse transcriptase“
TGF	Fator crescimento tumoral
TLR	“Toll-like receptor”
TNF	Fator de necrose tumoral
USA	Estados Unidos da América
V	Unidade de voltagem
VLP	Partículas semelhante ao vírus
WHO	Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	HPV e Câncer	18
2.2	HPV	20
2.3	Ciclo do HPV	24
2.4	Alvos vacinais	26
2.4.1	<i>Proteína L2</i>	26
2.4.2	<i>Proteína E6</i>	29
2.5	Resposta Imune contra o HPV	31
2.6	Combate ao HPV	33
2.6.1	<i>Vacinas Profiláticas</i>	34
2.6.2	<i>Vacinas terapêuticas</i>	36
2.6.3	<i>Vacina profilática e terapêutica</i>	39
3	OBJETIVOS	40
3.1	Objetivos gerais	40
3.2	Objetivos específicos	40
4	MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1	Seleção dos epítomos e construção dos vetores	41
4.2	Construção dos vetores	41
4.3	Quimiocompetência das bactérias	43
4.4	Transformação bacteriana	44
4.5	Seleção das colônias bacterianas	44
4.6	Extração de DNA plasmideal	45
4.7	Sequenciamento de DNA	45
4.8	Linhagens celulares e condições de cultivo	46
4.9	Transfecção celular	46
4.10	Expressão e caracterização das proteínas recombinantes	47
4.10.1	<i>Expressão intracelular das proteínas</i>	47

4.10.2	<i>Análise da expressão das proteínas recombinantes</i>	48
4.11	Análises proteicas.....	50
4.12	Síntese de peptídeos	50
4.13	Cultivo de células tumorais TC-1.....	51
4.14	Experimentos <i>in vivo</i>	51
4.14.1	<i>Avaliação profilática</i>	52
4.14.2	<i>Avaliação terapêutica</i>	53
4.15	Cultura de esplenócitos	54
4.16	Ensaio de detecção de citocinas	54
4.17	ELISA indireto	55
4.18	Análises estatísticas.....	56
5	RESULTADOS	57
5.1	Análises de bioinformática da sequência L2E6.....	57
5.2	Seleção das colônias bacterianas	58
5.3	Sequenciamento de DNA.....	58
5.4	Expressão das proteínas recombinantes.....	59
5.5	Análise da expressão da proteína recombinante	60
5.6	Ensaio <i>in vivo</i>	61
5.6.1	<i>Avaliação profilática</i>	61
5.6.2	<i>Avaliação terapêutica</i>	63
5.7	Análise da produção de citocinas.....	66
5.8	Análise da produção de anticorpos específicos	68
6	DISCUSSÃO	70
7	CONCLUSÃO	73
	REFERÊNCIAS*	74

1 INTRODUÇÃO

A infecção por HPV (Papilomavírus humano) é a doença sexualmente transmissível mais comum em todo o mundo. Atualmente, estima-se que há cerca de 290 milhões de pessoas infectadas pelo vírus em todo o mundo (HPV Information Center, 2017).

Nos Estados Unidos, a estimativa é que haja 79 milhões de pessoas infectadas por HPV, sendo 14 milhões o número de novos casos por ano. A infecção por HPV é tão comum que estudos sugerem que toda pessoa sexualmente ativa terá contato com algum tipo de HPV durante a vida (CDC, 2017).

Entretanto, a principal importância do estudo do HPV reside no potencial oncogênico de alguns tipos virais, sendo capaz de induzir alterações no ciclo de células infectadas, levando-as ao desenvolvimento descontrolado, à imortalidade e malignidade (ZUR HAUSEN, 2000; ZUR HAUSEN et al., 1974). Tal descoberta levou seu autor, Harald zur Hausen, a receber o prêmio Nobel de medicina em 2008.

Em 2006, a primeira vacina profilática contra o HPV foi aprovada e liberada para comercialização nos Estados Unidos pelo FDA (Food and Drug Administration). Assim, em 2016 comemorou-se os 10 anos da vacina do HPV, sendo destaque em diversos veículos de comunicação especializados em saúde, com divulgação de discussões e publicações de trabalhos.

As vacinas disponíveis atualmente apresentam alta eficiência na indução da produção de anticorpos específicos, ou seja, tem caráter apenas profilático, e somente contra os tipos virais contidos nas formulações vacinais. Alguns estudos demonstraram que tais anticorpos são capazes de induzir uma pequena proteção cruzada contra infecções por outros tipos de HPV (BROWN et al., 2009; PAAVONEN et al., 2007), porém ainda incapaz de combater a ampla gama de diferentes tipos de HPV causadores de verrugas e neoplasias.

Até o momento, não há nenhuma vacina terapêutica contra o HPV e cânceres associados ao vírus aprovada para uso humano, no mundo. Os tratamentos utilizados contra as lesões e os cânceres HPV-positivos não são específicos e dependem do grau da lesão. Normalmente envolvem tratamentos com substâncias químicas de ação citotóxica, cauterizações químicas / físicas / elétricas, cirurgias, radioterapias, quimioterapias ou a combinação de tratamentos, sendo altamente invasivos, agressivos e muitas vezes mutilantes (CARVALHO, 2005).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HPV e Câncer

A infecção persistente por HPV de alto risco é a principal causa no desenvolvimento de diversos tipos de cânceres. Estima-se que em todo o mundo 13% dos casos de cânceres em mulheres sejam causados por HPV, sendo o câncer cervical o mais significativo, atingindo cerca de 1,4 milhões de mulheres, com mais de 530.000 novos casos diagnosticados por ano, levando a mais de 300.000 mortes anuais segundo World Health Organization (WHO, 2017; DE SANJOSE et al., 2007).

Estudos demonstraram que 99,7% das amostras obtidas de biópsias de pacientes com câncer cervical apresentam DNA de HPV (UNGER; DUARTE-FRANCO, 2001). No Brasil, é o terceiro câncer mais comum e a quarta maior causa de mortes em mulheres, sendo estimados cerca de 17.000 novos casos só em 2016, dados do Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saúde (INCA, 2017).

Os cânceres de cabeça e pescoço historicamente são associados ao uso de tabaco e álcool, porém, desde 2007 o HPV tem sido identificado como maior agente etiológico no desenvolvimento de carcinoma de células escamosas de orofaringe, tonsilas e na base da língua (ADELSTEIN; RODRIGUEZ, 2010; HASHIBE et al., 2007) acometendo principalmente homens. Estima-se que cerca de 80% desses sejam positivos para o HPV, sendo relacionado a um pior prognóstico (ANG et al., 2010; MEHANNA et al., 2013).

Estudos recentes têm demonstrado um aumento de aproximadamente 50% na incidência de HPV nos casos de HNSCC (carcinoma de células escamosas em cabeça e pescoço), sendo o HPV16 o tipo mais prevalente em até 90% dos casos (CHATURVEDI et al., 2008; KREIMER et al., 2005).

Estima-se que a prevalência de qualquer tipo de HPV na cavidade oral em pacientes saudáveis seja de 2 a 8%, sendo o HPV16 o tipo mais encontrado (KREIMER et al., 2011; PICKARD et al., 2012).

Cânceres anogenitais associados ao HPV, excluindo o câncer cervical, são considerados raros, porém estima-se que o vírus seja responsável por aproximadamente 95% dos casos de câncer anal, 60% do câncer vaginal, 50% do câncer vulvar e 35% do câncer de pênis (DE VUYST et al., 2009).

A associação entre HPV e cânceres de pele não-melanoma foi sugerida pela detecção do DNA viral em aproximadamente 90% de amostras de carcinoma de células escamosas em pacientes com epidermodisplasia verruciforme, uma doença de pele rara ainda pouco

conhecida (ACCARDI; GHEIT, 2014; JABLONSKA; DABROWSKI; JAKUBOWICZ, 1972; PAOLINI et al., 2015). Estudos sugerem que a infecção por HPV e a incidência de radiação ultravioleta estejam relacionados à etiologia dos casos de câncer de pele não-melanoma HPV-positivos (BRIANTI; DE FLAMMINEIS; MERCURI, 2017; REUSSER et al., 2015), principalmente em pacientes imunosuprimidos. Entretanto, os tipos virais mais encontrados em amostras de pele pertencem ao grupo dos β -papilomavirus, sendo que os tipos mais associados à malignidade dessas células são o HPV5 e 8 (PALEFSKY, 2016). Contudo, a associação entre o HPV e câncer de pele não-melanoma ainda não é conclusiva, necessitando de novos estudos.

Da mesma forma, o envolvimento do HPV no desenvolvimento do câncer de mama ainda é bastante controverso, pois estudos descrevem altas taxas de prevalência do DNA viral em amostras estudadas (AKIL et al., 2008; ANTONSSON et al., 2011; HENG et al., 2009), enquanto outros revelam baixa associação ou inexistência de DNA viral nas amostras obtidas de biópsias (MENDIZABAL-RUIZ et al., 2009; MOU et al., 2011). Essa associação HPV - câncer de mama é dificultada pela baixa carga viral do HPV durante a infecção, pelas infecções por HPV serem comuns, mas a associação ao câncer de mama não é, e ao fato de que a infecção por HPV pode preceder o desenvolvimento do câncer de mama por anos ou décadas (LAWSON; GLENN; WHITAKER, 2016).

Outra associação bastante polêmica relaciona o HPV ao câncer de pulmão, mais especificamente aos carcinomas de células “não-pequenas” (NSCLC), onde estudos revelaram que 24% dessas amostras apresentavam positividade ao HPV16, tipo mais comumente encontrado. Entretanto, esses estudos também encontraram a presença de HPV de baixo risco como HPV6 e 11 nas amostras de pacientes com NSCLC, assim como foi demonstrada a não associação da presença do DNA de HPV nessas amostras com a expressão de proteínas TP53 e TP16, interações bem caracterizadas em outros tipos de cânceres associados ao HPV (KOSHIOL et al., 2011; LI et al., 2016; REZAZADEH et al., 2009).

A hipótese de associação do HPV ao câncer de pulmão surgiu pela proximidade do sistema respiratório à orofaringe, onde o HPV é reconhecidamente causador de uma importante proporção de cânceres. HPV também é responsável pela formação de papilomas no trato respiratório, sendo encontrado também nos brônquios e ocasionalmente progridem para a malignidade, assim como pode ser detectado em tumores respiratórios (GIULIANI et al., 2007; MARUR et al., 2010). Além disso, estudos *in vitro* demonstraram que o HPV é capaz de transformar malignamente células bronquiais (WILLEY et al., 1991).

2.2 HPV

O HPV é um vírus pertencente à família *Papillomaviridae* e ao gênero *Papillomavirus*. Compreende um grupo de pequenos vírus não envelopados, revestidos por um capsídeo icosaédrico com aproximadamente 55 nm de diâmetro e genoma circular de DNA dupla fita.

O isolamento e caracterização do DNA de amostras de verrugas de pele e genitais revelou a existência de diferentes tipos de HPVs (ZUR HAUSEN et al., 1974). Essa classificação baseia-se na diferença da sequência do gene *L1*, a principal proteína estrutural do capsídeo viral, sendo que até a data atual 210 tipos já foram referenciados e cadastrados até o momento no site do International Human Papillomavirus Reference Center, da Karolinska Institutet, na Suécia. Devido a essa grande variedade, os HPVs representam um dos mais complexos grupos de vírus patogênicos (DE VILLIERS et al., 2004).

Os HPVs também são classificados conforme seu potencial para o desenvolvimento de lesões neoplásicas. Os principais representantes do grupo considerado de alto risco são os HPVs 16 e 18, responsáveis por até 70% dos casos de cânceres cervicais e lesões pré-cancerosas ou NIC (neoplasias intraepiteliais cervicais), além de HPVs 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59. Os HPVs de baixo risco oncogênico podem induzir a formação de lesões denominadas condilomas na pele ou em órgãos genitais, onde aproximadamente 90% dos casos estão associados à infecção por HPVs tipos 6 e 11, além de 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 e 81 (MUNOZ et al., 2006; STEBEN; DUARTE-FRANCO, 2007).

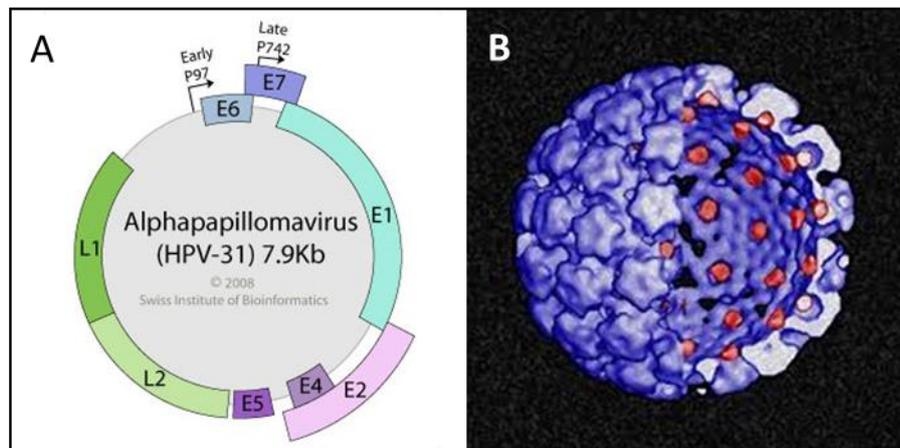
O genoma do HPV é formado por uma dupla-fita de DNA circular com aproximadamente 8.000 pb (pares de bases), podendo ser encontrado na forma episomal como um DNA circular extracromossômico ou integrado ao genoma da célula hospedeira, entretanto ambas as formas podem coexistir em uma mesma célula. O material genético é dividido em região reguladora (LCR - *Long control region*), não codificante, contendo a região de origem de replicação (*Ori*) e a maioria das sequências responsivas aos fatores de transcrição; e a região codificante que contém as regiões conhecidas como ORFs (*Open reading frames*) divididas em regiões precoces ou *early* (E) e região tardia ou *late* (L), conforme a fase do ciclo de vida viral em que esses genes são expressos (Figura 1A) (HEBNER; LAIMINS, 2006).

Os genes da região tardia são responsáveis pela expressão de proteínas estruturais, L1 e L2, que compõem o capsídeo viral. L1 é a proteína principal que tem capacidade de autoestruturar e formar capsômeros, que por sua vez se arranjam em pentâmeros internamente estabilizados por proteínas L2, como observado na figura abaixo (Figura 1B). O ajuste de 72

capsômeros formados por L1 e L2 compõe o capsídeo viral (BURD, 2003; GNANAMONY; PEEDICAYIL; ABRAHAM, 2007).

Os genes *early* são conhecidos como *E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6* e *E7* que codificam proteínas não estruturais. São expressos na fase inicial do ciclo viral, após a infecção, altamente regulados e transcritos em mensagens policistrônicas processadas através de *splicing* alternativo, permitindo a expressão de muitos genes a partir de um genoma compacto, com regulação de expressão individual, sendo portanto consensual que apesar de certos HPVs apresentarem cerca de 8 a 9 genes, codificam pelo menos 10 proteínas virais (SCHWARTZ, 2013).

Figura 1 - Representação esquemática do genoma de HPV e do capsídeo viral.



(A) Mapa genético de HPV com aproximadamente 8 Kb (Quilobases) constituído por genes *E* e *L*; (B) capsídeo viral em modelo atômico formado por 72 capsômeros de proteína L1 (azul) ligados internamente por proteínas L2 (vermelho).

Fonte: Adaptado de ViralZone (Buck, 2012).

As proteínas E1 e E2 são reguladoras da replicação e transcrição do DNA viral. E1 atua no reconhecimento e interação à origem de replicação, recruta proteínas e age como helicase-ATPase, auxiliando na abertura das fitas do DNA. E2 auxilia o recrutamento específico de E1 para o DNA viral (TYRING, 2000), atua como fator de transcrição, medeia à segregação do genoma ao DNA hospedeiro, tornando-se essencial para a persistência viral (MCBRIDE; MCPHILLIPS; OLIVEIRA, 2004). É capaz de inibir a expressão dos genes da região “Late” do genoma viral através da interação com CPFS30, fator celular de poliadenilação, impedindo a formação dos sinais poli-A (JOHANSSON et al., 2012).

E4 é a proteína mais abundantemente expressa por todo epitélio estratificado infectado, porém ainda é uma proteína pouco conhecida, sendo até o momento identificados

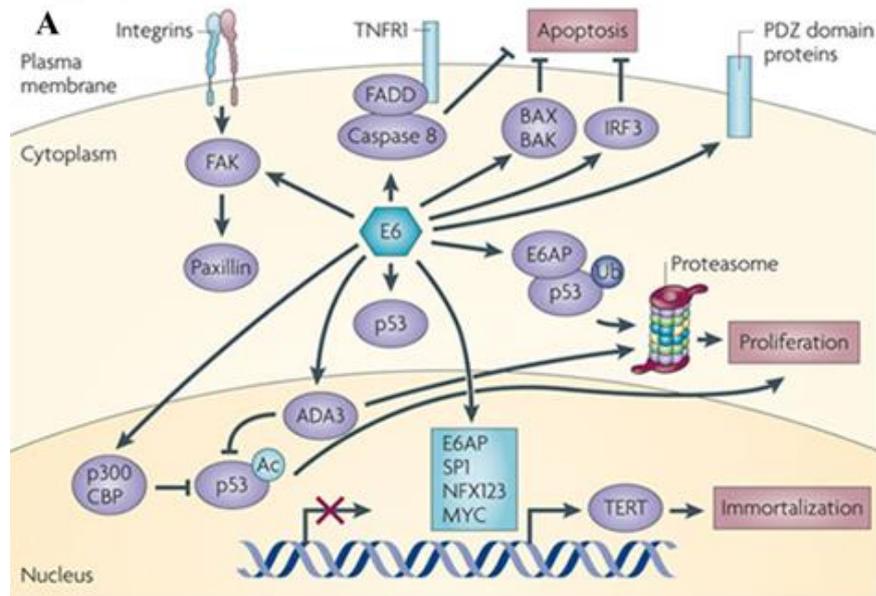
um número bem escasso de alvos de interação. Admite-se que o mRNA de E4 sofre “splicing” com cinco aminoácidos de *E1*, gerando uma proteína conhecida como E1^{E4}. A primeira atividade descrita de E1^{E4} de HPV16 foi a habilidade de interagir e desmanchar a rede de citoqueratina das células, facilitando a saída de partículas virais maduras da célula hospedeira, o que permite ao vírus infectar novas células (DOORBAR et al., 1991; RAJ et al., 2004). A expressão de E1^{E4} é perdida durante a progressão maligna (DAVY et al., 2005; PRESCOTT et al., 2014). A perda do gene *E4* atrasa a amplificação do DNA viral e a expressão de *L1*, mas não abole esses eventos do ciclo do HPV (EGAWA et al., 2017; YAJID et al., 2017).

O gene *E5* apresenta potencial em transformar células de mamíferos, porém é frequentemente deletado em células tumorais, sugerindo que tal proteína não é essencial para a manutenção da transformação maligna de células, mas contribui para o processo aumentando a frequência de mitoses através da interação com receptores de fatores de crescimento (BURKHARDT et al., 1989; KIM; YANG, 2006).

E6 e E7 são as principais oncoproteínas, pois em HPVs de alto risco são responsáveis pela transformação maligna das células. Diversos alvos celulares já foram descritos tanto para E6 quanto para E7 e a maioria dessas proteínas celulares estão envolvidas no controle da proliferação celular, senescência, apoptose, diferenciação e resposta imune (Figuras 2 e 3). A ação mais caracterizada de E6 é sua capacidade de interagir e degradar a proteína supressora tumoral p53 via ubiquitina-proteassomo, assim como E7 é capaz de induzir a degradação de pRb, gerando instabilidade cromossômica e a inibição de apoptose, ocasionando a transformação maligna da célula.

Mais recentemente foi caracterizado o gene *E8* e seu promotor, embora ainda bastante discutido, sugerindo que sua proteína interaja com E2, formando o complexo E8^{E2C} que regula negativamente a replicação do DNA viral, controlando o número de cópias assim como estabilizando a manutenção de seu genoma em epissomos (STRAUB et al., 2014); 2015).

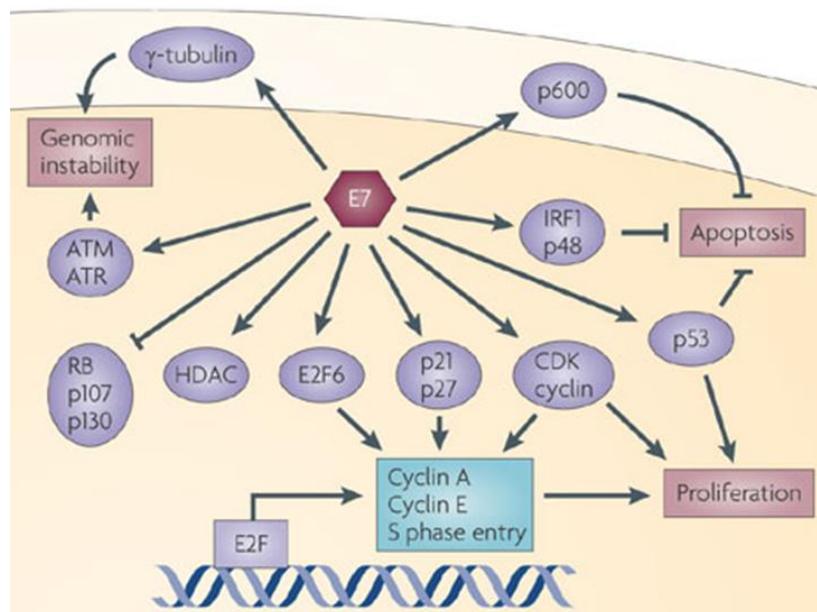
Figura 2 – E6 age sobre vários alvos celulares em diversas vias de sinalização.



A proteína E6 de HPV de alto risco pode inibir a apoptose, induzir a proliferação celular e a imortalização através de interação com histona acetiltransferase p300, CBP (CREB proteína ligante) ou ADA3, resultando na instabilidade genômica e consequentemente no acúmulo de mutações celulares. Induz degradação de BAX e BAK pela interação com TNFR1, FAS, FADD e Caspase 8. Previne o encurtamento de telômeros interagindo com SP1, MYC, fator de transcrição nuclear, FX123 e TERT promovendo a imortalização. Leva à perda de polaridade das células, induzindo a hiperplasia pela mediação da degradação de proteínas do complexo PDZ, além de interagir com paxilina e fibulina prevenindo *anoikis*, permitindo o crescimento celular independente de ancoramento.

Fonte: Moody; Laimins, 2010.

Figura 3- Alvos e processos celulares alterados pela oncoproteína E7 de HPV.



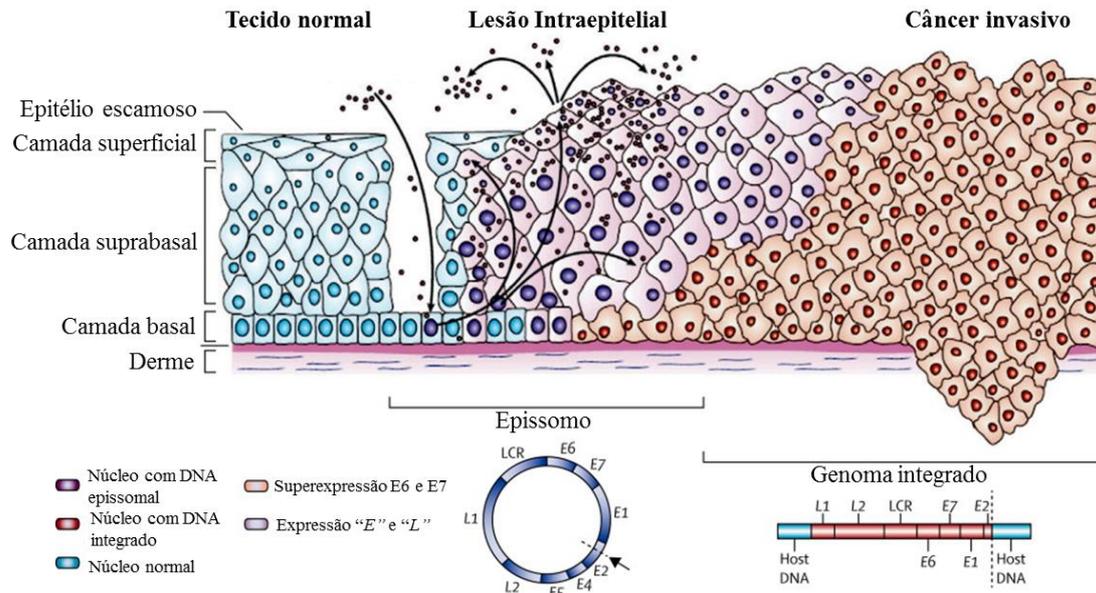
E7 de HPV de alto risco induz hiperproliferação celular através da inibição de proteínas da família RB (retinoblastoma), afeta a expressão de genes celulares pela interação com HDACs (Histonas deacetilases), induz dano ao DNA contribuindo ao acúmulo de alterações cromossômicas e inibe apoptose pela interação com p53, IRF1 e p600.

Fonte: Moody; Laimins, 2010.

2.3 Ciclo do HPV

O ciclo de vida do HPV é altamente relacionado à diferenciação celular do epitélio cervical (DOORBAR, 2005), como esquematizado na Figura 4.

Figura 4 - Representação esquemática do ciclo de vida do HPV.



O HPV infecta queratinócitos da camada basal do epitélio e através da diferenciação das células HPV positivas induz a fase produtiva do ciclo viral com integração do DNA viral ao genoma da célula hospedeira, levando à superexpressão de *E6* e *E7*, desregulando o ciclo celular, inibindo a apoptose e induzindo a transformação maligna das células.

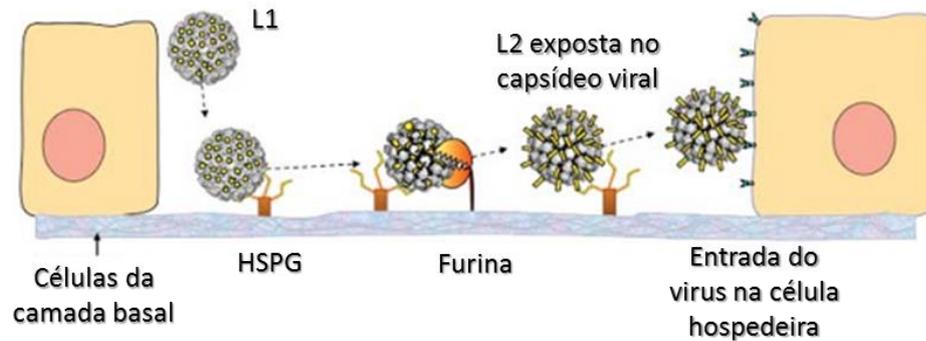
Fonte: Woodman; Collins; Young, 2007.

Através de microlesões no epitélio, o HPV infecta as células da camada basal que apresentam baixa atividade mitótica e menor grau de diferenciação. Através de interação com receptores da membrana celular, utilizando importantes vias de entrada como a via do heparan sulfato (HSPG), clatrina ou caveolina (DAY; LOWY; SCHILLER, 2003,2008; HANSEN; NICHOLS, 2009; KAVATI et al., 2012; SCHELHAAS et al., 2012; SMITH et al., 2008) o HPV consegue acessar o interior da célula hospedeira. Dentre as vias de entrada, a mais estudada é a via do HSPG, onde artigos científicos sugerem que a proteína L1 se liga ao receptor de membrana induzindo modificações na conformação do capsídeo viral, expondo as proteínas L2 do capsídeo.

A exposição das proteínas L2 permite a clivagem por uma pró-proteína convertase, furina, de sua porção N-terminal permitindo a entrada do vírus na célula, como observado na figura abaixo (Figura 5), assim como o escape dos endossomos (KINES et al., 2009; RICHARDS et al., 2006). As proteínas L1 ficam retidas nos endossomos, enquanto as

proteínas L2 associadas ao genoma do HPV são transportadas para a rede trans-Golgi e assim ao núcleo (DAY et al., 2013).

Figura 5 – Modelo de infecção do HPV *in vivo*.



Através de microlesões os vírus atingem as células da camada basal, onde a proteína L1 é reconhecida e liga aos receptores de HSPG induzindo modificações conformacionais que expõem a proteína L2 susceptível a clivagem pela furina. Após clivagem de L2, epítopos capazes de desenvolver anticorpos neutralizantes são expostos, assim como regiões de L1 que irão reconhecer receptores secundários que permitem a entrada do vírus na célula hospedeira.

Fonte: Howley; Schiller; Lowy, 2017.

O genoma viral permanece na forma episomal e em baixo número de cópias onde apenas os genes *E*, principalmente *E6* e *E7*, são expressos e em baixas concentrações, regulados por *E1* e *E2*, permitindo a replicação do DNA viral e inibindo a apoptose (STANLEY, 2008).

À medida que as células da camada basal se dividem, elas migram em direção ao epitélio, iniciando a diferenciação na camada suprabasal, onde o genoma viral é amplificado e há início da expressão dos genes *L* (MOODY; LAIMINS, 2010).

Na camada superficial, o genoma viral é altamente amplificado e há predominância na expressão de proteínas *E4*, *L1* e *L2*, responsáveis pela montagem de novas partículas virais e liberação para que as mesmas possam infectar outras células (DOORBAR et al., 1991; RAJ et al., 2004).

O evento chave na progressão das neoplasias cervicais se deve à integração do genoma viral ao DNA da célula hospedeira, resultando na perda do gene regulador *E2* e consequentemente na superexpressão de *E6* e *E7*, promovendo a transformação maligna das células (DOORBAR, 2005; TINDLE, 2002).

2.4 Alvos vacinais

Como serão o alvo principal desse trabalho, as proteínas L2 e E6 serão melhor discutidas nesse tópico.

2.4.1 Proteína L2

A proteína L2 é composta por aproximadamente 500 aminoácidos e tem massa molecular de aproximadamente 55 KDa. Apesar de não serem conhecidas modificações pós-traducionais representativas, a proteína possui perfil eletroforético entre 64 a 78 KDa. E pode ser encontrado em amostras nativas, como encontradas na natureza, em dímeros (ROSE et al., 1990).

L2 atua em diversas vias importantes e interage com diversos parceiros, como pode ser observado na figura abaixo (Figura 6).

Figura 6 – Representação esquemática da proteína L2 e seus domínios de interação.

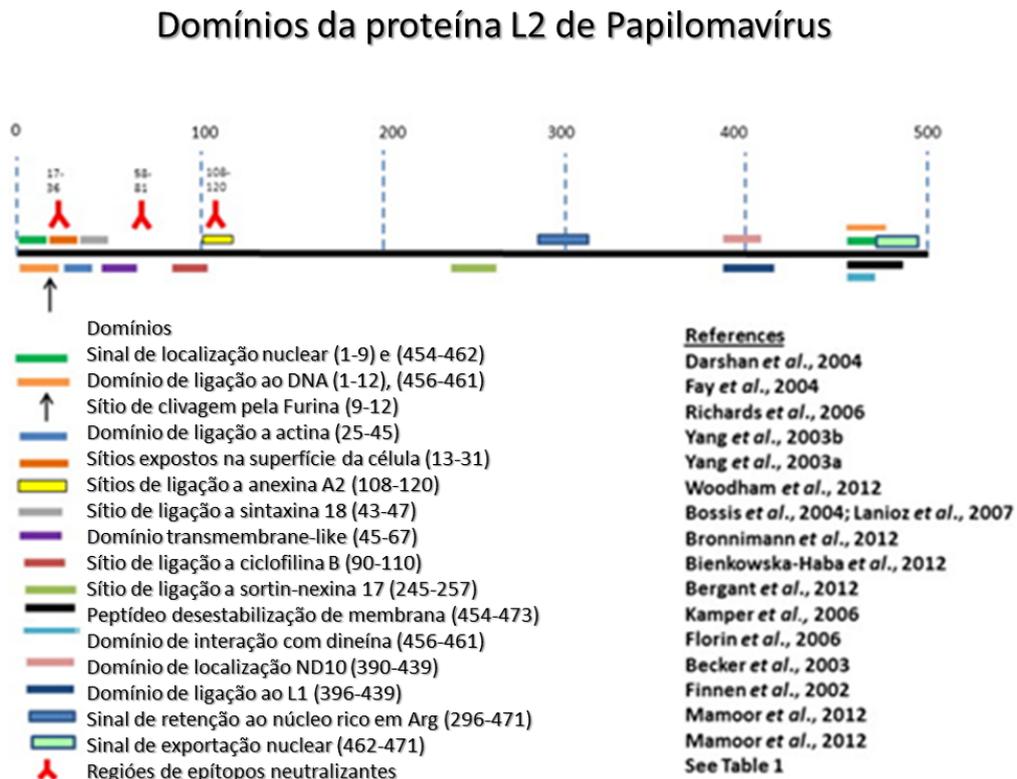


Diagrama dos epítomos capazes de gerar anticorpos neutralizantes e sítios de interação da proteína L2 com outras proteínas de diferentes vias celulares.

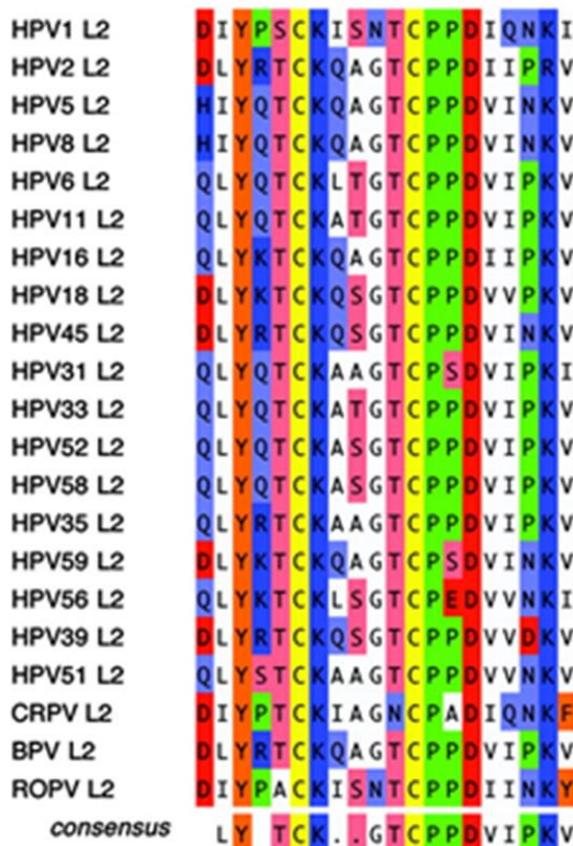
Fonte: Wang; Roden, 2013.

A região amino-terminal de L2 contém dois resíduos de cisteína altamente conservados entre diferentes tipos de papilomavírus, C22 e C28, que formam um “hairpin loop” por pontes dissulfeto resultando em um emparelhamento intramolecular. Estudos

usando pseudovírus de HPV16 mostraram que mutação em uma ou em ambas cisteínas dessa região resultam em vírions não infectantes, mas não afetam a conformação do capsídeo viral.

Essa região altamente conservada é representada pelo fragmento dos resíduos entre o aminoácido 17 ao 36, como pode ser observado na figura abaixo (Figura 7). Apresentando 78% de identidade mesmo em tipos virais bem distantes como as sequências de L2 de HPV2 (associados a verrugas de pele), HPV5 (associados a casos de epidermodisplasia verruciforme) e HPV45 (associados a casos de câncer cervical). Já em tipos virais mais próximos, como os HPV6 e HPV11, a identidade encontrada foi de 80%. E entre os HPV18 e HPV16 de alto risco, 84% de identidade. Essa região é conservada desde BPV1 (Papilomavírus bovino tipo 1), que é evolucionariamente mais distante dos HPVs de alto-risco (GAMBHIRA et al., 2007).

Figura 7 – Sequência de aminoácidos conservada entre diferentes tipos de papilomavírus.



Alinhamento da sequência de aminoácidos entre os resíduos 17 ao 36 de diferentes tipos de papilomavírus demonstrando sua alta taxa de conservação. Alinhamento realizado pelo software CLUSTAL W.

Fonte: Gambhira et al., 2007; Thompson; Higgins; Gibson, 1994.

As razões para a manutenção dessa sequência do epítopo de L2 ao longo da cadeia evolutiva do HPV são bastante discutidas, visto que não há regiões tão conservadas em L1, o antígeno imunodominante do capsídeo de HPV. Acredita-se que por L1 estar fisicamente mais exposta que L2, sofra mais pressão evolucionária para alterar sua sequência e assim conseguir ludibriar o sistema imune do hospedeiro, visto que em 50% dos casos de pacientes com infecções naturais por HPV é possível encontrar anticorpos anti-L1, enquanto que a pesquisa por anticorpos anti-L2 demonstraram ser raros (CARTER et al., 2000; WANG et al., 2015b).

Além disso, o fato do epítopo de L2 ser bastante conservado evolutivamente sugere sua importância nos mecanismos de entrada do vírus nas células hospedeiras ou sua atuação em vias importantes durante a infecção (KAWANA et al., 2001; RODEN et al., 2001; YANG et al., 2003a; YANG et al., 2003b).

Por ser altamente conservada, a proteína L2 é considerada um ótimo alvo para uma vacina de amplo espectro, ou vacina Pan-HPV. A região conservada pode ser expressa como antígeno em sistemas de expressão heteróloga de proteínas bem simples, como em bactérias, o que poderia reduzir muito os custos da vacina. Mas o motivo mais significativo do uso da região conservada de L2 se tornar alvo de vacinas é que modelos animais já demonstraram sua capacidade de induzir a produção de anticorpos neutralizantes contra um amplo espectro de tipos diferentes de HPV, assim como gerar proteção contra desafios virais (JAGU et al., 2009; JAGU et al., 2013a; KARANAM et al., 2009b; WANG et al., 2015a).

A transferência passiva desses anticorpos neutralizantes anti-L2 também se mostraram eficientes em mediar a proteção de camundongos em desafios cutâneos ou vaginal contra pseudovírus de HPV (GAMBHIRA et al., 2007; JAGU et al., 2013b).

Diversas estratégias estão sendo utilizadas na pesquisa por uma vacina de amplo espectro baseada nos peptídeos conservados de L2 (SCHELLENBACHER; RODEN; KIRNBAUER, 2017). O desenvolvimento de uma vacina de amplo espectro é considerado como a próxima geração de vacinas contra o HPV, por demonstrarem relevante proteção contra infecções de mucosas, induzir produção de anticorpos neutralizantes contra diversos tipos de HPV, estimular a proteção cruzada contra infecções por tipos diferentes de HPV e ainda favoreceria uma maior distribuição da vacina em países em desenvolvimento, visto que os custos para a produção, transporte e armazenamento dessas vacinas seriam bem menores.

2.4.2 *Proteína E6*

E6 também é considerada uma proteína multifuncional, que tem sido reportada ser capaz de interagir com pelo menos 30 diferentes substratos celulares envolvidos com atividades como nas vias do ciclo de vida viral ao desenvolvimento da malignidade (VANDE POL; KLINGELHUTZ, 2013).

A proteína E6 é composta por uma sequência de 151 aminoácidos, com 2 “zinc fingers” caracterizados por um motivo CXXC, cuja integridade é essencial para sua função. Apesar de ser uma proteína relativamente pequena, de aproximadamente 16,5 KDa, diversos estudos caracterizam a proteína E6 como difícil alvo de estudos pela dificuldade em isolá-la na forma nativa, solúvel, pois E6 possui uma estrutura secundária complexa com α -hélices e folhas β -pregueadas, dando origem a uma proteína instável e insolúvel quando purificada (NOMINE et al., 2001).

A principal característica de E6 está nas inúmeras proteínas celulares diferentes que são capazes de interagir e com isso mediar a apoptose, a regulação da transcrição de vários genes, a estabilidade cromossômica, organização epitelial, diferenciação, adesão célula-célula, polaridade e controle da proliferação das células infectadas. Essas interações contribuem, de modo geral, para a eficácia da promoção da oncogenicidade mediada por HPV (TUNGTEAKKHUN; DUERKSEN-HUGHES, 2008).

Como já descrito anteriormente, a ação mais estudada da proteína E6 é sua capacidade de interação e degradação de p53. A principal razão da degradação de p53 é facilitar a replicação viral e como consequência indireta induzir a formação de erros no DNA que não reparados, acumularão alterações cromossômicas que contribuem para a transformação maligna das células. Em contrapartida, estudos demonstraram que E6 de HPVs de alto e baixo risco cutâneos não interagem com E6AP ou p53, sendo incapazes de alterar a estabilidade de p53, não induzindo a formação de lesões malignas, apenas benignas, indicando que interação com outros alvos celulares atuem devido ao caráter multifuncional da proteína E6 (ELBEL et al., 1997).

Outro importante alvo de E6 p53-independente são as proteínas do domínio PDZ (PSD95/Dlg/Zo-1), que ao interagir com E6 de HPVs de alto risco (THOMAS et al., 2002), promove sua degradação proteossomal (GLAUNSINGER et al., 2000), alterando funções como a definição e manutenção da polaridade celular, alterando a cinética da polarização – despolarização da actina, inibindo a sinalização celular e supressão tumoral (SPANOS et al., 2008).

Um fator importante para a imortalização das células em transformação maligna é a indução da expressão de telomerase. E6 parece aumentar a atividade da telomerase pela indução do promotor do gene *TERT* (“Telomerase reverse transcriptase”), ativando sua transcrição e expressão para manter o comprimento dos telômeros estáveis e inibir a ativação da apoptose (HOWIE; KATZENELLENBOGEN; GALLOWAY, 2009; LIU et al., 2009).

E6 atua em outras vias de inibição de apoptose, como na degradação de Bak mediada por ubiquitina, prevenindo a liberação de fatores pró-apoptóticos mitocondriais e, conseqüentemente, a apoptose. A inibição dessa via foi descrita como crucial para a proteção das células tumorais HPV-positivas contra apoptose, facilitando o desenvolvimento do câncer (SIMMONDS; STOREY, 2008; THOMAS; BANKS, 1998; VOGT et al., 2006).

Por atuarem sobre diversos fatores celulares, sendo responsáveis pela manutenção do fenótipo de malignidade, os genes *E6* e *E7* representam alvos potenciais para o desenvolvimento de vacinas terapêuticas (LI et al., 2010; STANLEY, 2006). Além disso, estudos demonstraram que o bloqueio da expressão de E6 e/ou E7 contribui para a parada do crescimento tumoral, levando à senescência ou a apoptose das células tumorais e células derivadas de linhagens estabelecidas (THOMAS et al., 2008).

Pela dificuldade de se utilizar as proteínas íntegras e pela segurança de que tais proteínas não irão atuar na ativação tumoral das células do hospedeiro, diversos epítomos de E6 e E7 estão sendo estudados e demonstraram ser capazes de induzir uma resposta de linfócitos T citotóxicos (CTL) específica e eficiente (ANG et al., 2010; KHALLOUF; GRABOWSKA; RIEMER, 2014; KIM et al., 2017; KIM et al., 2014).

Pela ausência de uma vacina terapêutica e pela necessidade de tratamentos específicos e menos invasivos contra as lesões ou tumores HPV - positivos, diversos estudos têm se dedicado à caracterização desses potenciais epítomos vacinais e no desenvolvimento de vacinas terapêuticas contra os antígenos específicos E6 e/ou E7, visando estimular uma resposta imune mediada por células contra esses alvos específicos e induzindo a destruição das células infectadas.

2.5 Resposta Imune contra o HPV

Atualmente, a infecção genital por HPV é considerada a doença sexualmente transmissível (DST) viral mais frequente na população sexualmente ativa. Estima-se que cerca de 80% das mulheres sexualmente ativas terão algum contato com o vírus até atingirem 50 anos de idade (BASEMAN; KOUTSKY, 2005; NONNENMACHER et al., 2002). Porém, a maioria das infecções por HPV é transiente e o próprio sistema imune do hospedeiro é capaz de eliminar o vírus, ou reparar as lesões causadas através de resposta imune humoral e celular, contra os antígenos virais (JENSON; KURMAN; LANCASTER, 1991).

Do ponto de vista da biologia evolutiva, os HPVs são eficientes agentes etiológicos, pois o início do ciclo infeccioso ocorre basicamente em células primitivas. Durante a fase de pico da replicação do DNA viral e expressão de proteínas do capsídeo, nas células diferenciadas já estão próximas à senescência, não necessitando induzir lise ou necrose celular e não havendo, portanto, a liberação de estímulos pró-inflamatórios. Não induzem infecções crônicas e raramente provocam lesões graves ao hospedeiro, mas periodicamente liberam novas partículas virais (STANLEY, 2008).

Durante a infecção natural por HPV, a maioria dos pacientes apresentam baixos níveis de anticorpos anti-L1, E2 e E4, no primeiro estágio da infecção. Porém, a presença desses anticorpos não garante a proteção contra infecções subsequentes por HPV do mesmo tipo viral ou tipos filogeneticamente próximos (MEHLHORN et al., 2014; VISCIDI et al., 2004).

Durante os estágios iniciais da infecção por HPV, a imunidade inata é ativada através da ação de macrófagos, células dendríticas, células de Langerhans, células natural killer (NK) e células natural killer T formando a primeira linha de defesa contra a infecção. Esse tipo de resposta atua de forma não específica visando à eliminação do vírus, entretanto em alguns casos não são suficientes para exterminar a infecção (AMADOR-MOLINA et al., 2013).

Com a ativação da imunidade adaptativa o objetivo é eliminar as células infectadas e prevenir a reinfeção mediada por células T citotóxicas dirigidas principalmente contra as proteínas E2 e E6 do HPV. A indução de uma resposta imune mediada por células T antígeno-específica está relacionada à proteção contra infecção e controle do crescimento tumoral. Além disso, células CD8⁺ de memória antígeno-específicas podem proporcionar uma resposta imune efetora, eliminando rapidamente células infectadas que possam aparecer no decorrer da infecção (PULENDRAN; LI; NAKAYA, 2010; PULENDRAN et al., 2013).

Durante a infecção por HPV, a resposta imune mediada por células tem papel fundamental no controle de lesões e neoplasias, pois pacientes cujas células T CD4⁺ e CD8⁺ foram ativadas contra epítomos de E6 e E7 apresentaram proteção contra infecções

persistentes e regressão espontânea das lesões. Enquanto pacientes com carcinoma não apresentam ativação de células T CD8⁺ citotóxicas (BONTKES et al., 2000), além de uma resposta enviesada de células T CD4⁺ com mudança no balanço de resposta de Th1 para Th2, com produção de IL-10 e TGF- β , levando a uma resposta não protetora (ANDERSEN et al., 2014; BAIS et al., 2005).

A imunidade mediada por células B contra as proteínas L1 e L2 do capsídeo do HPV são capazes de induzir uma eficiente proteção profilática contra infecção pelo vírus, além de serem capazes de estimular a produção de células B de memória, garantindo uma proteção por um longo prazo (SCHERER et al., 2014). Entretanto são ineficientes em pacientes com infecções já estabelecidas (ESQUERRE et al., 2017; STANLEY, 2010).

O HPV possui diversos mecanismos para evadir o sistema imune hospedeiro, alterando a expressão dos genes do hospedeiro para manter a infecção persistente através da baixa taxa de replicação de seu DNA, usar sequências e códons substituíveis por aqueles mais comuns em células de mamíferos (KANODIA; FAHEY; KAST, 2007; ZHOU et al., 1999). Seu DNA é frequentemente encontrado na forma metilada, principalmente nas regiões de ilhas CpG, através da interação de E7 com DNA metiltransferase DNMT1 (BURGERS et al., 2007; KALANTARI et al., 2004), assim como E7 também foi descrito sendo capaz de recrutar histona deacetilase HDAC1 e histona demetilase JARID1B para regiões regulatórias do gene *TLR9*, levando a uma baixa expressão de moléculas de receptores Toll-like 9 (HASAN et al., 2007; HASAN et al., 2013). E6 e E7 também têm a capacidade de desregular o fator de transcrição NF- κ B diminuindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (TUMMERS et al., 2015; WESTRICH; WARREN; PYEON, 2017).

E6 e E7 também atuam inibindo a expressão de IFN, IL-1 β (DUTTA et al., 2015; LAU et al., 2015; TINDLE, 2002), além de induzir células T regulatórias CD4⁺CD25^{high} (Treg) nos infiltrados de lesão (MOLLING et al., 2007), induzir a expressão de IL-10, citocina anti-inflamatória, favorecendo a criação de um microambiente cervical imunossupressor (BERTI et al., 2017).

Assim, as razões pela baixa eficiência do sistema imune em combater as infecções por HPV foram bem descritas por Stanley (2010), pois a infecção natural é exclusivamente intraepitelial e o vírus se esconde na superfície mucosa, além da inexistência de viremia. Por conseguinte, o antígeno viral é pobremente exposto ao sistema linfático e drenado aos linfonodos onde a resposta imune seria iniciada. Além disso, as células apresentadoras de antígenos (APCs) mais eficientes como macrófagos e células de Langerhans são ineficazes em ambiente anti-inflamatório criado pelo HPV.

2.6 Combate ao HPV

O HPV pode permanecer no organismo hospedeiro por vários anos sem causar lesões aparentes e, se aparecem, podem estar localizadas em locais de difícil diagnóstico, como no colo do útero ou orofaringe, podendo ser detectado apenas por profissionais em exames de rotina.

O monitoramento de lesões induzidas por HPV é uma importante ferramenta para o controle e prevenção dos cânceres associados ao vírus. Através de exames preventivos, que devem ser realizados periodicamente, é possível detectar lesões pré-cancerosas ou tumores em estágios iniciais, o que contribui para um melhor prognóstico. O aumento da prática do exame Papanicolau, principalmente nos países desenvolvidos, contribui para a redução de 75% no número de casos de câncer cervical só nos últimos 50 anos. No Reino Unido, estima-se que a introdução dos exames preventivos tenha evitado a morte de mais de 100.000 mulheres por câncer cervical em 30 anos (PETO et al., 2004).

O custo do exame não é impeditivo para a maioria da população que mora nos grandes centros urbanos, por exemplo, no Brasil o exame é realizado gratuitamente pelos programas públicos de saúde do governo, entretanto o câncer do colo de útero ainda é o segundo tipo de câncer mais frequente na região Sudeste do país, acometendo cerca de 24,27 mulheres a cada 100.000 (INCA, 2016). Já em regiões mais isoladas ou mesmo países com menos estruturas em saúde pública essas taxas são ainda maiores.

Especialistas em saúde pública defendem que é sempre mais fácil e menos custoso prevenir as doenças com ações simples como a realização de exames preventivos regularmente e uso de preservativos em todas as relações sexuais, entretanto as taxas de incidência do HPV continuam elevadas e o vírus continua circulante na população.

Diante da alta taxa de incidência e por se tratar de um agente infeccioso mundialmente distribuído, diversos grupos trabalham no desenvolvimento de vacinas contra o HPV utilizando diferentes estratégias. As vacinas profiláticas têm como alvo a indução da resposta imune humoral com a produção de anticorpos neutralizantes específicos contra moléculas de superfície do capsídeo viral, visando a prevenção de novos casos. Já as vacinas terapêuticas visam à indução da imunidade mediada por células capazes de reconhecer e atacar os antígenos ou células que apresentam anormalidades, através do estímulo de ação das células APCs, ativando os linfócitos T auxiliares CD4⁺ e citotóxicos CD8⁺, frente à infecção já existente ou combatendo as células já modificadas pelo vírus.

2.6.1 Vacinas Profiláticas

Atualmente, as duas vacinas contra o HPV disponíveis no mercado e liberadas pelo FDA e pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) são profiláticas. Ambas baseadas na imunogenicidade conferida à proteína L1 quando estruturada em VLPs (*virus-like particles*) (HARPER et al., 2006; PAAVONEN et al., 2007). A primeira vacina foi licenciada, em 2006, denominada Gardasil[®] e produzida pela Merck Sharp Dohme, onde as proteínas L1 de HPV 6, 11, 16 e 18 são expressas em células de levedura, *Saccharomyces cerevisiae*. Já a Cervarix[®] é produzida pela Glaxo Smith Kline, licenciada em 2008, constituída pelas proteínas L1 de HPV 16 e 18 que são expressas em culturas de células de inseto, SF9.

Mais recentemente, em dezembro de 2014, o FDA aprovou a vacina Gardasil-9[®] (nonavalente), do mesmo fabricante da vacina homônima, porém formulada com partículas de L1 de 9 diferentes tipos de HPV: 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58 (CDC – *Centers for Disease Control and Prevention*, 2016).

Porém a busca por uma vacina baseada na proteína L1 mais eficiente e menos custosa continua. Vários estudos têm desenvolvido diferentes sistemas para a produção de proteína recombinante ou pseudovírus, visando o desenvolvimento de novas vacinas como a expressão em *Shigella casei* (YAN et al., 2014), *Listeria monocytogenes* (MUSTAFA et al., 2009), *Lactobacillus casei* (AIRES et al., 2006), *Bacillus subtilis* (BAEK et al., 2012), *Pichia pastoris* (BAZAN et al., 2009; KOTZÉ et al., 2011), *Baculovirus* (CHO et al., 2014) e em células de mamíferos (CIANCIARULLO et al., 2010; KAVATI, 2014; MARIGLIANI et al., 2012).

Há grupos que defendem a construção de VLPs construídas com as proteínas L1 e L2 do capsídeo viral, visando aumentar o espectro de proteção contra diferentes tipos de HPV. Tais proteínas podem ser íntegras (SAKAUCHI, 2016), ou utilizando a imunogenicidade de VLPs L1 como um sistema de “delivery” encapsulando peptídeos de L2, sendo testados fragmentos dos aminoácidos 17 ao 36 (SCHELLENBACHER; RODEN; KIRNBAUER, 2009) ou 108 a 120 (MCGRATH et al., 2013). Entretanto, esses trabalhos sugerem a necessidade de formar quimeras onde peptídeos imunodominantes de L1 sejam “deletados”, sendo inseridos peptídeos de L2 na superfície das VLPs, para que esses sejam os principais alvos de indução de resposta imune protetiva, induzindo a produção de anticorpos neutralizantes.

Essa necessidade de retirar peptídeos imunodominantes de L1 em VLPs L1L2 é devido a já conhecida imunodominância dessa proteína no direcionamento da resposta imune quando comparado à L2.

Um modelo utilizando quimeras de VLP L1 e L2 foi testado na fase pré-clínica. Os antígenos foram construídos inserindo os peptídeos L2₁₇₋₃₆ e L2₅₆₋₇₅ dentro do loop DE e/ou no braço C-terminal da proteína L1 de HPV16 ou HPV18. Desafios realizados em camundongos e coelhos demonstraram que a vacina foi capaz de proteger contra os 11 principais tipos de HPV, sugerindo que a construção quimérica tem melhor custo-benefício que as vacinas atuais (BOXUS et al., 2016).

Outra estratégia utilizada pelos pesquisadores na busca por uma vacina profilática contra o HPV é a utilização da proteína L2, pois pequenos epítomos dessa proteína podem induzir a produção de anticorpos capazes de neutralizar uma ampla gama de diferentes tipos de HPV (DAY et al., 2012; KARANAM et al., 2009b), possibilitando o desenvolvimento de uma vacina monovalente capaz de proteger contra HPVs genitais, de mucosa e cutâneos, denominadas de vacinas pan-HPV (PASTRANA et al., 2005).

Durante a infecção natural ou durante imunização experimental de VLPs L1L2, L2 é considerada pouco imunogênica com baixa produção de anticorpos anti-L2. Entretanto, quando a vacinação é realizada com a proteína L2 recombinante ou com peptídeos derivados dessa proteína são capazes de induzir a produção de anticorpos neutralizantes protetores em modelos animais (GAUKROGER et al., 1996; JAGU et al., 2013b). Estudos sugerem que esses dados conflitantes resultem da menor exposição de L2 na superfície dos vírions, todavia, durante a infecção é sugerido que antes do vírus se ligar aos receptores HSPG das células da membrana basal (GIROGLOU et al., 2001), o capsídeo viral passa por alterações conformacionais expondo a região amino-terminal de L2. Como todo esse processo é demorado, os anticorpos anti-L2 poderiam interagir com o vírus e prevenir sua entrada nas células alvo (KAWANA et al., 2001; TUMBAN et al., 2011; WANG et al., 2015a).

Diversos estudos têm se concentrado na estratégia de construção de sequências contendo um mesmo epítipo de L2, porém de diferentes tipos de HPV fusionados na tentativa de aumentar ainda mais o espectro de proteção, construindo concatâmeros de DNA (moléculas de DNA contendo múltiplas cópias de uma mesma sequência de nucleotídeos dispostos em série, linearmente em “tandem”) que quando desafiados em modelos animais têm demonstrado bons resultados (JAGU et al., 2009; JAGU et al., 2013a). Duas vacinas concatenadas se encontram na fase pré-clínica de testes, desenvolvidas pela Shantha Biotechnics (Índia) e Sanofi Pasteur (França), que prometem baixo custo de produção e ampla proteção contra diferentes tipos de HPV (SCHILLER; MULLER, 2015), porém os dados finais ainda estão sendo analisados.

2.6.2 Vacinas terapêuticas

Objetivando um tratamento mais específico e menos invasivo, diversos estudos têm se empenhado no desenvolvimento de vacinas terapêuticas contra as células infectadas por HPV e seus cânceres associados. O principal alvo dessa abordagem vacinal está no desenvolvimento de ações contra as oncoproteínas E6 e E7 dos vírus de alto risco, visto que essas proteínas são expressas constitutivamente nas células neoplásicas transformadas por HPV (CHO; KIM; KIM, 2002; TOUSSAINT-SMITH; DONNER; ROMAN, 2004).

As proteínas E6 e E7 possuem sequências antigênicas apresentadas por moléculas de MHC de classe I e II em camundongos e em humanos. E uma resposta eficiente contra tais proteínas seria essencialmente mediada por células T CD8⁺ com auxílio de células T CD4⁺ Th1, superando os mecanismos de tolerância induzidos por E6 e E7. Assim, diversas estratégias têm sido estudadas como o desenvolvimento de vacinas de DNA, vacinas de proteínas recombinantes, vacinas peptídicas ou vacinas celulares.

Vacinas baseadas em peptídeos são consideradas uma importante estratégia no desenvolvimento de vacinas terapêuticas por serem estáveis, seguras, não apresentarem reações adversas graves, pois utilizam apenas pequenas sequências de aminoácidos, além de possibilitar combinações de diferentes epítomos (LIU et al., 2012). Assim, diversos estudos se concentram na busca por peptídeos capazes de serem apresentados corretamente pelas moléculas de MHC, induzir resposta de células T CD8⁺ e CD4⁺. Diversos peptídeos de E7 já foram descritos como promissores, tendo demonstrado resultados satisfatórios em testes pré-clínicos (FELTKAMP et al., 1995).

Visando induzir resposta imune de células T CD4⁺, um peptídeo de E7 pan epítomo HLA-DR denominado PADRE, demonstrou capacidade de indução das células alvo em modelos animais, ativação de células dendríticas em potentes células ativadoras antígeno-específico (WU et al., 2010). Entretanto, tais vacinas quando em testes clínicos não resultaram na ativação das células de interesse ou essa ativação ocorreu em um número muito pequeno de pacientes testados (RESSING et al., 2000; STELLER et al., 1998).

Em menor frequência, epítomos de E6 também têm sido avaliados quanto à capacidade de gerar uma vacina contra o HPV. Diversos epítomos foram testados, porém aparentemente a sequência de aminoácidos de 50 a 57 demonstra ser imunodominante e capaz de gerar linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN- γ em modelos murinos, sendo capaz de proteger os camundongos frente ao desafio com células tumorais (BISSA et al., 2015; PENG et al., 2004).

Já as vacinas compostas por proteínas recombinantes têm a vantagem de conter e apresentar todos os epítomos ao sistema imune hospedeiro, sendo processados conforme sua

especificidade (FRAZER; LEGGATT; MATTAROLLO, 2011). A empresa Nventa Biopharmaceutical Corporation (Califórnia, EUA) produziu uma vacina terapêutica chamada SGN-00101 (HspE7), que consiste em uma proteína recombinante com a sequência completa do gene *E7* fusionada com a proteína Hsp65 (“heat shock protein”) de *Mycobacterium bovis*. Em ensaios clínicos fase I e II a vacina tem demonstrado a capacidade de ativar resposta de células B e T contra os patógenos e antígenos tumorais de HPV, induzindo a regressão de lesões de baixo grau (GOLDSTONE et al., 2002), papilomatose respiratória (DERKAY et al., 2005), NIC de graus II e III (EINSTEIN et al., 2007; KIETPEERAKOOL; SRISOMBOON, 2009).

Outra estratégia bastante estudada é o uso de vacinas de DNA contra lesões ou tumores HPV-positivos. As vacinas de DNA são relativamente seguras, estáveis e fáceis de produzir e armazenar. São capazes de manter a expressão dos genes de interesse, promovem a apresentação de antígenos através do MHC de classe I e permitem a administração de repetidas doses, sem levar à produção de anticorpos neutralizantes contra a vacina. A desvantagem do uso dessa estratégia vacinal é que testes clínicos têm demonstrado baixos níveis de imunogenicidade em humanos. Entretanto, diversos trabalhos têm tentado otimizar as construções vacinais visando aumentar os níveis de expressão dos antígenos e a imunogenicidade da vacina (GURUNATHAN; KLINMAN; SEDER, 2000).

Na tentativa de aumentar a imunogenicidade dos antígenos vacinais contra as proteínas do HPV, há o desenvolvimento de quimeras onde são fusionados fragmentos de proteína G do vírus da Herpes Simples 1 (HSV-1) às oncoproteínas E6E7 (LASARO et al., 2005) ou E5E6E7 (DINIZ et al., 2010) de HPV16. Os resultados obtidos foram bastante promissores com a proteção contra desafios com células TC-1. Aparentemente esses estudos estão sendo analisados para serem testados em ensaios pré-clínicos.

Em fase II dos testes clínicos, a vacina de DNA VGX-3100 produzida pela empresa Inovio Pharmaceuticals (EUA) é baseada nas proteínas E6 e E7 e tem demonstrado a capacidade de induzir a regressão de neoplasias intraepiteliais cervicais de níveis II e III, assim como combater a infecção por HPV através de uma robusta resposta de células T específicas (MORROW; YAN; SARDESAI, 2013).

Diversas vacinas de DNA estão sendo testadas em ensaios clínicos contra o HPV, também baseadas em E6 e E7, como a ZYC101a produzida pela empresa MGI Pharma (GARCIA et al., 2004). A ZYC101, baseada em epítomos de E7, produzida pela mesma empresa, porém em fase I de testes clínicos (KLENCKE et al., 2002), e as vacinas baseadas em E7 onde a sequência do gene foi alterada e o sítio de ligação ao Rb removido, em fase I de

testes clínicos produzidos pelo NIH (“National Cancer Institute” / EUA): pNGVL4a-Sig/E7/HSP70; primeira dose com a vacina de DNA (pNGVL4a-Sig/E7/HSP70) e reforço com a vacina recombinante TA-HPV com ou sem imiquimod; pNGVL4a-CRT/E7 (Clinical Trials – U. S. *National Institute of Health*, 2015).

As vacinas celulares têm sido bastante exploradas na busca de um tratamento terapêutico contra células tumorais. Alguns estudos demonstraram que as vacinas de células dendríticas apresentaram bons resultados quando retiradas do hospedeiro, tratadas *in vitro* contra antígenos de HPV e inoculadas novamente no hospedeiro infectado. As células dendríticas podem servir como um adjuvante natural, pois são capazes de aumentar a potência da imunoterapia antígeno-específica contra o câncer, tais vacinas celulares demonstraram a capacidade de combater as células transformadas por HPV (SANTIN et al., 2008; WANG et al., 2000).

Para aumentar a vida útil dessas células dendríticas tratadas, inibindo a apoptose mediada por células T, pesquisadores têm transfectado essas células dendríticas com siRNA para moléculas pró-apoptóticas, gerando uma maior ativação de células T CD8⁺ específicas com efeitos antitumorais em camundongos. Alguns ensaios pré-clínicos e clínicos de fase I e II já foram realizados demonstrando a segurança, falta de toxicidade e alta imunogenicidade dessas vacinas de células dendríticas em pacientes (AHN et al., 2015; SANTIN et al., 2008).

Outro tipo de vacina baseada em células testadas ocorre quando células tumorais são isoladas e manipuladas *ex vivo* a expressarem proteínas imunomoduladoras para aumentar a imunogenicidade *in vivo*. Citocinas como IL-2, IL-12 ou GM-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos) induzem a diferenciação de células T “naive” para células efetoras ou células T “helper” contra essas células tumorais HPV-positivas. Essas células efetoras retornam ao hospedeiro treinadas a encontrar e destruir as células tumorais que expressem antígenos de HPV (CHANG et al., 2000; MIKYSKOVA et al., 2004). Entretanto, essa técnica traz riscos de implantar novos tumores nos pacientes, além de ter altos custos, então poucas pesquisas têm mantido nessa linha e poucos testes clínicos estão sendo estudados (YANG et al., 2016).

2.6.3 Vacina profilática e terapêutica

Até o momento, poucos grupos têm se dedicado ao desenvolvimento de uma vacina profilática e terapêutica contra o HPV.

Dentre as diferentes técnicas em estudo, alguns grupos optam pela expressão de uma proteína recombinante truncada contendo os epítomos das 2 proteínas, como L1 Δ C34E7_{N1-60}. A proteína é expressa e purificada para assim ser utilizada na imunização de camundongos, que foram desafiados por células TC-1. Os resultados demonstraram que a vacina foi capaz de induzir a produção de anticorpos específicos anti-L1 e anti-E7, entretanto os ensaios de desafio com células tumorais mostrou proteção em 70% dos casos (BIAN et al., 2008).

Outra construção vacinal L1E7 foi analisada utilizando a proteína L1 humanizada e apenas os aminoácidos de 1 a 473, e E7 com resíduos do aminoácido 1 ao 60, onde ambas foram fusionadas criando a construção L1h₁₋₄₇₃/E7₁₋₆₀. Essa construção foi testada como uma vacina de DNA e utilizada para imunizar camundongos. Esses animais demonstraram a capacidade de produzir anticorpos específicos anti-L1, assim como induzir a diferenciação de linfócitos T citotóxicos específicos contra L1 e E7 (KUCK et al., 2006).

A vacina profilática e terapêutica em fase mais avançada de estudo é denominada TACIN, que compreende uma construção em tandem de proteínas L2, E6 e E7 resultando em uma proteína recombinante de 725 aminoácidos e 80 KDa. A proteína recombinante foi expressa em culturas de *E. coli* e purificada, sendo então utilizadas em ensaios de imunização de camundongos. Obtendo ótimos resultados, seguiu-se para as fases de ensaios pré-clínico e fase I dos ensaios clínicos. Entretanto, nos ensaios em pacientes demonstrou apenas a capacidade de induzir a produção de anticorpos específicos anti-L2 em pico único, com as concentrações diminuindo ao longo de um tempo muito curto, mas foi capaz de induzir a resposta de células T específicas anti-E6 e anti-E7 (HIBBITTS, 2010; VAN DER BURG et al., 2001). Novos adjuvantes têm sido testados na tentativa de se obter uma resposta mais duradoura na produção de anticorpos protetivos (KARANAM et al., 2009a).

As vacinas de DNA têm se mostrado uma alternativa promissora na profilaxia e imunoterapia contra o HPV, pois diversos estudos demonstraram sua capacidade de estimular uma resposta imune humoral e celular. Entretanto, a maior vantagem do uso dos plasmídeos como vacinas está na sua característica de serem de fácil manipulação, preparação, alta estabilidade, podendo ser transportados liofilizados e com isso reduzir os custos de transporte e armazenamento, assim como sua relativa maior segurança quanto aos vetores virais. Usando uma simples injeção intramuscular, a grande maioria das vacinas de DNA persistem como extracromossomais, significando maior segurança.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Construir um vetor vacinal contendo o gene sintético *L2E6* baseado em sequências de HPV16 e avaliar sua capacidade de indução de uma resposta imune humoral e celular em camundongos imunizados, frente à capacidade de induzir proteção e/ou tratamento contra o HPV e aos cânceres associados ao vírus.

3.2 Objetivos específicos

- Selecionar epítomos das proteínas L2 e E6 de HPV16 para a construção do gene sintético *L2E6*;
- Construir vetores vacinais e de expressão em células de mamíferos contendo epítomos fusionados das proteínas L2 e E6 de HPV16;
- Expressar e caracterizar a proteína recombinante L2E6 de HPV16 em culturas de células das linhagens HEK 293T e 293F;
- Avaliar a capacidade da vacina de DNA L2E6 induzir resposta imune celular em modelo murino, quanto à prevenção e/ou tratamento terapêutico antitumoral, por meio de desafios com células transformadas que expressam as oncoproteínas E6 e E7 de HPV16;
- Verificar a capacidade de indução de uma resposta imune humoral com a produção de anticorpos específicos anti-L2 e anti-E6 após imunização dos camundongos com a vacina de DNA contendo o gene *L2E6*, quanto ao reconhecimento dos epítomos L2 e E6.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Seleção dos epítomos e construção dos vetores

As sequências dos genes *L2* e *E6* do HPV16 foram obtidas do banco de dados internacionais GenBank®, sendo que o código de acesso do gene *E6* utilizado foi AAD33252 e a referência para acesso de *L2* NC_001526.2. A partir das sequências dos genes completos, sequências de peptídeos foram selecionadas conforme sua capacidade de indução de resposta imune descritas em outros trabalhos.

Os peptídeos selecionados a partir do gene *E6* estão entre os resíduos de aminoácidos 50 a 57 (YDFAFRDL), responsáveis pela indução de resposta imune celular através da ativação de Linfócitos T citotóxicos (BAUER et al., 1995). Os códons foram otimizados para que haja maior sucesso em sua expressão em células humanas, utilizando a ferramenta Codon Optimization da IDT - Integrated DNA Technology, e a sequência final obtida foi TATGATTTTCGCCTTCAGGGACCTC.

Para o gene *L2*, o peptídeo selecionado é encontrado entre os resíduos de aminoácidos 17 a 36 (QLYKTCKQAGTCPPDIIPKV), sendo a sequência otimizada como descrito acima, resultando em:

CAGCTGTATAAACTTGTAAGCAGGCCGGTACGTGCCCCCCAGATATCATT
CCAAAGGTC.

Ambas as sequências foram ligadas por 3 sequências “Linker”, resultando na sequência de 96 pb (pares de bases), a qual foi adicionada as sequências iniciadora e de terminação, dando origem a seguinte sequência de 102 pb:

ATG CAG CTG TAT AAA ACC TGT AAA CAG GCA GGT ACA TGT CCG CCG
GAT ATT ATT CCG AAA GTT GGT GGT AGC GGC TAT GAT TTT GCC TTT CGC
GAT CTG TAA

A sequência final foi sintetizada pela empresa Gene Art™ (Thermo Fisher Scientific) dando origem ao gene sintético denominado *L2E6*.

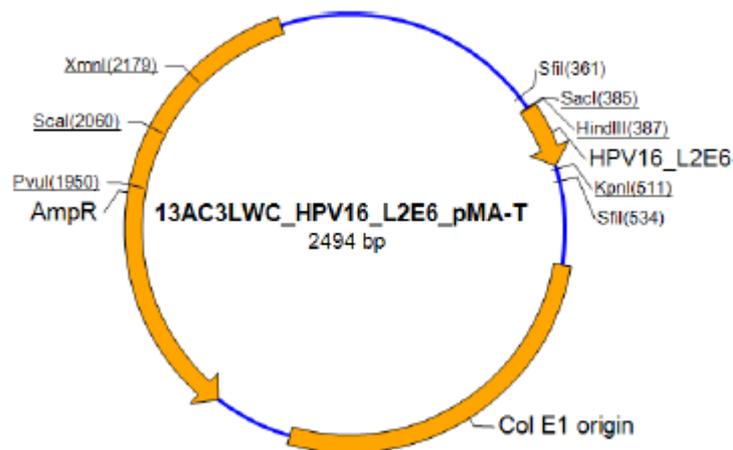
4.2 Construção dos vetores

Foram desenhados 2 vetores contendo o gene sintético *L2E6* e desenvolvidos pela empresa Gene Art™ (Thermo Fisher Scientific), sendo um vetor de clonagem usando como base o vetor comercial pMAT (Thermo Fisher Scientific) e um vetor de expressão ou vetor vacinal em pcDNA (Thermo Fisher Scientific) que serão melhor descritos abaixo.

Para a construção do vetor de clonagem, o gene sintético *L2E6* foi inserido em pMA-T, sendo ambas as extremidades do gene sintético e do vetor flanqueadas por sequências da endonuclease *Sfi I* (Thermo Fisher Scientific).

O vetor denominado pMA-T/L2E6 possui origem de replicação bacteriana Col E1 e gene de resistência à ampicilina, *AmpR*. O vetor completo apresenta 2494 pb, como pode ser observado na figura abaixo (Figura 8).

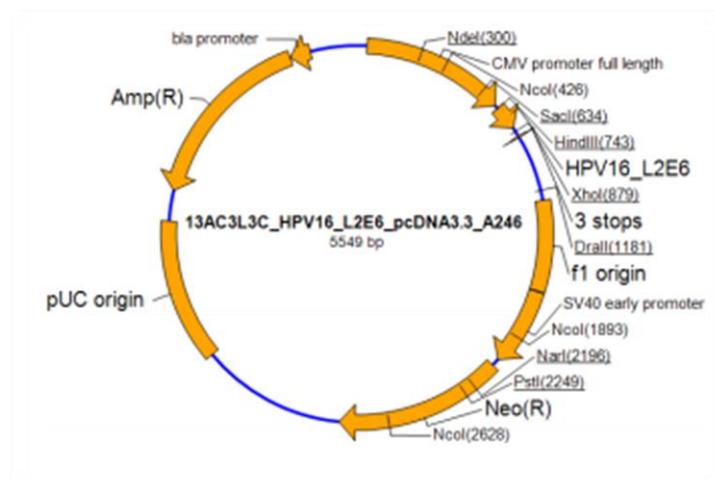
Figura 8 – Representação esquemática do vetor pMA-T/L2E6.



Para a construção do vetor de expressão, o inserto *L2E6* foi inserido no vetor pcDNA3.3 flanqueados por sítios de endonucleases *Hind III* e *Nhe I*, recebendo o nome de pcDNA3.3/L2E6. O plasmídeo construído tem origem de replicação bacteriana, pUC, gene de resistência à Ampicilina, *Amp* (R), e promotor de CMV (Citomegalovirus), como pode ser observado na figura abaixo (Figura 9).

Para análises dos vetores, foram realizados ensaios de eletroforese em gel de agarose a 0,8% (m/v) em tampão TAE 0,5x (Tris 40 mM, Acetato 20 mM, EDTA 1 mM) e submetidos à corrida eletroferética a 80V na presença do corante Blue Green Loading Dye (LGC Biotecnologia, Cotia, Brasil).

Figura 9 - Mapa do vetor pcDNA3.3/L2E6.



4.3 Quimiocompetência das bactérias

Para a amplificação dos vetores foram utilizadas as cepas bacterianas *Escherichia coli* DH5 α e TOP10. A primeira foi gentilmente cedida pela Dra. Itamar Romano Garcia Ruiz, enquanto a segunda linhagem pelo Dr. Marcelo Sircili, ambos pesquisadores do Laboratório de Genética, Instituto Butantan. As cepas bacterianas foram cultivadas em 3 mL de meio Luria-Bertani (LB) (Tryptona 2%, Extrato de levedura 1%, NaCl 1%) a 37 °C, sob agitação a 250 rpm por aproximadamente 18 horas. Em seguida, uma alíquota dessa cultura foi estriada em uma placa de Petri contendo meio LB acrescido de 1,5% de ágar, incubada a 37 °C, por aproximadamente 18 horas.

No dia seguinte, uma colônia foi escolhida para semear 3 mL de meio LB e cultivada nas mesmas condições descritas anteriormente. Após esse período, 1 mL dessa cultura foi utilizado para semear 100 mL de meio LB e cultivado a 37 °C, sob agitação até que a densidade óptica da cultura a 600 nm (DO₆₀₀) atingisse 0,4, onde as bactérias cultivadas se encontravam na metade da fase exponencial de crescimento.

A indução da competência foi realizada segundo protocolo estabelecido por Sambrook e cols. (2001), onde após atingirem a densidade celular desejada, a cultura de bactérias foi transferida para um tubo cônico e centrifugado a 5000 g por 10 minutos e incubadas em solução de 0,1 M de CaCl₂ por 1 hora no gelo. Em seguida, as bactérias foram novamente centrifugadas e ressuspensas em solução 0,1 M de CaCl₂ acrescido de 10% de glicerol (m/v). Alíquotas de 200 μ L foram congeladas a -80 °C até sua utilização.

4.4 Transformação bacteriana

A partir das bactérias competentes descritas acima, foi realizada a transformação bacteriana (SAMBROOK; RUSSELL, 2001), onde uma mistura de 10 µL de DNA plasmideal, aproximadamente 1 µg, e uma alíquota de bactérias quimiocompetentes foi incubada por 30 minutos no gelo, submetida a um choque térmico por 2 minutos a 42 °C e incubada novamente no gelo durante 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 350 µL de meio S.O.C (Tryptona 2%, Extrato de levedura 0,5%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, Glicose 20 mM), sendo a mistura incubada por 90 minutos a 37 °C, sob agitação de 250 rpm. Em seguida, as bactérias transformadas foram semeadas em placas de meio LB-ágar contendo ou não 100 µg/ml de ampicilina e incubadas a 37 °C por 18 horas.

Colônias crescidas nas placas de meio LB-ágar contendo ampicilina identificam os clones positivos que foram selecionados por PCR de colônia e semeadas em tubos contendo 3 mL de meio LB, incubadas a 37 °C, sob agitação por aproximadamente 18 horas.

4.5 Seleção das colônias bacterianas

Para seleção das colônias bacterianas após a transformação foi utilizada a técnica de PCR da colônia, onde utilizando iniciadores específicos sintetizados a partir da sequência do gene *L2E6* foram desenhados 2 iniciadores, EAK03 e EAK02, e sintetizados pela empresa EXXTEND Biotecnologia Ltda (Campinas, Brasil), capazes de gerar um produto de 144 pb. A sequência dos iniciadores pode ser observada abaixo (Tabela 1).

Tabela 1 - Sequência dos iniciadores utilizados para amplificação do fragmento L2E6 para seleção de colônias bacterianas transformadas pelo vetor pcDNA3.3/L2E6.

Iniciadores		Sequência (5´- 3´)
EAK03	Foward	CCCTTAAGCTTGCCACCATGCAGC
EAK02	Reverse	GAGTGTCTAGATGCCACGCT

Os iniciadores foram ressuspensos em tampão TE (Tris/HCl 10 mM, EDTA 1 mM) a uma concentração estoque de 100 µM.

Para a PCR, cada solução foi preparada isoladamente em microtubos contendo 25 µL de solução PCR-Mix (MgCl₂ 1,5 mM, Taq 0,5U, dNTPs 200 µM - LGC Biotecnologia, Cotia, Brasil), 0,5 µL de cada iniciador a 25 µM e água ultrapura para um volume final de solução de 50 µL. Como DNA molde foi utilizada uma amostra de cada colônia de bactéria transformada selecionada e crescida em meio LB com ampicilina. A amplificação em

termociclador Mastercycler EpGradient (Eppendorf, Alemanha) ocorreu seguindo o protocolo: 95 °C por 5 minutos, 25 ciclos de 1 minuto a 95 °C, 30 segundos a 56 °C e 1 minuto a 72 °C, seguido por extensão final a 72 °C por 7 minutos.

A detecção dos produtos da PCR ocorreu através da eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão TAE 0,5X. As amostras foram preparadas com adição de 0,5 µL de corante Blue Green Loading Dye I e submetidos a uma corrida a 80 A por 30 minutos. Como parâmetro de tamanho dos fragmentos foram utilizados 2 marcadores de peso molecular, o Marcador Universal contendo 8 fragmentos de 10000 pb a 100 pb (LGC Biotecnologia) e o segundo marcador 50 pb DNA Ladder contendo 12 fragmentos de 1000 pb a 50 pb (LGC Biotecnologia). O gel foi analisado em transluminador High Performance Ultraviolet Transilluminator (UVP Ultraviolet Products, Upland, EUA) e as imagens capturadas em fotodocumentador Alliance 9.7 (UVITEC Cambridget, Cambridget, Inglaterra).

4.6 Extração de DNA plasmideal

Os clones positivos selecionados pela PCR da colônia foram cultivados em 5 mL de meio LB, a 37 °C, por aproximadamente 18 horas, sob agitação. Em seguida, na presença do antibiótico de seleção. No dia seguinte, foram centrifugados a temperatura ambiente, por 1 minuto a 12000 x g para sedimentar as bactérias íntegras. Para a purificação do DNA plasmideal, foi utilizado o GeneJet Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific), que é baseado no procedimento de lise alcalina combinado a uma coluna de ligação seletiva ao DNA circular, realizado de acordo com as instruções do fabricante. O DNA purificado foi analisado em gel de agarose a 0,8% em tampão TAE 0,5X e submetidos à técnica de sequenciamento para confirmação da inserção do gene de interesse ao vetor, e quantificado em espectrofotometro (ACTGene, Nova Jérsei, EUA) e armazenado a -20 °C.

4.7 Sequenciamento de DNA

As amostras de DNA plasmideal foram sequenciadas para confirmação da correta inserção do gene *L2E6* e sua integridade. Para isso, as amostras de DNA purificados do gel como descrito na sessão anterior foram quantificadas por espectrofotometria. Foi aliqotado um volume de 5 µL do plasmídeo e adicionado 2,5 uL do iniciador EAK03 constante na tabela 1 a uma concentração de 5 µM. As amostras foram enviadas para o Centro de Genomas Humano, da Universidade de São Paulo, onde ocorreu a reação de sequenciamento no equipamento ABI 3730 DNA Analyser (Thermo Fisher Scientific).

4.8 Linhagens celulares e condições de cultivo

Em princípio, para verificar a expressão do vetor pcDNA3.3/L2E6, o processo de transfecção foi realizado em células HEK293T cultivadas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Cultilab, Campinas, Brasil) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF, Cultilab, Campinas, Brasil), D10, mantidas em atmosfera úmida, contendo 5% de CO₂ até atingirem de 50-80% de confluência. Os repiques ocorreram a cada 3 ou 4 dias.

A linhagem celular escolhida para a expressão das proteínas recombinantes em maior escala foi a 293F, FreeStyle™ 293 Expression System (Life Technologies™), que foi desenvolvida para permitir a transfecção em larga escala de células em suspensão em meio definido e livre de soro.

Células 293F foram cultivadas em 30 mL de meio FreeStyle™ 293 Expression (Life Technologies™) em frascos de vidro estéril a 37 °C e 5% CO₂, em atmosfera úmida, sob agitação com rotação a aproximadamente 135 rpm. Os repiques celulares foram realizados a cada 3 ou 4 dias, com densidade celular de aproximadamente 2 a 3 x 10⁶ células viáveis/mL, onde as células eram transferidas para tubos cônicos e centrifugadas a 800 rpm por 5 minutos. Em seguida, a viabilidade celular foi analisada e as células diluídas a uma densidade celular final de 3 x 10⁵ células viáveis/mL em meio fresco pré-aquecido.

Para determinação da viabilidade celular foi utilizado o método de exclusão por azul de tripan (0,4% em PBS) e contagem em câmara de Neubauer.

4.9 Transfecção celular

O ensaio de transfecção transiente das células da linhagem HEK 293T foram realizados por lipofecção utilizando o reagente de transfecção GeneJuice® Transfection Reagents (EMD Biosciences/Merck, Darmstadt, Alemanha), conforme especificações do fabricante. Resumidamente, o reagente de transfecção foi misturado por vórtex a uma alíquota de meio DMEM, sendo incubado por 5 minutos a temperatura ambiente. À mistura foi adicionado o DNA plasmideal de interesse, na proporção adequada, homogeneizado gentilmente e incubado por 15 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, a mistura Meio/reagente de transfecção/DNA foi adicionada às células com meio de cultura completo, e incubado em estufa a 37 °C e 5% de CO₂. Após o período de 8 horas foi realizada a troca do meio de cultura, agora por meio completo contendo antibiótico e SBF a 10%. A incubação seguiu até aproximadamente 48 horas quando as células foram coletadas e analisadas em imunofluorescência e em gel de eletroforese SDS-PAGE, que serão descritas em tópicos posteriores.

Para as células 293F, os ensaios de transfecção aconteceram conforme instruções do fabricante, utilizando o reagente de transfecção 293fectin.

Um dia antes da transfecção foi determinada e ajustada a densidade celular das células 293F viáveis. Em 28 mL de meio FreeStyle™ Expression Medium foram acrescentados 7×10^5 células, cultivadas em condições descritas no item 2.

No dia seguinte, uma pequena alíquota da cultura celular foi transferida para um microtubo para determinação da taxa de viabilidade celular, que deve permanecer em torno de 90%. Para a transfecção de 3×10^7 células viáveis, foram preparadas duas soluções em diferentes tubos cônicos estéreis:

Tubo 1 – 30 µg de DNA plasmideal pcDNA3.3/L2E6 em 1 mL de volume final com meio Opti-MEM®, homogeneizados gentilmente;

Tubo 2 – 60 µL de 293fectin™ em 1 mL de volume final com meio Opti-MEM®, misturados gentilmente e incubado por 5 minutos a temperatura ambiente.

Em seguida, os conteúdos do tubo 1 e 2, descritos acima, foram misturados gentilmente resultando em uma solução de 2 mL, que foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente, para permitir que o DNA plasmideal forme complexos com a 293fectin®.

Enquanto o complexo DNA-293fectin® era incubado, as células em cultivo foram centrifugadas em tubos cônicos a 800 rpm por 5 minutos, sendo o meio em cultivo substituído por 28 mL de meio FreeStyle™ Expression Medium fresco, pré-aquecido.

Por fim, os 2 mL do complexo DNA-293fectin® foi adicionado aos 28 mL de meio e células em suspensão, totalizando 30 mL de solução para transfecção, incubado 48 horas a 37 °C e 5% CO₂, em atmosfera úmida, sob agitação em shaker orbital a aproximadamente 125 rpm.

4.10 Expressão e caracterização das proteínas recombinantes

4.10.1 Expressão intracelular das proteínas

Após transfecção, uma alíquota das células foi separada para análise da expressão das proteínas recombinantes intracelulares através de ensaios de imunofluorescência.

As células HEK 293T foram cultivadas sobre lamínulas redondas de 13 mm de diâmetro em placas de cultura (TPP®) de 12 poços. As linhagens facilmente aderentes foram cultivadas diretamente sobre as lamínulas em meio D10, mantidas em atmosfera úmida, contendo 5% de CO₂, por aproximadamente 18 horas. No dia seguinte, foi realizado o ensaio de transfecção celular conforme descrito no item anterior (sessão 4.9).

Para os ensaios utilizando as células 293F já transfectadas, conforme descrito no item 4.9, foram centrifugadas em microtubos e o sobrenadante descartado.

Após as transfecções, ambas as linhagens de células foram lavadas 2 vezes em PBS e fixadas em solução de paraformaldeído a 1% em PBS, por 1 hora a 4 °C. Após sucessivas lavagens para remoção de todo fixador, as células foram incubadas em solução PBS+BSA 5% para o bloqueio de ligações inespecíficas e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas em PBS por 3 vezes e então incubadas com anticorpo primário específico anti-HPV16 L2 ou anti-HPV16 E6 diluídos em 0,5% BSA e 0,05% Tween 20 em PBS por 1 hora a temperatura ambiente, agitando-se o tubo frequentemente. Após nova lavagem, as células foram incubadas com os respectivos anticorpos secundários específicos diluídos em 1,5% BSA e 0,01% Tween 20 em PBS por 1 hora a temperatura ambiente, com frequentes agitações no tubo contendo as células e a solução com os anticorpos. Os anticorpos secundários usados foram Alexa Fluor® 488 anti-IgG de camundongo produzido em cabra (Molecular Probes®, OR) e Alexa Fluor® 633 anti-IgG de coelho produzido em cabra. Após uma última lavagem em PBS, as células 293F foram distribuídas sobre lamínulas de vidro revestidas com poli-L-lisina a 0,5% em PBS.

Por fim, as lamínulas contendo as células HEK 293T ou 293F foram montadas sobre lamínulas com Mowiol (Calbiochem, CA), contendo Iodeto de propídio (PI – Molecular Probes®, OR) que evidenciam a presença e localização dos ácidos nucleicos. As preparações foram mantidas a 4 °C, protegidas da luz até o momento de suas análises no microscópio confocal Zeiss LSM 510 Meta laser-scanning.

4.10.2 Análise da expressão das proteínas recombinantes

Após cada reação de transfecção, as células foram lisadas em tampão (Tris 0,5 M pH 7,4, NaCl 0,5 M, EDTA 0,5 M pH 8,0, EGTA 0,2 M, Triton X-100, coquetel inibidor de protease), centrifugadas a 10.000 x g por 5 minutos, sendo o precipitado descartado e o sobrenadante armazenado a -20 °C até o momento do uso.

Para confirmar a transfecção, as amostras de lisados celulares foram analisadas de uma maneira mais rápida e simples através de ensaios de *dot blotting*. Assim, 10 µL de amostras foram expostas a tiras de membrana de nitrocelulose (Bio-Rad Laboratories, Inc.), após secarem, as tiras foram incubadas em solução contendo 5% de leite em pó desnatado em PBST por 1 hora, sob agitação a temperatura ambiente. Em seguida as tiras de membrana foram lavadas 4 vezes em PBST, por 10 minutos, e incubadas com solução de anticorpos monoclonais anti-HPV16 L2 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) ou anti-HPV16/18 E6

(Abcam[®]) diluídos em 1% de leite em pó desnatado em PBST durante 1 hora a temperatura ambiente, sob agitação. E então, as tiras foram novamente lavadas por 10 minutos em PBST, 4 vezes, e incubadas em anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a horseradish peroxidase (Sigma-Aldrich[®]) diluídos em PBST e 1% de leite em pó desnatado, por mais 1 hora, sob agitação a temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram lavadas por mais 4 vezes de 10 minutos em PBST e a revelação se deu por uma solução substrato DAB (diaminobenzidina) - peroxidase (DAB 0,05%, H₂O₂ 0,015%, PBS 0,01 M, pH 7,2), incubado a temperatura ambiente por até 10 minutos, sob agitação e protegido da incidência da luz.

As amostras positivas nos ensaios de dot blot, seguiram para análise de expressão das proteínas recombinantes realizada através de ensaios de *Western blotting*. Para isso, um gel Tricina-SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) a 16% foi preparado e submetido à separação eletroforética (30 V por 300 minutos), sob condições desnaturantes, contendo amostras de lisados de células transfectadas diluídas em tampão de corrida, conforme descrito no item abaixo (4.11). Em seguida, o gel foi corado em solução Coomassie Blue (Ácido acético 7%, Metanol 50%, Coomassie Brillante Blue R-250 0,1%) ou as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose para realização de ensaios de *Western blotting*. Após transferência eletroforética (30 V e 15 mA por 18 horas, ou 70 V e 35 mA por 2 horas) em tampão de transferência (Tris 0,025 M, Glicina 0,192 M, Metanol 20%) a 4 °C, a membrana foi corada em solução contendo corante temporário Ponceau (Ponceau S 0,1%, Ácido acético 5%) para confirmação da transferência e marcação dos marcadores de peso molecular. Em seguida, as membranas foram lavadas em água destilada para remoção da coloração por solução de Ponceau e incubadas em solução contendo 5% de leite em pó desnatado diluído em PBST (Tween 20 0,05%, PBS), por 1 hora, a temperatura ambiente, sob agitação. Após esse período, as membranas foram lavadas 4 vezes em PBST e incubadas com soluções de leite em pó desnatado a 1% em PBST contendo os anticorpos primários anti-HPV16 L2 monoclonal, anti-HPV16 L2 policlonal produzido em coelho (gentilmente cedido pelo Prof Dr R. B. S. Roden, John Hopkins School of Medicine, USA) e/ou anti-HPV16 E6 por 2 hora a temperatura ambiente, sob agitação. A seguir, as membranas foram novamente lavadas 4 vezes em PBST e incubadas em solução contendo os respectivos anticorpos secundários anti-IgG de camundongo ou anti-IgG de coelho conjugados com horseradish peroxidase em solução de leite em pó desnatado a 1% em PBST, incubadas por 2 horas a temperatura ambiente, sob agitação. A reação foi detectada usando o

kit Novex® ECL HRP Chemiluminescent Substrate Reagent (Invitrogen) em filmes sensíveis à luz verde (Kodak).

4.11 Análises proteicas

As amostras de lisado celular foram analisadas em gel de eletroforese Tricina-SDS-PAGE a 16%, sendo o mais indicado para a separação de proteínas de 1 a 100 KDa (SCHAGGER, 2006).

Para isso, primeiramente foi preparado o gel de separação a 16%, onde o tampão AB-6 (acrilamida 46,5 g, bis-acrilamida 3 g) foi diluído em tampão do gel (Tris 3 M, HCl 1M, SDS 0,3%, pH 8,45), acrescido de PA 10% [(NH₄)₂S₂O₈] e TEMED [(CH₃)₂NCH₂CH₂N(CH₃)₂]. Rapidamente o gel foi colocado no aparato para polimerizar. Em seguida, foi preparado um novo gel de separação a 10%, utilizando o tampão AB-3 (acrilamida 48 g, bis-acrilamida 1,5 g) foi diluído no mesmo tampão de gel, água, PA 10% e TEMED. Após o preparo, o gel a 10% foi colocado sobre o gel a 16% delicadamente. Por fim, foi preparado um gel de empilhamento, onde o tampão AB-3 foi diluído em tampão do gel, água, PA 10% e TEMED a uma concentração final de 4%.

As amostras proteicas foram quantificadas e sua concentração ajustadas para que cada amostra contenha aproximadamente 15 µg de proteínas. A dosagem das proteínas ocorreu pelo método de Bradford (Bio-Rad Laboratories Inc.), conforme instruções do fabricante. Assim, as amostras foram diluídas em tampão de amostra (Tris-Cl 1 M pH 6,8, SDS 0,8%, azul de bromofenol 0,1%, glicerol 40%, β-mercaptoetanol 14,4 M) e finalmente submetidas à separação eletroforética (30 V por 300 minutos) em tampão tris-tricina (Tris 0,1 M; Tricina 0,1 M; SDS 0,1%, pH 8,5).

Após separação, o gel foi corado com solução Coomassie blue.

4.12 Síntese de peptídeos

Para serem usados como controles positivos dos peptídeos desenhados no presente estudo, peptídeos sintéticos L2 (PEP2) e E6 (PEP1) foram solicitados a empresa FastBio Ltda. (Ribeirão Preto, SP).

Sendo o PEP 1, referente ao peptídeo selecionado da proteína E6 de HPV16, cuja sequência é YDFAFRDL, contendo 8 aminoácidos e pureza >85%.

O PEP2, selecionado da proteína L2 de HPV16, tem a sequência LYKTCKQAGTCCPPDIIPKV, com 19 aminoácidos e pureza >85%.

Os peptídeos foram recebidos liofilizados e foram ressuspensos em água ultrapura a uma concentração de 5 mg/mL.

4.13 Cultivo de células tumorais TC-1

Células primárias de pulmão de camundongos C57BL/6 foram transduzidas com os genes *E6* e *E7* de HPV16, em seguida, as células imortalizadas foram novamente transduzidas com o gene humano ativado *c-Has-ras*, gerando a linhagem de células transformadas estáveis TC-1 que expressam a proteína E6 e E7 de HPV16, sendo capazes de gerar tumores sólidos em camundongos de mesmo background genético (LIN, 1996).

Uma alíquota de células TC-1 foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Paulo Lee Ho, Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan. As células foram cultivadas em frascos de poliestireno de 75 cm² (TPP - TPP Techno Plastic Products AG, Suíça) em meio RPMI (Cultilab, Campinas, Brasil), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Cultilab, Campinas, Brasil) a 37 °C e 5% CO₂. O repique das células ou a troca dos meios de cultura foram realizados a cada 3 ou 4 dias. Para o repique, solução de Tripsina/EDTA a 250 mg% (Cultilab) foi utilizada para remover as células aderidas ao fundo dos frascos de cultura, incubadas por até 15 minutos, a 37 °C. Em seguida, as células foram centrifugadas a 800 x g por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante descartado e as células ressuspensas em novo meio de cultura. Para armazenamento da linhagem celular durante períodos longos, alíquotas das células foram armazenadas em solução de meio de cultura RPMI contendo 10% de SBF, acrescido de 10% de DMSO, em nitrogênio líquido.

4.14 Experimentos *in vivo*

Com o intuito de avaliar a possibilidade de utilização dos vetores construídos como vetores vacinais, visto que o plasmídeo escolhido, pcDNA, também permite tal utilização, foram realizados ensaios *in vivo*.

Para os ensaios em animais, o presente trabalho foi analisado e aprovado junto à Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan, sob o número de protocolo 923/12, em anexo.

Camundongos C57BL/6 machos de 4 a 8 semanas fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan, com peso médio de 20 g, foram separados em 4 grupos contendo 10 animais em cada grupo, mantidos em biotério com alimento e água *ad libitum* e ciclo luminoso controlado.

Os animais foram pesados semanalmente antes e durante todo o experimento.

4.14.1 Avaliação profilática

Dois grupos de 4 ou 6 animais foram selecionados para avaliação profilática da vacina de DNA proposta no presente trabalho.

O primeiro grupo, denominado de grupo I, contendo 4 animais recebeu 50 μ L de solução PBS intramuscular em 3 doses no intervalo de 14 dias entre a primeira (dia 1) e segunda dose (dia 14), e 7 dias (dia 21) entre a segunda e a terceira dose.

Já os 6 animais que compuseram o grupo II, receberam 3 doses da construção vacinal pcDNA3.3/L2E6 em solução PBS, em concentrações decrescentes. A primeira dose ocorreu no dia 1 e os animais receberam 50 μ g da vacina de DNA. A segunda dose foi ministrada 14 dias após, em concentração de 20 μ g, enquanto a terceira e última dose apresentava a concentração de 5 μ g do vetor vacinal, aplicada 7 dias após a dose anterior.

As vacinas foram ministradas pela via intramuscular no músculo tibial anterior da pata traseira, sendo que as doses foram administradas intercalando entre as patas traseiras direitas e esquerdas. O volume inoculado nunca superou 50 μ L de solução.

Sete dias após a última dose (dia 28), todos os animais de ambos os grupos foram desafiados com 10^5 células TC-1 em solução PBS pela via subcutânea na região dorso-lateral esquerdo de cada animal. Os camundongos foram observados diariamente e 8 dias após implementação das células tumorais foi possível detectar a formação de massa palpável. A partir da detecção dos tumores, esses foram medidos a cada 2 dias com auxílio de um paquímetro digital (Western[®], China). Os tumores cresceram em formas irregulares e foram medidos quanto ao comprimento e o eixo perpendicular, a largura, no mesmo plano. A partir desses dados foi calculado o volume do tumor de cada camundongo em cm^3 , os dados foram agrupados e analisados estatisticamente utilizando os testes t de Student ($p=5,00\%$), e o software Graphic-Pad Prism 6, versão 3.0.

Foram realizadas coletas de pequenas alíquotas de sangue, aproximadamente 100 μ L, de todos os animais nos dias 0, 14, 28, 42. Os camundongos foram eutanasiados cerca de 3 semanas após a implantação dos tumores (dia 49), seguindo as normas éticas em experimentação animal (TAMBOURGI et al., 2010) e foi coletado todo sangue.

A partir das amostras de sangue, o soro dos animais foram coletados através de centrifugação a 800 rpm, onde aproximadamente 30 μ L de soro foram obtidos e armazenados a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ até o momento das análises.

4.14.2 Avaliação terapêutica

Para avaliação da eficácia do uso do vetor vacinal construído, pcDNA3.3/L2E6, na terapêutica de cânceres associados ao HPV, 3 grupos animais foram selecionados para os ensaios.

Os grupos foram formados por 10 animais e desafiados com 7×10^4 células TC-1 em meio de cultura DMEM e inoculados pela via subcutânea na região dorso-lateral esquerdo de cada animal. Previamente, a área foi preparada com a raspagem dos pelos para facilitar a aplicação das células tumorais pela via correta.

No dia seguinte a inoculação das células tumorais, dia 1, os animais do grupo controle, grupo III, receberam 5 μ g do vetor vazio, pcDNA3.3, e no dia 10, ministrada uma segunda dose contendo 5 μ g do mesmo vetor.

Os animais foram acompanhados diariamente e a região apalpada para verificar a implantação do tumor. Assim que detectados, os tumores foram medidos manualmente com auxílio de um paquímetro digital a cada 2 dias, ou até que os tumores atingissem aproximadamente 20 mm de diâmetro, quando os animais foram eutanasiados.

Para os ensaios experimentais, os animais foram divididos em 2 novos grupos, onde o primeiro grupo, grupo IV, recebeu a primeira dose da vacina de DNA, pcDNA3.3/L2E6, no primeiro dia de experimentação e a segunda dose, aos 15 dias. A primeira dose com 5 μ g de vetor pcDNA3.3/L2E6, enquanto que a segunda dose foi composta por 5 μ g do vetor vacinal. Esses animais ainda receberam uma terceira dose vacinal de 5 μ g aos 28 dias experimentais. Ambas as doses foram diluídas em solução PBS.

Já os animais do segundo grupo experimental, grupo V, receberam a primeira dose da vacina de DNA contendo 5 μ g de pcDNA3.3/L2E6 no primeiro dia experimental, ou seja, 1 dia após receberem as células tumorais, e a segunda dose 10 dias após a primeira contendo 5 μ g.

Os animais foram acompanhados diariamente e a região apalpada para verificar o crescimento tumoral. Se detectados, os tumores seriam medidos manualmente com auxílio de um paquímetro digital a cada 2 dias, ou até que os tumores atingissem aproximadamente 20 mm de diâmetro, quando os animais seriam eutanasiados.

Pequenas alíquotas de sangue foram retiradas nos dias 0, 21, 28 e 49 para obtenção de soro e armazenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento do uso.

Os baços dos animais que fizeram parte dos grupos testados para a ação terapêutica da vacina de DNA, grupo III, IV e V, foram coletados em ambiente estéril, lavados 2 vezes em solução PBS estéril e cultivados conforme descrito abaixo.

4.15 Cultura de esplenócitos

O baço retirado de cada animal, após dupla lavagem em solução PBS estéril, foi macerado contra um pedaço de gaze estéril com auxílio de um embolo de seringa em uma placa de Petri. Sobre o macerado foi adicionado 3 mL de meio de cultura RPMI suplementado com 10% de soro bovino fetal (R10). As células foram coletadas em um tubo cônico estéril e centrifugado a 12.000 rpm por 5 minutos.

Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as hemácias foram lisadas acrescentando 500 µL de água destilada estéril, homogeneizada rapidamente e acrescido mais 500 µL de solução PBS duas vezes concentrada e estéril, homogeneizando bem. Após nova centrifugação a 1.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi novamente descartado e o pellet ressuspenso com 1 mL de meio R10.

As células viáveis do baço foram contadas com auxílio do corante azul de trypan em solução a 0,4% em PBS em câmara de Neubauer.

As células foram distribuídas em triplicata em uma placa de cultura de 12 poços a uma concentração de 10^6 células/mL, sendo o volume completado com 1 mL de meio R10. Em cada poço foi adicionado 10 µL do peptídeo sintético PEP1 (E6), descrito anteriormente. Em seguida, as placas contendo os esplenócitos e PEP1 foram incubadas por 48 horas a 37 °C e 5% de CO₂, em ambiente úmido. Após esse período, o sobrenadante da cultura foi recuperado e armazenado a -80 °C até o momento das análises de dosagem de citocinas, descritas abaixo.

4.16 Ensaio de detecção de citocinas

A partir de alíquotas de soro coletado dos animais em experimentação e do sobrenadante da cultura de esplenócitos foram realizadas dosagens de citocinas solúveis com auxílio do kit BD CBA Mouse Th1/Th2 Cytokine (BD™ Biosciences, EUA) conforme especificações do fabricante.

Resumidamente, as amostras foram separadas por grupos e datas experimentais, sendo analisadas em *pools* apenas as amostras de soro coletadas nos dias 0, 28 e 49, assim como as amostras do sobrenadante da cultura dos esplenócitos. As amostras foram incubadas com beads revestidas por anticorpos específicos contra 5 diferentes tipos de citocinas (IL-2, IL-4, IL-5, INF-γ e TNF), junto ao reagente de detecção conjugado a proteína fluorescente PE (Ficoeritrina) e incubados por 2 horas a temperatura ambiente, protegido da incidência luminosa.

Em seguida, as beads foram lavadas com tampão de lavagem (componente do kit) e ressuspenso em 300 µL de tampão de lavagem, sendo então analisados em citômetro de

fluxo, BD FACSCanto II (BD™ Biosciences). Os dados foram analisados utilizando o software FCAP Array versão 3.0 (BD™ Biosciences).

4.17 ELISA indireto

Para análise da indução de resposta imune humoral pela vacina pcDNA3.3/L2E6 foram realizados ensaios de ELISA (Enzymed-Linked ImmunoSorbent Assay), onde as placas de fundo chato com alta capacidade de adesão (Sarstedt, Numbrecht, Alemanha) foram sensibilizadas com 0,6 mg/mL de PEP1 ou 0,3 mg/mL de PEP2 em tampão carbonato-bicarbonato (Na_2CO_3 0,2 M, NaHCO_3 0,2 M, pH 9,6) e incubado por 18 horas a 4 °C. No dia seguinte, o antígeno foi recuperado e a placa lavada 3 vezes com PBST. Em seguida, foram adicionados 150 μL de solução PBST + 5% leite em pó desnatado para o bloqueio das ligações inespecíficas e incubado por 1 hora a temperatura ambiente. A placa foi lavada novamente 3 vezes com PBST e em cada poço foram distribuídas as amostras de soro coletados dos animais nos dias 0, 28 e 49, diluídas 1:100 em solução PBST + 1% de leite em pó desnatado. Os anticorpos primários foram incubados por 2 horas a temperatura ambiente. Após esse período, as amostras foram descartadas e a placa lavada por mais 3 vezes com solução PBST. Aos poços então foram adicionados 100 μL do anticorpo secundário, anti-IgG de camundongo produzido em carneiro conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich), diluído a 1:250 em solução PBST + 1% de leite em pó desnatado e incubados por 1 hora e 30 minutos a temperatura ambiente. A placa foi lavada novamente 3 vezes com solução PBST e 1 vez com PBS. Por fim, cada poço recebeu 100 μL de solução reveladora ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ 0,05M, Na_2HPO_4 0,05M, pH 5) em que foi diluído um tablete de OPD (o-phenylenediamine dihydrochloride, Invitrogen) contendo 5 mg e adicionado 12 μL de H_2O_2 a 30%. Incubada por 15 minutos a temperatura ambiente em local protegido da incidência direta de luz. Então, cada poço recebeu 50 μL de solução H_2SO_4 a 2,5 M para paralisar a reação. A placa seguiu para leitura em Leitor MultiSkan EX (LabSystems) a 492 nm.

As amostras foram testadas em triplicata. E as análises dos resultados foram realizados calculando-se o ponto de corte (“cut off”) pela média das amostras negativas acrescida de 3 vezes o valor do desvio padrão (s) dessas amostras, sendo acrescido mais 10% do valor final. O número de desvio padrão utilizado na fórmula garante o nível de confiança do resultado (SANTURIO et al., 2006; SOARES, 2001).

$$\text{Ponto de corte} = \text{média} + 3x \text{ s} + 10\%$$

Todos os pontos obtidos acima desse ponto de corte foram considerados como sendo amostras positivas (BIOREBA, 2011).

4.18 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software GraphPad Prism[®] (GraphPad Software, Inc.). Para as análises estatísticas realizadas sobre os dados obtidos em experimento com animais, peso dos animais e volume dos tumores, foram utilizados os teste t de Student ($p = 0,05\%$). Já nos ensaios de detecção de citocinas foi utilizado o teste paramétrico ANOVA ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Análises de bioinformática da sequência L2E6

A partir da sequência de DNA codificadora para a proteína L2E6 definida, análises *in silico* foram realizadas para melhor entendimento do produto a ser gerado e das características da proteína para auxiliar no desenvolvimento do presente estudo.

Diversos softwares e sites “online” para análises proteômicas surgiram nos últimos anos, baseados em algoritmos que predizem características das proteínas a partir de suas sequências de DNA ou de aminoácidos. Um dos sites mais utilizados e descritos na literatura capaz de prever características físico-químicas das proteínas é o Protein Calculator, que estima massa molecular, pH, pI e realiza a contagem dos resíduos de aminoácidos. Foram consultados diversos sites referências e os dados foram analisados e compilados abaixo (Tabela 2), onde a sequência definida QLYKTCKQAGTCPPDIIPKVGGSYDFAFRDL com 32 resíduos de aminoácidos apresentou as seguintes características:

Tabela 2 – Propriedades físico-químicas da proteína L2E6 desenhada no presente estudo, segundo site Protein Calculator.

Propriedades físico-químicas	
Massa molecular	Aproximadamente 3,5 KDa
pI	7,98
Carga estimada em pH 7,0	0,9

Utilizando outros sites de predição de possíveis alterações pós-traducionais, foram analisados diversos parâmetros através do site do “Center for Biological Sequence Analysis” – CBS - da Universidade Técnica da Dinamarca.

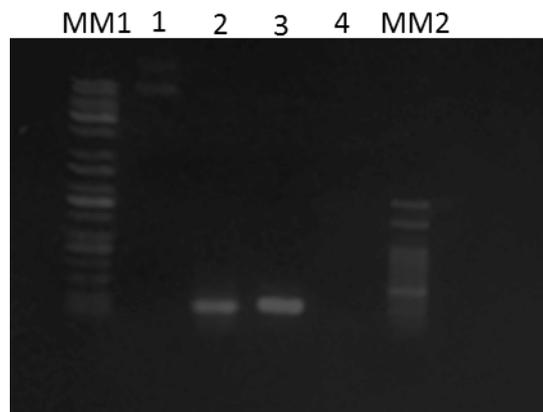
As análises demonstraram que a proteína L2E6 desenvolvida apresenta sítios de predição para acetilação, fosforilação, sítios ricos em leucina indicando sinais de exportação para o núcleo e um sítio de clivagem entre os resíduos de aminoácido 23 e 24 gerando um peptídeo sinal com possível sinalização de exportação dessa proteína para a região transmembrana. Além da presença de dois resíduos de aminoácido cisteína, o que pode levar à formação de ligações dissulfeto com modificações pós-traducionais, gerando possíveis alterações na conformação e estabilidade da proteína.

5.2 Seleção das colônias bacterianas

Após os ensaios de transformação bacteriana para amplificação dos vetores, as colônias bacterianas foram submetidas à PCR da colônia para seleção dos clones positivos.

Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose e submetidos a eletroforese, conforme observado abaixo (Figura 10).

Figura 10 - Fotodocumentação do gel de agarose submetido a eletroforese para seleção das colônias contendo o vetor pcDNA3.3/L2E6.



Fotodocumentação do gel de eletroforese em agarose 0,8% para seleção das colônias bacterianas após transformação com o vetor pcDNA3.3/L2E6. Onde (MM1) representa o marcador universal e (MM2) o marcador 50 pb DNA Ladder. Em (1) temos uma amostra do plasmídeo íntegro pcDNA3.3/L2E6, em (2) e (3) produtos de PCRs das colônias bacterianas transformadas por pcDNA3.3/L2E6 e (4) produto da PCR de uma colônia não transformada.

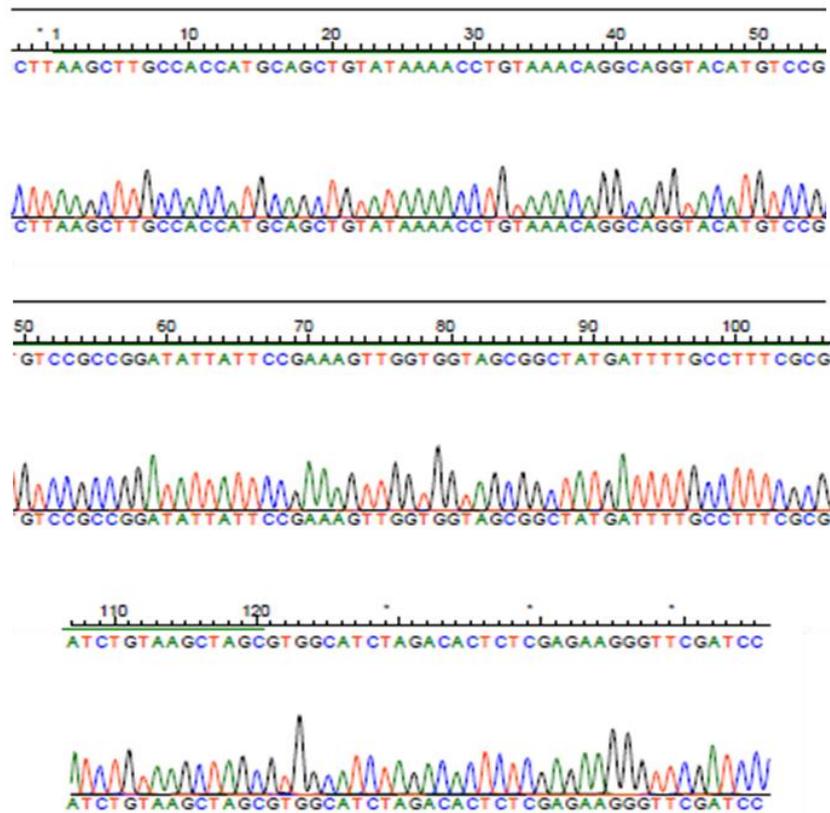
Assim, a colônia apresentada na coluna 3 (Figura 10) foi selecionada para amplificação da colônia de bactérias e em seguida para a purificação do DNA plasmideal.

O DNA plasmideal recuperado foi quantificado por espectrofotometria, resultando em uma média de 150 ng/ μ L por amostra.

5.3 Sequenciamento de DNA

O DNA plasmideal recuperado e quantificado conforme descrito anteriormente confirmou a correta formação e sequência do gene *L2E6* desenvolvido no presente trabalho (Figura 11).

Figura 11- Eletroferograma do fragmento recuperado da reação de PCR da colônia bacteriana transformada por pcDNA3.3/L2E6.



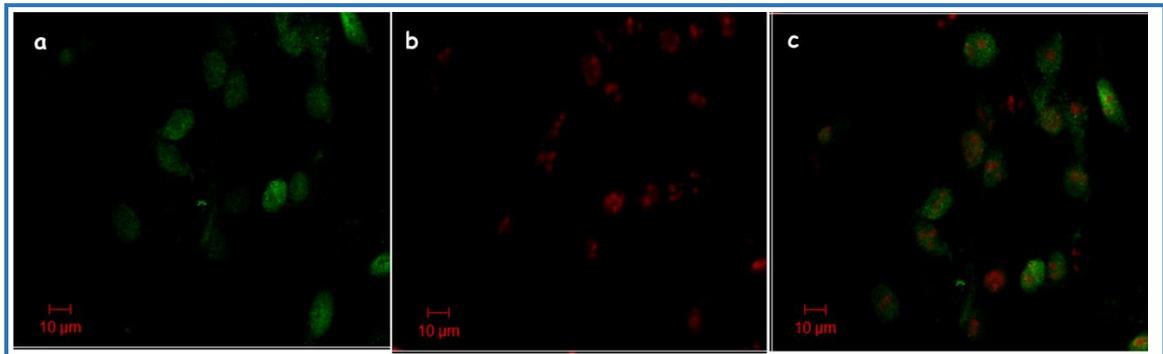
Alinhamento da sequência L2E6 inserido no vetor pcDNA3.3/L2E6 utilizado na transformação bacteriana para amplificação do vetor vacinal.

5.4 Expressão das proteínas recombinantes

Para avaliar a expressão intracelular da proteína recombinante fusionada L2E6, foram realizados ensaios em células HEK293T (Figura 12) e 293F (Figura 13).

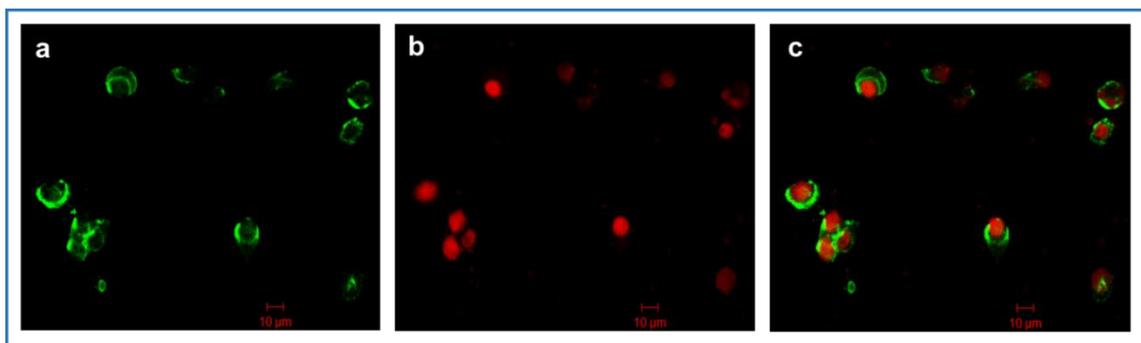
Através de ensaios de imunofluorescência indireta foi possível evidenciar a expressão da proteína recombinante, sendo reconhecidas pelo anticorpo monoclonal específico anti-L2 comerciais. Apresentaram-se em formas de pontos distribuídos por toda célula, como observado nas figuras abaixo.

Figura 12 - Células HEK293T expressando a proteína L2.



Ensaio de imunofluorescência indireta de células HEK 293T transfectadas com o vetor pcDNA3.3/L2E6 expressando a proteína L2 recombinante (verde - a), o núcleo celular foi evidenciado por PI (vermelho - b) e em (c) a sobreposição das imagens (a) e (b).

Figura 13 - Expressão de L2E6 em células 293F.



Expressão de L2E6 (verde - a) em células 293F transfectadas por pcDNA3.3/L2E6 em ensaio de imunofluorescência indireta. Em (b) é possível observar o núcleo celular evidenciado pelo reagente PI (vermelho). Em (c) a sobreposição da imagem (a) e (b).

5.5 Análise da expressão da proteína recombinante

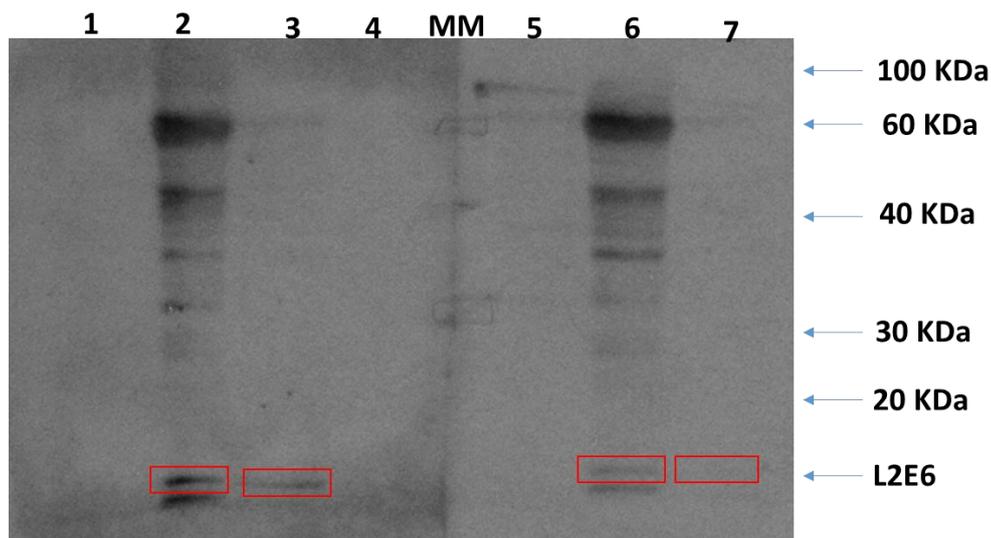
Após a transfecção de células 293F com o vetor pcDNA3.3/L2E6, as células foram coletadas e lisadas conforme descrito anteriormente. O lisado celular foi analisado em Tricina-SDS-PAGE a 16%. A massa molecular teórica da proteína recombinante L2E6 produzida seria de aproximadamente 3,5 KDa. A comparação do perfil de corrida das amostras do lisado celular de células não transfectadas e transfectadas revelou a presença de uma proteína de baixíssima massa molecular, abaixo de 8 KDa, presente somente nas amostras transfectadas, sugerindo tratar-se da proteína recombinante L2E6 (dado não mostrado).

Adicionalmente, ensaios de *Western blotting* foram realizados para confirmar a expressão das proteínas recombinantes e o reconhecimento dessas proteínas por anticorpos

monoclonais comerciais específicos anti-L2 e anti-E6, para confirmar a identidade da proteína expressa.

Os resultados obtidos revelaram que ambos anticorpos monoclonais, anti-L2 e anti-E6, reconheceram uma proteína de aproximadamente 3,5 KDa, sugerindo a confirmação da identidade da proteína de interesse (Figura 14).

Figura 14 – Detecção de L2E6 através de ensaio de Western blotting.



Fotodocumentação do resultado obtido do ensaio de *Western blotting* utilizado para detecção e caracterização da proteína recombinante L2E6, onde as amostras (1) e (5) são alíquotas de lisado de células não transfectadas, (2) e (6) lisado de células transfectadas e expressando L2E6, (3) e (7) eluídos intermediários obtidos do ensaio de cromatografia por gel filtração e interagindo com os anticorpos monoclonais específicos anti-L2 (3) e anti-E6 (7), demonstrando a presença de uma proteína de baixo peso molecular sendo reconhecida por ambos anticorpos comerciais, (4) amostra de eluição final do processo de gel filtração. (MM) marcador molecular Color BurstTM.

5.6 Ensaios *in vivo*

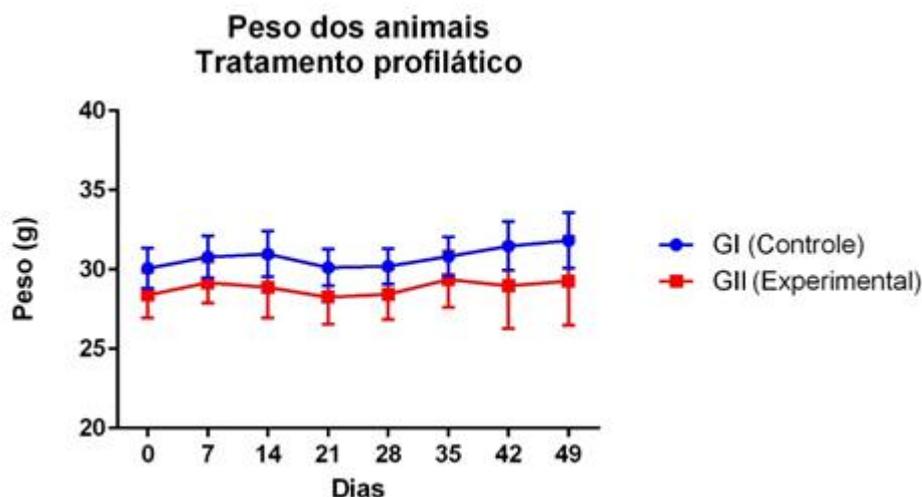
Na primeira etapa do presente trabalho foram realizados experimentos para análise do uso do vetor como uma vacina de DNA em modelo murino. Como descrito no tópico anterior, os animais foram separados em 4 grupos experimentais, sendo avaliados quanto à possibilidade de indução de proteção profilática e terapêutica ao desafio com células tumorais TC-1.

5.6.1 Avaliação profilática

A partir da pesagem semanal dos animais foi possível observar que o mesmo se manteve constante durante todo o experimento, sendo possível observar uma pequena diferença de peso entre os animais do grupo experimental e controle, que recebeu apenas PBS, desde o dia 0 (zero) experimental, porém tal diferença não é estatisticamente

significante, segundo teste t de Student, sugerindo que a vacina de DNA não interferiu no ganho ou perda de peso dos animais, como pode ser observado abaixo (Figura 15).

Figura 15 - Gráfico de pesagem dos animais no ensaio de avaliação profilática da vacina de DNA.



Não houve alteração de peso dos animais ao longo do estudo, sugerindo que o uso da vacina de DNA aparentemente não influenciou no desenvolvimento dos animais.

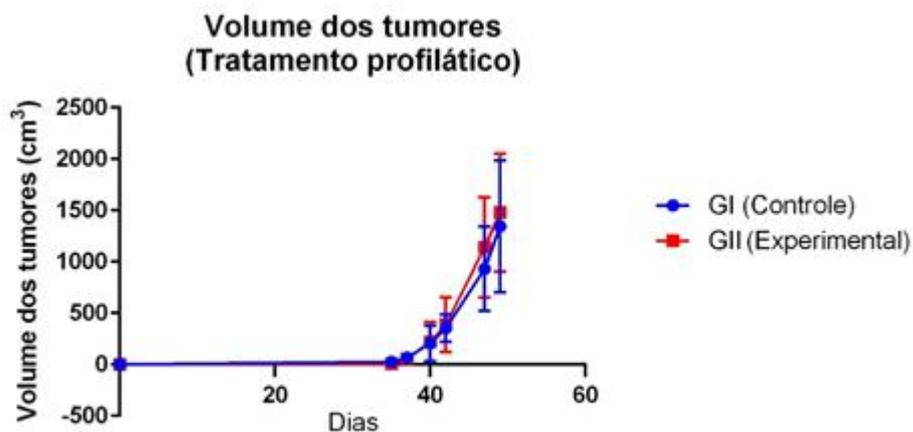
Uma semana após a aplicação das 3 doses da vacina de DNA proposta no presente estudo, os animais foram desafiados com as células tumorais TC-1 para avaliar se houve indução de resposta imune protetora e sua capacidade de proteção profilática, no desenvolvimento tumoral de células HPV-positivas. A partir do momento em que os tumores se estabeleceram e se tornaram palpáveis, foram medidos a cada 2 dias e os dados analisados.

Foi possível observar aumento progressivo do volume tumoral ao longo do experimento, demonstrando que a implantação das células TC-1 foi bem sucedida com o desenvolvimento esperado de tumores HPV-positivos. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os animais de um mesmo grupo, assim como não foi possível observar diferença no volume tumoral dos animais entre os grupos experimental e controle (Figura 16), sugerindo que a vacina de DNA usada profilaticamente não induziu resposta imune capaz de impedir ou controlar o desenvolvimento tumoral.

Entretanto, tal resultado era esperado, visto que a capacidade profilática da vacina em desenvolvimento se limitaria na capacidade de induzir a produção de anticorpos específicos anti-L2 capazes de neutralizar a entrada de partículas virais e impedir a infecção das células por HPV.

A presença do epítopo de proteína E6 presente na construção vacinal não foi suficiente para combater o desenvolvimento das células tumorais, não demonstrando capacidade de induzir resposta imune profilática contra o estabelecimento das células TC-1 nos camundongos estudados. Tal resposta pode ser sugerida para ausência de expressão de proteínas E6 na superfície das células TC-1, sendo intracelulares e, portanto, de difícil acesso aos componentes do sistema imune.

Figura 16 - Volume dos tumores de células TC-1 nos animais imunizados previamente com a vacina de DNA.



Utilizando a média dos volumes tumorais, não houve diferença estatisticamente significativa entre os animais que receberam ou não a vacina de DNA.

5.6.2 Avaliação terapêutica

Durante todo o procedimento experimental os animais foram pesados semanalmente para acompanhamento de seu desenvolvimento e de possíveis alterações induzidas pela aplicação das vacinas de DNA.

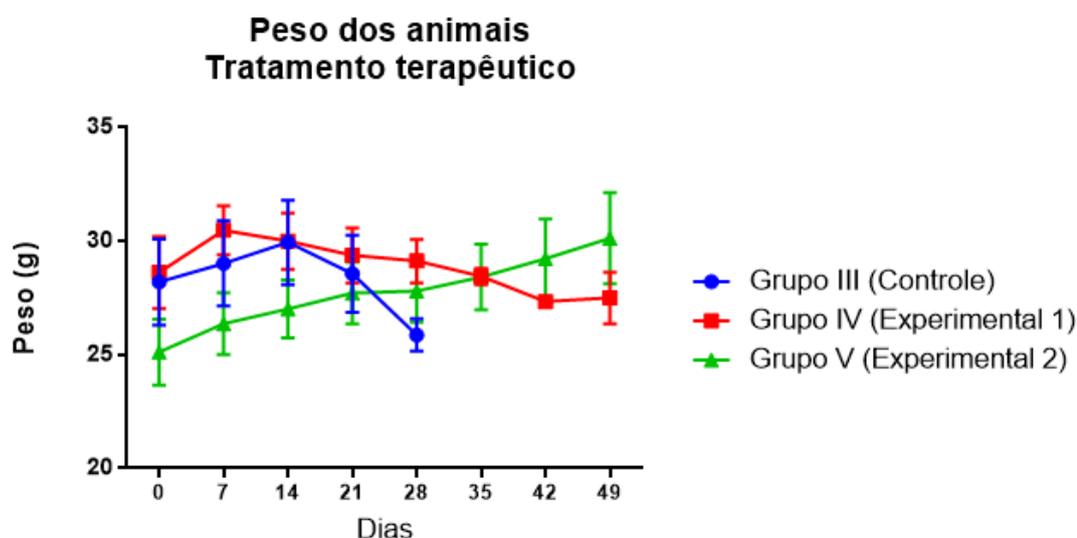
As células TC-1 quando aplicadas pela via subcutânea têm a capacidade de se estabelecer e formar tumores sólidos e não invasivos, porém seu crescimento é rápido e capaz de induzir a formação de feridas externas na pele dos animais. Assim, após aplicação das células tumorais, os animais foram monitorados quanto ao desenvolvimento tumoral, sendo que quando os mesmos induziram formação de feridas expostas ou quando o maior diâmetro da massa tumoral atingiu 200 mm, os animais foram eutanasiados.

Dessa maneira, todos os animais do grupo controle, grupo III, que receberam as células tumorais e não receberam a vacina de DNA, recebendo apenas o vetor vazio, foram eutanasiados no vigésimo oitavo dia experimental.

Assim, no grupo dos animais que receberam as células tumorais e o tratamento com o vetor vazio, foi possível observar que a implantação tumoral induziu a perda de peso nos animais desde o sétimo dia após a inoculação das células neoplásicas TC-1, porém essa diferença de peso não é estatisticamente significativa. Apenas no vigésimo oitavo dia experimental foi possível observar uma grande diminuição no peso dos animais, sendo estatisticamente significativa quando comparadas às pesagens anteriores ($p > 0,0001$). Dentro do mesmo grupo, não houve diferença significativa no peso dos animais, como pode ser observado abaixo (Figura 17).

Os animais que receberam as células tumorais e a vacina pcDNA3.3/L2E6 não demonstraram perda significativa de peso durante todo o experimento, inclusive o grupo que recebeu as vacinas em períodos menores entre as doses, grupo V, o crescimento dos animais foi contínuo ao longo de todo o experimento.

Figura 17 – Gráfico do peso dos animais do estudo terapêutico da vacina de DNA.



A pesagem semanal dos animais revelou a ação debilitante das células tumorais, induzindo à perda de peso, enquanto os animais submetidos ao tratamento com a vacina de pcDNA3.3/L2E6 não apresentaram perda de peso, inclusive os animais do grupo III continuaram aumentando.

A partir do décimo dia após inoculação das células TC-1 já foi possível detectar a presença de massa tumoral palpável, porém ainda não mensuráveis em todos os animais do grupo III, que receberam a vacina contendo o vetor vazio. Entretanto, com o crescimento rápido dos tumores, após 2 dias foram iniciadas as medições dos diâmetros tumorais, seguidas de medições a cada 2 dias.

Os dados obtidos demonstraram um rápido crescimento tumoral, com volumes tumorais semelhantes entre os animais do mesmo grupo.

Nos animais do grupo IV, que receberam 3 doses da vacina pcDNA3.3/L2E6 em intervalos de 15 dias, 3 animais do grupo desenvolveram tumores sólidos a partir do 12 dia experimental. Com o desenvolvimento rápido dos tumores, esses 3 animais foram eutanasiados no vigésimo oitavo dia experimental. Os demais 7 animais do grupo não desenvolveram tumores ao longo de todo o período analisado.

Dos animais do grupo V, que receberam apenas 2 doses da vacina pcDNA3.3/L2E6 em intervalos de 10 dias, 8 deles não desenvolveram qualquer tumor associado à aplicação das células TC-1, sendo mantidos por todo o período experimental. Dois animais desse grupo apresentaram desenvolvimento tumoral, porém de volumes bem menores quando comparados aos animais dos demais grupos (III e IV). Como pode ser observado abaixo (Tabela 3).

Tabela 3 – Média final dos volumes tumorais.

Grupos	Média do volume final dos tumores (cm³)
I – Avaliação profilática, grupo controle	4,16 (±1,40)
II – Avaliação profilática, grupo vacinado	3,64 (±2,29)
III-Avaliação terapêutica, grupo controle	1,64 (±0,39)
IV – Avaliação terapêutica, grupo vacinado, doses em 15 dias	1,09 (±1,01)
V – Avaliação terapêutica, grupo vacinado, doses em 10 dias	0,67 (±0,24)

Média do volume dos tumores dos animais no último dia experimental (49 dias).

Entre os grupos a diferença dos volumes tumorais foi estatisticamente significativa ($p < 0,0001$), imediatamente após a imunização da segunda dose da vacina de DNA, sugerindo que a mesma induziu uma resposta imune suficientemente capaz de conter o crescimento tumoral nos animais do grupo IV. Com o passar do tempo, essa diferença no volume tumoral entre os grupos III e IV se tornou mais evidente, como pode ser observado abaixo (Figura 18).

Os volumes tumorais dos animais do grupo que recebeu a vacina de DNA, grupo IV, permaneceram aumentados, embora apenas levemente, sugerindo a estabilidade até 14 dias após a última dose, quando as medidas voltaram a demonstrar um pequeno aumento, porém não estatisticamente significativo.

Já os animais do grupo V, aqueles que apresentaram a formação das massas tumorais, essas foram crescendo em um ritmo bem lento, quando comparado aos demais animais que

apresentaram desenvolvimento de tumores. E o volume final atingido por esses tumores foi bem menor quando comparado aos demais animais.

Figura 18 – Volumes tumorais mediante o tratamento com a vacina de DNA.

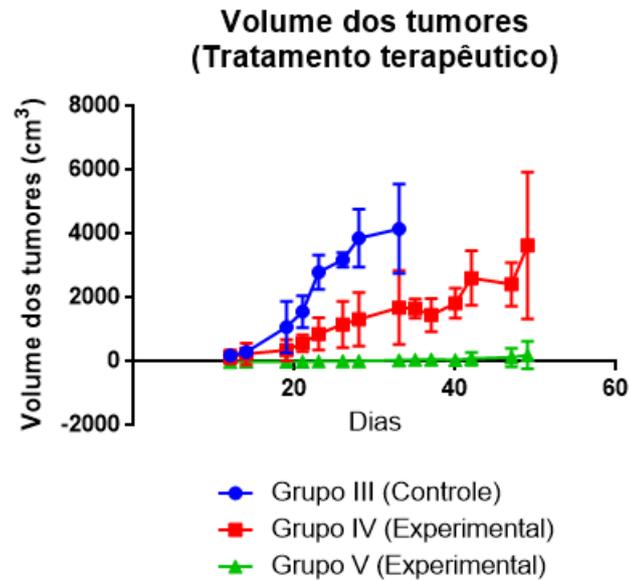


Gráfico de volumes tumorais por dia, onde é possível observar o crescimento rápido e constante dos tumores implantados nos animais do grupo controle, que receberam as células tumorais, mas não as vacinas de DNA, enquanto aqueles que receberam a vacina, tiveram o aumento do volume tumoral contido por até 14 dias após a última dose. Após esse período, os tumores voltaram a crescer, porém não estatisticamente significante.

5.7 Análise da produção de citocinas

A partir dos soros obtidos dos animais utilizados nos experimentos, ensaios de detecção e dosagem de citocinas foram realizados na tentativa de traçar um perfil de resposta imune induzida pela vacina de DNA.

Um *pool* de amostras de soro dos dias 0, 28 e 49 foram separados por grupos e com auxílio do kit BD CBA Mouse Th1/Th2 Cytokine. Em todas as amostras testadas foi possível detectar a presença das citocinas analisadas, entretanto os resultados obtidos para as citocinas IFN, IL-2, IL-4 e IL-5, as concentrações encontradas foram baixas e não foi possível observar diferenças nas concentrações das amostras coletadas antes e depois dos tratamentos, como pode ser observado abaixo (Tabela 4).

A análise estatística através do teste não paramétrico de ANOVA revelou que não houve diferença significativa nas concentrações de TNF detectadas entre os grupos controle e experimental ($p < 0,05$).

Tabela 4 – Níveis de citocinas detectadas em amostras de soro.

Grupos	IFN (pg/mL)		IL-2 (pg/mL)		IL-4 (pg/mL)		IL-5 (pg/mL)	
	Dia 0	Dia 49						
Grupo I (Profilático – Controle)	N/D [#]							
Grupo II (Profilático – Experimental)	N/D [#]							
Grupo III (Terapêutico – Controle)	16,53	11,02	10,65	9,10	11,61	8,00	13,77	9,11
Grupo IV (Terapêutico – Experimental 1)	15,13	16,23	9,96	10,81	10,79	11,45	13,85	13,70
Grupo V (Terapêutico – Experimental 2)	17,03	17,64	11,14	11,18	11,77	11,12	13,92	15,35

[#]Onde N/D representa as amostras onde as citocinas não foram detectadas. Não houve diferença significativa entre os dados.

Porém, nas análises de TNF (fator de necrose tumoral) das amostras de soro foi possível observar o aumento expressivo nas concentrações dessa citocina no último dia experimental, 49, como pode ser observado abaixo (Tabela 5).

Tabela 5 - Níveis de TNF detectados no soro dos animais estudados.

Grupos	Dosagem de TNF (pg/mL)		
	Dia 0	Dia 28	Dia 49
I – Avaliação profilática, grupo controle	7,06	4,44	5,80
II – Avaliação profilática, grupo vacinado	4,80	5,02	4,80
III-Avaliação terapêutica, grupo controle	4,44	6,02	-
IV – Avaliação terapêutica, grupo vacinado, doses em 15 dias	5,95	7,52	12,33*
V – Avaliação terapêutica, grupo vacinado, doses em 10 dias	5,08	7,17	5,12

* Resultado estatisticamente significativo quando comparado às concentrações de TNF das amostras do dia 0, analisados dentro do mesmo grupo ($p < 0,05$).

As mesmas análises de detecção de citocinas também foram realizadas com as amostras do sobrenadante de cultura de esplenócitos, quando incubados com alíquotas do peptídeo sintético PEP1 (E6). Os níveis de IFN, IL-2, IL-4 e IL-5 não foram detectados, pois as concentrações encontradas estavam todas fora da curva de concentração padrão. Entretanto, níveis elevados de TNF foram detectados nas amostras dos animais dos grupos IV e V, como pode ser observado na tabela 6 (abaixo).

Tabela 6 – Níveis de TNF detectados no sobrenadante da cultura de esplenócitos.

Grupos	Dosagem de TNF (pg/mL)
III – Avaliação terapêutica, grupo controle	42,02
IV – Avaliação terapêutica, grupo experimental, doses em 15 dias	85,31*
V – Avaliação terapêutica, grupo experimental, doses em 10 dias	97,40*

* Resultado estatisticamente significativo quando comparado às concentrações de TNF das amostras do grupo controle ($p < 0,05$).

5.8 Análise da produção de anticorpos específicos

As amostras de soro coletados de todos os animais e grupos foram analisados em ensaios de ELISA indireto para demonstrar a ocorrência de indução de resposta imune humoral induzida pela vacina pcDNA3.3/L2E6 com a produção de anticorpos específicos anti-L2 ou anti-E6.

As amostras foram testadas em triplicata e seus resultados foram analisados conforme descrito anteriormente.

Os dados obtidos demonstraram que nas amostras do dia 0 não foram detectados anticorpos anti-L2 ou anti-E6 em nenhum dos animais, conforme esperado. Mas, nas amostras dos dias 28 já foi possível detectar a presença dos anticorpos específicos em níveis elevados, entretanto o pico de reatividade foi encontrado no dia 49 e a presença de ambos os anticorpos específicos, anti-L2 (Figura 19) e anti-E6 (Figura 20) foi então nitidamente confirmada.

Os animais do grupo IV que desenvolveram tumores foram os mesmo que demonstraram menor capacidade de produção dos anticorpos anti-L2 e anti-E6, recebendo os números 5, 6, 7 e 9.

Já os 2 animais do grupo V que desenvolveram tumores sólidos também tiveram os menores níveis de produção de anticorpos anti-L2 e anti-E6, sendo os animais enumerados como 4 e 5.

Os dados dos animais que não aparecem nas figuras abaixo representam aqueles que tiveram um maior desenvolvimento tumoral, não resistindo até os 49 dias experimentais, sendo eutanasiados ao atingirem os parâmetros citados anteriormente.

Figura 19 – Ensaio de detecção de anticorpos anti-L2 por ELISA.

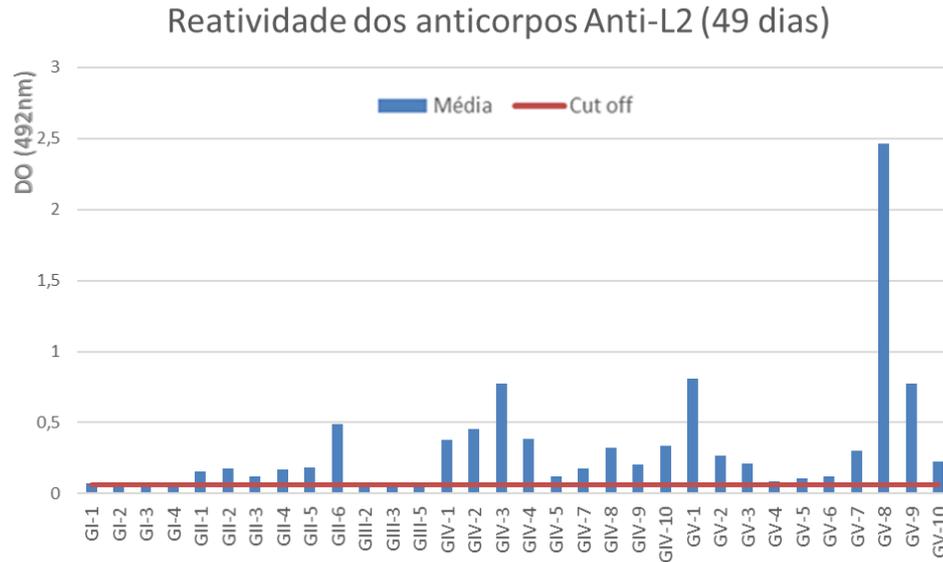


Gráfico da reatividade das amostras de soro obtido dos animais no último dia experimental (49 dias) demonstrando que todos os animais imunizados com a vacina pcDNA3.3/L2E6 produziram anticorpos anti-L2 específicos detectados por ensaio de ELISA (Cut off = 0,0636).

Os dados dos animais dos grupos controle I e III contidos no gráfico são de amostras coletadas no vigésimo oitavo dia experimental, quando esses animais foram eutanasiados devido às grandes proporções dos tumores desenvolvidos.

Figura 20 – Ensaio de detecção de anticorpos anti-E6 por ELISA.

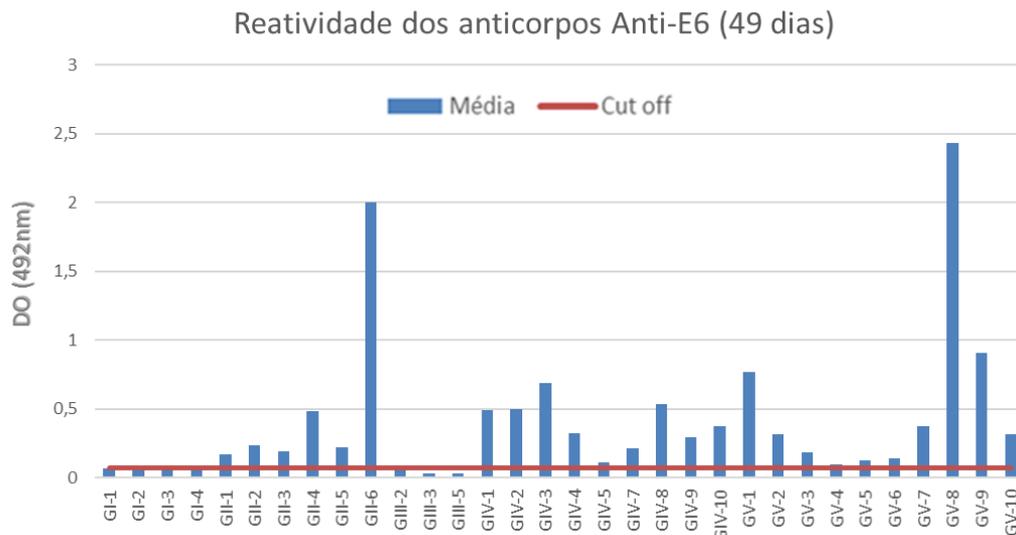


Gráfico das amostras de soro obtido dos animais no último dia experimental (49 dias) demonstrando a reatividade dos anticorpos anti-E6 que todos os animais imunizados com a vacina pcDNA3.3/L2E6 produziram aos 49 dias experimentais, detectados por ensaio de ELISA (Cut off = 0,0675).

6 DISCUSSÃO

Apesar da eficácia relatada das vacinas profiláticas licenciadas contra o HPV e do uso potencial em programas de vacinação em todo o mundo (CIANCIARULLO, 2014), importantes pesquisadores e empresas farmacêuticas continuam concentrados no desenvolvimento de vacinas alternativas, denominadas por vacinas de nova geração.

A ausência de um tratamento específico contra a infecção já existente, lesões e carcinomas causados por HPV também motivam a busca por novas estratégias capazes de combater os danos ocasionados pelo vírus.

No presente trabalho foi possível demonstrar a expressão da proteína recombinante L2E6 em células HEK293T e 293F. A proteína expressa foi encontrada no interior das células e distribuída por todo o citoplasma em grandes concentrações e na grande maioria das células transfectadas, demonstrando uma elevada taxa de transfecção em ambos os métodos utilizados.

Ensaio de *Western blotting* demonstraram o reconhecimento da proteína recombinante por anticorpos monoclonais anti-L2 e anti-E6. Entretanto, os níveis da proteína L2E6 demonstrados nesses ensaios foram muito baixos. Diversos estudos descrevem a dificuldade de se trabalhar especificamente com a proteína E6 pela sua instabilidade, insolubilidade e possíveis modificações pós-traducionais a que está susceptível (NOMINE et al., 2006; NOMINE et al., 2001).

Apesar da proteína L2E6 conter apenas um epítipo de E6, esse fragmento possui a região que caracteriza a proteína E6, o motivo CXXC que pode induzir a formação de 2 “zinc fingers” o que daria uma conformação secundária mais complexa à proteína. Além disso, a presença de 2 aminoácidos cisteína poderia contribuir para a formação de agregação entre as proteínas, formando “doublets”. Assim, novos ensaios são necessários para melhor caracterização da proteína recombinante obtida.

Como o vetor construído também pode ser utilizado como vetor vacinal, ensaios *in vivo* foram realizados para verificar a eficácia e especificidade da construção como uma possível vacina de DNA.

Quando a vacina de DNA proposta no presente estudo foi administrada anteriormente à implantação do tumor, não houve alteração no desenvolvimento da neoplasia observada pelo contínuo aumento de seu volume, sugerindo que a resposta imune induzida foi ineficiente na prevenção da implantação tumoral. Porém, tal resultado era esperado, pois a estratégia profilática da vacina proposta tem como base a inibição da infecção através do bloqueio da

interação entre a proteína L2 e as células da camada basal. Além disso, as células tumorais TC-1 apresentam apenas a expressão das oncoproteínas E6 e E7 de HPV, e não L2.

Entretanto, através dos resultados dos ensaios obtidos nos testes de ELISA foi possível demonstrar que a vacina pcDNA3.3/L2E6 possui a capacidade de induzir a produção de anticorpos específicos anti-L2 e anti-E6, o que sugere que a vacina tem a capacidade profilática contra infecções causadas por HPV de diversos tipos. Altas taxas de anticorpos anti-L2 foram encontradas ao longo de todo o experimento, mas as concentrações mais altas foram encontradas no último dia experimental, ou seja, 49 dias após o início dos experimentos, indicando que a produção desses anticorpos específicos seja duradoura, com possível indução de células B de memória.

Quanto ao efeito terapêutico da vacina pcDNA3.3/L2E6, os resultados obtidos demonstraram que a vacina, quando administrada após a implantação do tumor, apresenta a capacidade de inibir o crescimento de tumores que expressam E6 e E7 de HPV16.

Dos 2 modelos analisados, 2 doses parecem ser suficientes para indução de uma resposta imune celular eficiente na contenção do desenvolvimento tumoral.

O grande achado do presente trabalho foi demonstrar que pequenas concentrações da vacina pcDNA3.3/L2E6, 5 a 10 µg/dose são satisfatórias para conter o desenvolvimento tumoral, pois diversos estudos utilizam concentrações em torno de 100 µg/dose. A menor concentração de vacina pcDNA3.3/L2E6 necessária por dose demonstra sua grande eficiência, além de contribuir para a diminuição dos custos da produção em maior escala.

Outro aspecto interessante levantado pelo trabalho é que os 2 únicos animais do grupo experimental V, que receberam 2 doses da vacina pcDNA3.3/L2E6 em intervalos de 10 dias tiveram desenvolvimento tumoral, embora em menores proporções, já apresentavam problemas anteriores ao tratamento, pois tinham um peso menor quando comparados aos demais animais do mesmo grupo, sendo que um desses animais apresentava a cauda partida, o que sobrecarregou seu próprio sistema imune. A escolha por manter esses animais no grupo experimental foi realmente para dar maior amplitude de interpretações sobre a ação da vacina nos indivíduos analisados, o que representaria de forma mais ampla a população à qual a vacina se destina, uma população heterogênea.

Mesmo nos animais testados para o modelo terapêutico, estes produziram altas taxas de anticorpos específicos anti-L2 e anti-E6, caracterizando a capacidade da vacina de induzir as respostas imune celular e humoral.

Os dados obtidos nas análises de detecção de citocinas demonstraram a presença de níveis elevados de TNF, detectados no soro dos animais no último dia experimental e em

amostras do sobrenadante da cultura de esplenócitos, sugerindo que a presença do TNF contribuiu para o controle do crescimento tumoral.

Diversos trabalhos evidenciam que um mecanismo imune efetor contra células infectadas por HPV incluem direta ou indireta participação de TNF- α , visto que apoptose e regressão espontânea de lesões, causados por HPV correlacionam com altos níveis dessa citocina em infiltrado de células mononucleares (HAGARI et al., 1995). Outros trabalhos corroboram os nossos resultados ao demonstrar a importância de TNF- α no combate ao HPV, mostrando que células derivadas de carcinoma cervical e imortalizadas são resistentes à tal citocina (VIEIRA; GOLDSTEIN; VILLA, 1996; VILLA et al., 1992).

O controle da infecção por HPV já existente é dado pela imunidade do hospedeiro. Indivíduos imunocompetentes respondem a infecções virais com a produção de diversas citocinas a partir de macrófagos, células NK (*natural killers*), linfócitos, fibroblastos e queratinócitos. Muitas dessas citocinas como TNF- α , IL-1, IFN- α , β e γ , regulam negativamente a expressão de genes *E* de HPV, retardando o crescimento das células tumorais (KIM; BLATT; TAYLOR, 2000; PAO et al., 1995).

A ausência de detecção de IFN nas amostras obtidas dos camundongos durante os ensaios de detecção de citocinas foi bastante sugestiva, pois apesar de ser reconhecidamente uma citocina que possui papel fundamental durante infecções virais, estudos demonstraram que a proteína E6 de HPVs de alto risco têm a capacidade de modular a transcrição de genes *IFR-3* (fator regulador de interferon 3), inibindo a expressão dessa citocina, permitindo a progressão da infecção viral (HASAN et al., 2007; RONCO et al., 1998), justificando a ausência dessas citocinas nos animais tratados com a vacina pcDNA3.3/L2E6.

O fato de, aparentemente, a vacina pcDNA3.3/L2E6 não ter induzido a produção de IFN nos animais vacinados pode ser um fator negativo à ação profilática da vacina, pois estudos recentes demonstraram que a presença do IFN- γ pode prevenir a entrada do HPV16 através das vias dependentes de L2 (DAY et al., 2017), o que torna este um aspecto a ser considerado à continuidade deste estudo.

7 CONCLUSÃO

Para sobreviver e propagar no hospedeiro após a infecção, os vírus desenvolveram diversas estratégias para ludibriar o sistema imune. Muitos vírus são capazes de manipular componentes importantes de vias que induzem a morte celular, podendo produzir homólogos de citocinas, quimiocinas ou de proteínas que se ligam aos seus receptores competitivamente aos respectivos ligantes celulares, prevenindo a ativação de sinais apoptóticos.

No presente estudo foi possível demonstrar a construção de um vetor de expressão vacinal capaz de induzir a expressão da proteína recombinante L2E6 no interior das células transfectadas cultivadas de forma aderente, HEK 293T, ou em suspensão, 293F.

A proteína recombinante L2E6 foi reconhecida de maneira eficiente pelo anticorpo comercial anti-L2 utilizado no presente estudo.

Além disso, vacina desenvolvida no presente trabalho, pcDNA3.3/L2E6 demonstrou ser eficiente na indução de uma resposta imune humoral duradoura, capaz de estimular a produção de anticorpos específicos anti-L2 e anti-E6, de forma crescente e ao longo de todo período experimental (49 dias), assim como de ativar a resposta imune celular, combatendo o desenvolvimento das células tumorais e induzindo a expressão de citocinas TNF.

Estudos adicionais devem ser realizados para verificar a segurança e a capacidade da vacina pcDNA3.3/L2E6 em controlar o crescimento tumoral de células HPV-positivas, assim como de induzir proteção contra futuras infecções virais por HPV através de ensaios de neutralização utilizando anticorpos produzidos nos animais imunizados.

O impacto das vacinas atualmente disponíveis contra o HPV é inegável, entretanto sua eficácia é incompleta. O desafio para o desenvolvimento de uma vacina de nova geração está na capacidade de proteger a população contra todos os tipos virais causadores de verrugas ou lesões, mas também que seja capaz de combater as lesões e tumores já existentes, a um baixo custo, possibilitando proteger e curar milhares de vidas em todo o mundo.

REFERÊNCIAS*

ACCARDI, R.; GHEIT, T. Cutaneous HPV and skin cancer. **Presse Med**, v. 43, n. 12P2, p. e435-e443, 2014.

ADELSTEIN, D. J.; RODRIGUEZ, C. P. Human papillomavirus: changing paradigms in oropharyngeal cancer. **Curr Oncol Rep**, v. 12, n. 2, p. 115-120, 2010.

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

AIRES, K. A.; CIANCIARULLO, A. M.; CARNEIRO, S. M.; VILLA, L. L.; BOCCARDO, E.; PEREZ-MARTINEZ, G.; PEREZ-ARELLANO, I.; OLIVEIRA, M. L.; HO, P. L. Production of human papillomavirus type 16 L1 virus-like particles by recombinant *Lactobacillus casei* cells. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 72, n. 1, p. 745-752, 2006.

AKIL, N.; YASMEEN, A.; KASSAB, A.; GHABREAU, L.; DARNEL, A. D.; AL MOUSTAFA, A. E. High-risk human papillomavirus infections in breast cancer in Syrian women and their association with Id-1 expression: a tissue microarray study. **Br. J. Cancer**, v. 99, n. 3, p. 404-407, 2008.

AMADOR-MOLINA, A.; HERNANDEZ-VALENCIA, J. F.; LAMOYI, E.; CONTRERAS-PAREDES, A.; LIZANO, M. Role of innate immunity against human papillomavirus (HPV) infections and effect of adjuvants in promoting specific immune response. **Viruses**, v. 5, n. 11, p. 2624-2642, 2013.

ANDERSEN, A. S.; KOLDJAER SOLLING, A. S.; OVESEN, T.; RUSAN, M. The interplay between HPV and host immunity in head and neck squamous cell carcinoma. **Int J Cancer**, v. 134, n. 12, p. 2755-2763, 2014.

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

ANG, K. K.; HARRIS, J.; WHEELER, R.; WEBER, R.; ROSENTHAL, D. I.; NGUYEN-TAN, P. F.; WESTRA, W. H.; CHUNG, C. H.; JORDAN, R. C.; LU, C.; KIM, H.; AXELROD, R.; SILVERMAN, C. C.; REDMOND, K. P.; GILLISON, M. L. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. **N Engl J Med**, v. 363, n. 1, p. 24-35, 2010.

ANTONSSON, A.; SPURR, T. P.; CHEN, A. C.; FRANCIS, G. D.; MCMILLAN, N. A.; SAUNDERS, N. A.; LAW, M.; BENNETT, I. C. High prevalence of human papillomaviruses in fresh frozen breast cancer samples. **J. Med. Virol.**, v. 83, n. 12, p. 2157-2163, 2011.

BAEK, J. O.; SEO, J. W.; KWON, O.; PARK, S. M.; KIM, C. H.; KIM, I. H. Production of human papillomavirus type 33 L1 major capsid protein and virus-like particles from *Bacillus subtilis* to develop a prophylactic vaccine against cervical cancer. **Enzyme Microb Technol**, v. 50, n. 3, p. 173-180, 2012.

BAIS, A. G.; BECKMANN, I.; LINDEMANS, J.; EWING, P. C.; MEIJER, C. J.; SNIJDERS, P. J.; HELMERHORST, T. J. A shift to a peripheral Th2-type cytokine pattern during the carcinogenesis of cervical cancer becomes manifest in CIN III lesions. **J Clin Pathol**, v. 58, n. 10, p. 1096-1100, 2005.

BASEMAN, J. G.; KOUTSKY, L. A. The epidemiology of human papillomavirus infections. **J Clin Virol**, v. 32 Suppl 1, p. S16-24, 2005.

BAUER, S.; HEEG, K.; WAGNER, H.; LIPFORD, G. B. Identification of H-2Kb binding and immunogenic peptides from human papilloma virus tumour antigens E6 and E7. **Scand J Immunol**, v. 42, n. 3, p. 317-323, 1995.

BAZAN, S. B.; DE ALENCAR MUNIZ CHAVES, A.; AIRES, K. A.; CIANCIARULLO, A. M.; GARCEA, R. L.; HO, P. L. Expression and characterization of HPV-16 L1 capsid protein in *Pichia pastoris*. **Arch. Virol.**, v. 154, n. 10, p. 1609-1617, 2009.

BERTI, F. C.; PEREIRA, A. P.; CEBINELLI, G. C.; TRUGILO, K. P.; BRAJAO DE OLIVEIRA, K. The role of interleukin 10 in human papilloma virus infection and progression to cervical carcinoma. **Cytokine Growth Factor Rev**, 2017.

BIAN, T.; WANG, Y.; LU, Z.; YE, Z.; ZHAO, L.; REN, J.; ZHANG, H.; RUAN, L.; TIAN, H. Human papillomavirus type 16 L1E7 chimeric capsomeres have prophylactic and therapeutic efficacy against papillomavirus in mice. **Mol Cancer Ther**, v. 7, n. 5, p. 1329-1335, 2008.

BIOINFORMATICS, S.-S. I. O. Viral Zone. Disponível em: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/547.html. Acesso em: 01/07/2015

BIOREBA. **Simple ELISA Data Analysis. Technical Information**. 2011. p. 1-3.

BISSA, M.; ILLIANO, E.; PACCHIONI, S.; PAOLINI, F.; ZANOTTO, C.; DE GIULI MORGHEN, C.; MASSA, S.; FRANCONI, R.; RADAELLI, A.; VENUTI, A. A prime/boost strategy using DNA/fowlpox recombinants expressing the genetically attenuated E6 protein as a putative vaccine against HPV-16-associated cancers. **J Transl Med**, v. 13, p. 80, 2015.

BONTKES, H. J.; DE GRUIJL, T. D.; VAN DEN MUYSENBERG, A. J.; VERHEIJEN, R. H.; STUKART, M. J.; MEIJER, C. J.; SCHEPER, R. J.; STACEY, S. N.; DUGGAN-KEEN, M. F.; STERN, P. L.; MAN, S.; BORYSIEWICZ, L. K.; WALBOOMERS, J. M. Human papillomavirus type 16 E6/E7-specific cytotoxic T lymphocytes in women with cervical neoplasia. **Int J Cancer**, v. 88, n. 1, p. 92-98, 2000.

BOXUS, M.; FOCESATO, M.; MISEUR, A.; MERTENS, E.; DENDOUGA, N.; BRENDLE, S.; BALOGH, K. K.; CHRISTENSEN, N. D.; GIANNINI, S. L. Broad Cross-Protection Is Induced in Preclinical Models by a Human Papillomavirus Vaccine Composed of L1/L2 Chimeric Virus-Like Particles. **J Virol**, v. 90, n. 14, p. 6314-6325, 2016.

BRIANTI, P.; DE FLAMMINEIS, E.; MERCURI, S. R. Review of HPV-related disease and cancer. **New Microbiol**, v. 3, n. 40 (2), 2017.

BROWN, D. R.; KJAER, S. K.; SIGURDSSON, K.; IVERSEN, O. E.; HERNANDEZ-AVILA, M.; WHEELER, C. M.; PEREZ, G.; KOUTSKY, L. A.; TAY, E. H.; GARCIA, P.; AULT, K. A.; GARLAND, S. M.; LEODOLTER, S.; OLSSON, S. E.; TANG, G. W.; FERRIS, D. G.; PAAVONEN, J.; STEBEN, M.; BOSCH, F. X.; DILLNER, J.; JOURA, E. A.; KURMAN, R. J.; MAJEWSKI, S.; MUNOZ, N.; MYERS, E. R.; VILLA, L. L.; TADDEO, F. J.; ROBERTS, C.; TADESSE, A.; BRYAN, J.; LUPINACCI, L. C.; GIACOLETTI, K. E.; SINGS, H. L.; JAMES, M.; HESLEY, T. M.; BARR, E. The impact of quadrivalent human papillomavirus (HPV; types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine on infection and disease due to oncogenic nonvaccine HPV types in generally HPV-naive women aged 16-26 years. **J. Infect. Dis.**, v. 199, n. 7, p. 926-935, 2009.

BUCK, C. B. Center for Cancer Research. 2012. Disponível em: <http://ccr.cancer.gov/staff/gallery.asp?profileid=5921>. Acesso em: 01 de junho de 2012 2012.

BURD, E. M. Human papillomavirus and cervical cancer. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 16, n. 1, p. 1-17, 2003.

BURGERS, W. A.; BLANCHON, L.; PRADHAN, S.; DE LAUNOIT, Y.; KOUZARIDES, T.; FUKS, F. Viral oncoproteins target the DNA methyltransferases. **Oncogene**, v. 26, n. 11, p. 1650-1655, 2007.

BURKHARDT, A.; WILLINGHAM, M.; GAY, C.; JEANG, K. T.; SCHLEGEL, R. The E5 oncoprotein of bovine papillomavirus is oriented asymmetrically in Golgi and plasma membranes. **Virology**, v. 170, n. 1, p. 334-339, 1989.

CARTER, J. J.; KOUTSKY, L. A.; HUGHES, J. P.; LEE, S. K.; KUYPERS, J.; KIVIAT, N.; GALLOWAY, D. A. Comparison of human papillomavirus types 16, 18, and 6 capsid antibody responses following incident infection. **J Infect Dis**, v. 181, n. 6, p. 1911-1919, 2000.

CARVALHO, J. J. M. **Tratamento HPV**. In: ROSENBLATT, C.; WROCLAWSKI, E. R. L.; LUCON, A. M.; PEREYRA, E. A. G. (Eds.). São Paulo: Editora Atheneu. HPV na Prática Clínica. 2005, p. 286.

CDC. Human Papillomavirus (HPV)-Associated Cancers. 07 de março de 2017. Disponível em: <http://www.cdc.gov/cancer/hpv/>. Acesso em: 04 abril 2017

CDC. Genital HPV Infection - Fact Sheet. 2017. Disponível em: <https://www.cdc.gov/std/hpv/stdfact-hpv.htm>. Acesso em: 04 abril 2017.

CHANG, E. Y.; CHEN, C. H.; JI, H.; WANG, T. L.; HUNG, K.; LEE, B. P.; HUANG, A. Y.; KURMAN, R. J.; PARDOLL, D. M.; WU, T. Antigen-specific cancer immunotherapy using a GM-CSF secreting allogeneic tumor cell-based vaccine. **Int J Cancer**, v. 86, n. 5, p. 725-730, 2000.

CHATURVEDI, A. K.; ENGELS, E. A.; ANDERSON, W. F.; GILLISON, M. L. Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. **J Clin Oncol**, v. 26, n. 4, p. 612-619, 2008.

CHO, H.; LEE, H. J.; HEO, Y. K.; CHO, Y.; GWON, Y. D.; KIM, M. G.; PARK, K. H.; OH, Y. K.; KIM, Y. B. Immunogenicity of a trivalent human papillomavirus L1 DNA-encapsidated, non-replicable baculovirus nanovaccine. **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. e95961, 2014.

CHO, N. H.; KIM, Y. T.; KIM, J. W. Alteration of cell cycle in cervical tumor associated with human papillomavirus: cyclin-dependent kinase inhibitors. **Yonsei Med. J.**, v. 43, n. 6, p. 722-728, 2002.

CIANCIARULLO, A. M. Profilaxia contra o papilomavírus humano. **Rev Sodebras**, v. 9, n. 100, p. 8 - 15, 2014.

CIANCIARULLO, A. M.; SZULCZEWSKI, V.; CHAVES, A. A. M.; BAZAN, S. B.; AIRES, K. A.; MÜLLER, M.; ARMBRUSTER-MORAES, E. Production of HPV16 L1L2 VLPs in cultures of human epithelial cells. In: MÉNDEZ-VILAS, A.; DIAZ, J. (Eds.). **Microscopy: Science, Technology, Applications and Education**. Badajóz, Espanha: Formatex Research Center, 2010. v. 2, p 1073-1082.

DAVY, C. E.; JACKSON, D. J.; RAJ, K.; PEH, W. L.; SOUTHERN, S. A.; DAS, P.; SORATHIA, R.; LASKEY, P.; MIDDLETON, K.; NAKAHARA, T.; WANG, Q.; MASTERSON, P. J.; LAMBERT, P. F.; CUTHILL, S.; MILLAR, J. B.; DOORBAR, J. Human papillomavirus type 16 E1 E4-induced G2 arrest is associated with cytoplasmic retention of active Cdk1/cyclin B1 complexes. **J. Virol.**, v. 79, n. 7, p. 3998-4011, 2005.

DAY, P. M.; LOWY, D. R.; SCHILLER, J. T. Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. **Virology**, v. 307, n. 1, p. 1-11, 2003.

DAY, P. M.; LOWY, D. R.; SCHILLER, J. T. Heparan sulfate-independent cell binding and infection with furin-precleaved papillomavirus capsids. **J Virol**, v. 82, n. 24, p. 12565-12568, 2008.

DAY, P. M.; PANG, Y. Y.; KINES, R. C.; THOMPSON, C. D.; LOWY, D. R.; SCHILLER, J. T. A Human papillomavirus (HPV) in vitro neutralization assay that recapitulates the in vitro process of infection provides a sensitive measure of HPV L2 infection-inhibiting antibodies. **Clin Vaccine Immunol**, v. 19, n. 7, p. 1075-1082, 2012.

DAY, P. M.; THOMPSON, C. D.; LOWY, D. R.; SCHILLER, J. T. Interferon gamma prevents infectious entry of HPV16 via an L2-dependent mechanism. **J Virol**, 2017.

DAY, P. M.; THOMPSON, C. D.; SCHOWALTER, R. M.; LOWY, D. R.; SCHILLER, J. T. Identification of a role for the trans-Golgi network in human papillomavirus 16 pseudovirus infection. **J Virol**, v. 87, n. 7, p. 3862-3870, 2013.

DE SANJOSE, S.; DIAZ, M.; CASTELLSAGUE, X.; CLIFFORD, G.; BRUNI, L.; MUNOZ, N.; BOSCH, F. X. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. **Lancet Infect Dis**, v. 7, n. 7, p. 453-459, 2007.

DE VILLIERS, E. M.; FAUQUET, C.; BROKER, T. R.; BERNARD, H. U.; ZUR HAUSEN, H. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, n. 1, p. 17-27, 2004.

DE VUYST, H.; CLIFFORD, G. M.; NASCIMENTO, M. C.; MADELEINE, M. M.; FRANCESCHI, S. Prevalence and type distribution of human papillomavirus in carcinoma and intraepithelial neoplasia of the vulva, vagina and anus: a meta-analysis. **Int. J. Cancer**, v. 124, n. 7, p. 1626-1636, 2009.

DE VUYST, H.; CLIFFORD, G. M.; NASCIMENTO, M. C.; MADELEINE, M. M.; FRANCESCHI, S. Prevalence and type distribution of human papillomavirus in carcinoma and intraepithelial neoplasia of the vulva, vagina and anus: a meta-analysis. **Int. J. Cancer**, v. 124, n. 7, p. 1626-1636, 2009.

DERKAY, C. S.; SMITH, R. J.; MCCLAY, J.; VAN BURIK, J. A.; WIATRAC, B. J.; ARNOLD, J.; BERGER, B.; NEEFE, J. R. HspE7 treatment of pediatric recurrent respiratory papillomatosis: final results of an open-label trial. **Ann Otol Rhinol Laryngol**, v. 114, n. 9, p. 730-737, 2005.

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.**, v. 17, n. 10, p. 1576-1583, 2010.

DOORBAR, J. The papillomavirus life cycle. **J. Clin. Virol.**, v. 32 Suppl 1, p. S7-15, 2005.

DOORBAR, J.; ELY, S.; STERLING, J.; MCLEAN, C.; CRAWFORD, L. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. **Nature**, v. 352, n. 6338, p. 824-827, 1991.

DUTTA, S.; CHAKRABORTY, C.; MANDAL, R. K.; BASU, P.; BISWAS, J.; ROYCHOUDHURY, S.; PANDA, C. K. Persistent HPV16/18 infection in Indian women with the A-allele (rs6457617) of HLA-DQB1 and T-allele (rs16944) of IL-1beta-511 is associated with development of cervical carcinoma. **Cancer Immunol Immunother**, v. 64, n. 7, p. 843-851, 2015.

EGAWA, N.; WANG, Q.; GRIFFIN, H. M.; MURAKAMI, I.; JACKSON, D.; MAHMOOD, R.; DOORBAR, J. HPV16 and 18 genome amplification show different E4-dependence, with 16E4 enhancing E1 nuclear accumulation and replicative efficiency via its cell cycle arrest and kinase activation functions. **PLoS Pathog**, v. 13, n. 3, p. e1006282, 2017.

EINSTEIN, M. H.; KADISH, A. S.; BURK, R. D.; KIM, M. Y.; WADLER, S.; STREICHER, H.; GOLDBERG, G. L.; RUNOWICZ, C. D. Heat shock fusion protein-based immunotherapy for treatment of cervical intraepithelial neoplasia III. **Gynecol Oncol**, v. 106, n. 3, p. 453-460, 2007.

ELBEL, M.; CARL, S.; SPADERNA, S.; IFTNER, T. A comparative analysis of the interactions of the E6 proteins from cutaneous and genital papillomaviruses with p53 and E6AP in correlation to their transforming potential. **Virology**, v. 239, n. 1, p. 132-149, 1997.

ESQUERRE, M.; MOMOT, M.; GOUBIER, A.; GONINDARD, C.; LEUNG-THEUNG-LONG, S.; MISSERI, Y.; BISSERY, M. C. GTL001 and bivalent CyaA-based therapeutic vaccine strategies against human papillomavirus and other tumor-associated antigens induce effector and memory T-cell responses that inhibit tumor growth. **Vaccine**, v. 35, n. 11, p. 1509-1516, 2017.

FELTKAMP, M. C.; VREUGDENHIL, G. R.; VIERBOOM, M. P.; RAS, E.; VAN DER BURG, S. H.; TER SCHEGGET, J.; MELIEF, C. J.; KAST, W. M. Cytotoxic T lymphocytes raised against a subdominant epitope offered as a synthetic peptide eradicate human papillomavirus type 16-induced tumors. **Eur J Immunol**, v. 25, n. 9, p. 2638-2642, 1995.

FRAZER, I. H.; LEGGATT, G. R.; MATTAROLLO, S. R. Prevention and treatment of papillomavirus-related cancers through immunization. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 29, p. 111-138, 2011.

GAMBHIRA, R.; KARANAM, B.; JAGU, S.; ROBERTS, J. N.; BUCK, C. B.; BOSSIS, I.; ALPHS, H.; CULP, T.; CHRISTENSEN, N. D.; RODEN, R. B. A protective and broadly cross-neutralizing epitope of human papillomavirus L2. **J Virol**, v. 81, n. 24, p. 13927-13931, 2007.

GARCIA, F.; PETRY, K. U.; MUDERSPACH, L.; GOLD, M. A.; BRALY, P.; CRUM, C. P.; MAGILL, M.; SILVERMAN, M.; URBAN, R. G.; HEDLEY, M. L.; BEACH, K. J. ZYC101a for treatment of high-grade cervical intraepithelial neoplasia: a randomized controlled trial. **Obstet Gynecol**, v. 103, n. 2, p. 317-326, 2004.

GAUKROGER, J. M.; CHANDRACHUD, L. M.; O'NEIL, B. W.; GRINDLAY, G. J.; KNOWLES, G.; CAMPO, M. S. Vaccination of cattle with bovine papillomavirus type 4 L2 elicits the production of virus-neutralizing antibodies. **J Gen Virol**, v. 77 (Pt 7), p. 1577-1583, 1996.

GIROGLOU, T.; FLORIN, L.; SCHAFER, F.; STREECK, R. E.; SAPP, M. Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. **J Virol**, v. 75, n. 3, p. 1565-1570, 2001.

GIULIANI, L.; FAVALLI, C.; SYRJANEN, K.; CIOTTI, M. Human papillomavirus infections in lung cancer. Detection of E6 and E7 transcripts and review of the literature. **Anticancer Res**, v. 27, n. 4C, p. 2697-2704, 2007.

GLAUNSINGER, B. A.; LEE, S. S.; THOMAS, M.; BANKS, L.; JAVIER, R. Interactions of the PDZ-protein MAGI-1 with adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus E6 oncoproteins. **Oncogene**, v. 19, n. 46, p. 5270-5280, 2000.

GNANAMONY, M.; PEEDICAYIL, A.; ABRAHAM, P. An overview of human papillomaviruses and current vaccine strategies. **Indian J. Med. Microbiol.**, v. 25, n. 1, p. 10-17, 2007.

GOLDSTONE, S. E.; PALEFSKY, J. M.; WINNETT, M. T.; NEEFE, J. R. Activity of HspE7, a novel immunotherapy, in patients with anogenital warts. **Dis Colon Rectum**, v. 45, n. 4, p. 502-507, 2002.

GURUNATHAN, S.; KLINMAN, D. M.; SEDER, R. A. DNA vaccines: immunology, application, and optimization*. **Annu Rev Immunol**, v. 18, p. 927-974, 2000.

HAGARI, Y.; BUDGEON, L. R.; PICKEL, M. D.; KREIDER, J. W. Association of tumor necrosis factor-alpha gene expression and apoptotic cell death with regression of Shope papillomas. **J Invest Dermatol**, v. 104, n. 4, p. 526-529, 1995.

HANSEN, C. G.; NICHOLS, B. J. Molecular mechanisms of clathrin-independent endocytosis. **J Cell Sci**, v. 122, n. Pt 11, p. 1713-1721, 2009.

HARPER, D. M.; FRANCO, E. L.; WHEELER, C. M.; MOSCICKI, A. B.; ROMANOWSKI, B.; ROTELI-MARTINS, C. M.; JENKINS, D.; SCHUIND, A.; COSTA CLEMENS, S. A.; DUBIN, G. Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial. **Lancet**, v. 367, n. 9518, p. 1247-1255, 2006.

HASAN, U. A.; BATES, E.; TAKESHITA, F.; BILIATO, A.; ACCARDI, R.; BOUVARD, V.; MANSOUR, M.; VINCENT, I.; GISSMANN, L.; IFTNER, T.; SIDERI, M.; STUBENRAUCH, F.; TOMMASINO, M. TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16. **J Immunol**, v. 178, n. 5, p. 3186-3197, 2007.

HASAN, U. A.; ZANNETTI, C.; PARROCHE, P.; GOUTAGNY, N.; MALFROY, M.; ROBLOT, G.; CARREIRA, C.; HUSSAIN, I.; MULLER, M.; TAYLOR-PAPADIMITRIOU, J.; PICARD, D.; SYLLA, B. S.; TRINCHIERI, G.; MEDZHITOV, R.; TOMMASINO, M. The human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein induces a transcriptional repressor complex on the Toll-like receptor 9 promoter. **J Exp Med**, v. 210, n. 7, p. 1369-1387, 2013.

HASHIBE, M.; BRENNAN, P.; BENHAMOU, S.; CASTELLSAGUE, X.; CHEN, C.; CURADO, M. P.; DAL MASO, L.; DAUDT, A. W.; FABIANOVA, E.; FERNANDEZ, L.; WUNSCH-FILHO, V.; FRANCESCHI, S.; HAYES, R. B.; HERRERO, R.; KOIFMAN, S.; LA VECCHIA, C.; LAZARUS, P.; LEVI, F.; MATES, D.; MATOS, E.; MENEZES, A.; MUSCAT, J.; ELUF-NETO, J.; OLSHAN, A. F.; RUDNAI, P.; SCHWARTZ, S. M.; SMITH, E.; STURGIS, E. M.; SZESZENIA-DABROWSKA, N.; TALAMINI, R.; WEI, Q.; WINN, D. M.; ZARIDZE, D.; ZATONSKI, W.; ZHANG, Z. F.; BERTHILLER, J.; BOFFETTA, P. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 99, n. 10, p. 777-789, 2007.

HEBNER, C. M.; LAIMINS, L. A. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. **Rev. Med. Virol.**, v. 16, n. 2, p. 83-97, 2006.

HENG, B.; GLENN, W. K.; YE, Y.; TRAN, B.; DELPRADO, W.; LUTZE-MANN, L.; WHITAKER, N. J.; LAWSON, J. S. Human papilloma virus is associated with breast cancer. **Br. J. Cancer**, v. 101, n. 8, p. 1345-1350, 2009.

HIBBITTS, S. TA-CIN, a vaccine incorporating a recombinant HPV fusion protein (HPV16 L2E6E7) for the potential treatment of HPV16-associated genital diseases. **Curr Opin Mol Ther**, v. 12, n. 5, p. 598-606, 2010.

HOWIE, H. L.; KATZENELLENBOGEN, R. A.; GALLOWAY, D. A. Papillomavirus E6 proteins. **Virology**, v. 384, n. 2, p. 324-334, 2009.

HOWLEY, P. M.; SCHILLER, J. T.; LOWY, D. R. BasicMedical Key. Fastest Basicmedical Insight Engine., 2017. Disponível em: <http://basicmedicalkey.com/papillomaviruses/>. Acesso em: 15 abril 2017.

HPV INFORMATION CENTER. Human Papillomavirus and related Disease Report. 2017. Disponível em <http://www.hpvcentre.net/>. Acesso em 20 abril 2017.

INCA. 2017. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/>. Acesso em: 4 abril 2017.

INCA. Estimativa 2016. Incidência de Câncer no Brasil., 2016. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/index.asp?ID=1>. Acesso em: 15 abril 2017.

JABLONSKA, S.; DABROWSKI, J.; JAKUBOWICZ, K. Epidermodysplasia verruciformis as a model in studies on the role of papovaviruses in oncogenesis. **Cancer Res**, v. 32, n. 3, p. 583-589, 1972.

JAGU, S.; KARANAM, B.; GAMBHIRA, R.; CHIVUKULA, S. V.; CHAGANTI, R. J.; LOWY, D. R.; SCHILLER, J. T.; RODEN, R. B. Concatenated multitype L2 fusion proteins as candidate prophylactic pan-human papillomavirus vaccines. **J Natl Cancer Inst**, v. 101, n. 11, p. 782-792, 2009.

JAGU, S.; KWAK, K.; KARANAM, B.; HUH, W. K.; DAMOTHARAN, V.; CHIVUKULA, S. V.; RODEN, R. B. Optimization of multimeric Human papillomavirus L2 vaccines. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e55538, 2013a.

JAGU, S.; KWAK, K.; SCHILLER, J. T.; LOWY, D. R.; KLEANTHOUS, H.; KALNIN, K.; WANG, C.; WANG, H. K.; CHOW, L. T.; HUH, W. K.; JAGANATHAN, K. S.; CHIVUKULA, S. V.; RODEN, R. B. Phylogenetic considerations in designing a broadly protective multimeric L2 vaccine. **J Virol**, v. 87, n. 11, p. 6127-6136, 2013b.

JENSON, A. B.; KURMAN, R. J.; LANCASTER, W. D. Tissue effects of and host response to human papillomavirus infection. **Dermatol Clin**, v. 9, n. 2, p. 203-209, 1991.

JOHANSSON, C.; SOMBERG, M.; LI, X.; BACKSTROM WINQUIST, E.; FAY, J.; RYAN, F.; PIM, D.; BANKS, L.; SCHWARTZ, S. HPV-16 E2 contributes to induction of HPV-16 late gene expression by inhibiting early polyadenylation. **EMBO J.**, 2012.

KALANTARI, M.; CALLEJA-MACIAS, I. E.; TEWARI, D.; HAGMAR, B.; LIE, K.; BARRERA-SALDANA, H. A.; WILEY, D. J.; BERNARD, H. U. Conserved methylation patterns of human papillomavirus type 16 DNA in asymptomatic infection and cervical neoplasia. **J Virol**, v. 78, n. 23, p. 12762-12772, 2004.

KANODIA, S.; FAHEY, L. M.; KAST, W. M. Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. **Curr Cancer Drug Targets**, v. 7, n. 1, p. 79-89, 2007.

KARANAM, B.; GAMBHIRA, R.; PENG, S.; JAGU, S.; KIM, D. J.; KETNER, G. W.; STERN, P. L.; ADAMS, R. J.; RODEN, R. B. Vaccination with HPV16 L2E6E7 fusion protein in GPI-0100 adjuvant elicits protective humoral and cell-mediated immunity. **Vaccine**, v. 27, n. 7, p. 1040-1049, 2009a.

KARANAM, B.; JAGU, S.; HUH, W. K.; RODEN, R. B. Developing vaccines against minor capsid antigen L2 to prevent papillomavirus infection. **Immunol Cell Biol**, v. 87, n. 4, p. 287-299, 2009b.

KAVATI, E. A.; PALUMBO, A. C. M.; ANDRADE, F. B.; MARIGLIANI, B.; SAKAUCHI, D.; LEÃO, E.; ARMBRUSTER-MORAES, E.; MÜLLER, M.; CIANCIARULLO, A. M. Interaction of HPV16L1L2 VLP with Stem Cells CD34+/CD117+ of the Human Amniotic Fluid. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.). **Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology**. Badajoz, Spain: Formatex Research Center, 2012. v. 1, p. 617 - 624.

KAVATI, E. A. O., H. B.; CANALI, R. A.; SAKAUCHI, D.; CIANCIARULLO, A. M. Comparative analysis of the recombinant HPV16 proteins expression between two human epithelial cell lineages. In: MENDEZ-VILAS, A. (Ed.). **Microscopy: Advances in scientific research and education**. Badajóz, Spain: Formatex Research Center, v.1, 2014. 397 - 402.

KAWANA, Y.; KAWANA, K.; YOSHIKAWA, H.; TAKETANI, Y.; YOSHIIKE, K.; KANDA, T. Human papillomavirus type 16 minor capsid protein l2 N-terminal region containing a common neutralization epitope binds to the cell surface and enters the cytoplasm. **J Virol**, v. 75, n. 5, p. 2331-2336, 2001.

KHALLOUF, H.; GRABOWSKA, A. K.; RIEMER, A. B. Therapeutic Vaccine Strategies against Human Papillomavirus. **Vaccines (Basel)**, v. 2, n. 2, p. 422-462, 2014.

KIETPEERAKOOL, C.; SRISOMBOON, J. Medical treatment of cervical intraepithelial neoplasia II, III: an update review. **Int J Clin Oncol**, v. 14, n. 1, p. 37-42, 2009.

KIM, K. Y.; BLATT, L.; TAYLOR, M. W. The effects of interferon on the expression of human papillomavirus oncogenes. **J Gen Virol**, v. 81, n. Pt 3, p. 695-700, 2000.

KIM, S.; CHUNG, H. W.; KONG, H. Y.; LIM, J. B. Identificaiton of Novel Immunogenic Human Papillomavirus Type 16 E7-Specific Epitopes Restricted to HLA-A*33:03 for Cervical Cancer Immunotherapy. **Yonsei Med J**, v. 58, n. 1, p. 43-50, 2017.

KIM, S.; CHUNG, H. W.; LEE, K. R.; LIM, J. B. Identification of novel epitopes from human papillomavirus type 18 E7 that can sensitize PBMCs of multiple HLA class I against human cervical cancer. **J Transl Med**, v. 12, 2014.

KIM, S. W.; YANG, J. S. Human papillomavirus type 16 E5 protein as a therapeutic target. **Yonsei Med. J.**, v. 47, n. 1, p. 1-14, 2006.

KINES, R. C.; THOMPSON, C. D.; LOWY, D. R.; SCHILLER, J. T.; DAY, P. M. The initial steps leading to papillomavirus infection occur on the basement membrane prior to cell surface binding. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 48, p. 20458-20463, 2009.

KLENCKE, B.; MATIJEVIC, M.; URBAN, R. G.; LATHEY, J. L.; HEDLEY, M. L.; BERRY, M.; THATCHER, J.; WEINBERG, V.; WILSON, J.; DARRAGH, T.; JAY, N.; DA COSTA, M.; PALEFSKY, J. M. Encapsulated plasmid DNA treatment for human papillomavirus 16-associated anal dysplasia: a Phase I study of ZYC101. **Clin Cancer Res**, v. 8, n. 5, p. 1028-1037, 2002.

KOSHIOL, J.; ROTUNNO, M.; GILLISON, M. L.; VAN DOORN, L. J.; CHATURVEDI, A. K.; TARANTINI, L.; SONG, H.; QUINT, W. G.; STRUIJK, L.; GOLDSTEIN, A. M.; HILDESHEIM, A.; TAYLOR, P. R.; WACHOLDER, S.; BERTAZZI, P. A.; LANDI, M. T.; CAPORASO, N. E. Assessment of human papillomavirus in lung tumor tissue. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 103, n. 6, p. 501-507, 2011.

KOTZÉ, L.; SMITH, J. J.; DEN HAAN, R.; VAN ZYL, W. H.; GÖRGENS, J. F. Expression of human papillomavirus type 16 (HPV16) L1 protein in *Pichia pastoris*. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 2, p. 214-219, 2011.

KREIMER, A. R.; CLIFFORD, G. M.; BOYLE, P.; FRANCESCHI, S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 14, n. 2, p. 467-475, 2005.

KREIMER, A. R.; VILLA, A.; NYITRAY, A. G.; ABRAHAMSEN, M.; PAPENFUSS, M.; SMITH, D.; HILDESHEIM, A.; VILLA, L. L.; LAZCANO-PONCE, E.; GIULIANO, A. R. The epidemiology of oral HPV infection among a multinational sample of healthy men. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 20, n. 1, p. 172-182, 2011.

KUCK, D.; LEDER, C.; KERN, A.; MULLER, M.; PIUKO, K.; GISSMANN, L.; KLEINSCHMIDT, J. A. Efficiency of HPV 16 L1/E7 DNA immunization: influence of cellular localization and capsid assembly. **Vaccine**, v. 24, n. 15, p. 2952-2965, 2006.

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**, v. 7, n. 15, p. 1541-1550, 2005.

LAU, L.; GRAY, E. E.; BRUNETTE, R. L.; STETSON, D. B. DNA tumor virus oncogenes antagonize the cGAS-STING DNA-sensing pathway. **Science**, v. 350, n. 6260, p. 568-571, 2015.

LAWSON, J. S.; GLENN, W. K.; WHITAKER, N. J. Human Papilloma Viruses and Breast Cancer - Assessment of Causality. **Front Oncol**, v. 6, p. 207, 2016.

LI, M.; ZHANG, X. L.; DENG, F.; QIAN, L. T.; MENG, S. P.; SHAN, W. L.; WANG, B. L. Involvement of TP53 and TP16 expression in human papillomavirus-associated non-small cell lung cancer. **Oncol Lett**, v. 12, n. 5, p. 3330-3336, 2016.

LI, Y. L.; QIU, X. H.; SHEN, C.; LIU, J. N.; ZHANG, J. Vaccination of full-length HPV16 E6 or E7 protein inhibits the growth of HPV16 associated tumors. **Oncol Rep**, v. 24, n. 5, p. 1323-1329, 2010.

LIN, K. Y.; GUARNIERI, F. G.; STAVELEY-O'CARROLL, K. F.; LEVITSKY, H. I.; AUGUST, J. T.; PARDOLL, D. M. AND WU, T. C. Treatment of Established Tumors with a Novel Vaccine That Enhances Major Histocompatibility Class II Presentation of Tumor Antigen. **Cancer Res**, p. 21-26. 1996.

LIU, T. Y.; HUSSEIN, W. M.; TOTH, I.; SKWARCZYNSKI, M. Advances in peptide-based human papillomavirus therapeutic vaccines. **Curr Top Med Chem**, v. 12, n. 14, p. 1581-1592, 2012.

LIU, X.; DAKIC, A.; ZHANG, Y.; DAI, Y.; CHEN, R.; SCHLEGEL, R. HPV E6 protein interacts physically and functionally with the cellular telomerase complex. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 106, n. 44, p. 18780-18785, 2009.

MARIGLIANI, B.; KAVATI, E. A.; SAKAUCHI, D.; OLIVEIRA, H. B.; CANALI, R. A.; ARMBRUSTER-MORAES, E.; MÜLLER, M.; CIANCIARULLO, A. M. Intracellular distribution of recombinant Human Papillomavirus capsid proteins. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.). **Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology**. Badajoz, Spain: Formatex Research Center, 2012. v. 1, p. 678 - 684.

MARUR, S.; D'SOUZA, G.; WESTRA, W. H.; FORASTIERE, A. A. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. **Lancet Oncol.**, v. 11, n. 8, p. 781-789, 2010.

MCBRIDE, A. A.; MCPHILLIPS, M. G.; OLIVEIRA, J. G. Brd4: tethering, segregation and beyond. **Trends Microbiol.**, v. 12, n. 12, p. 527-529, 2004.

MCGRATH, M.; DE VILLIERS, G. K.; SHEPHARD, E.; HITZEROTH, II; RYBICKI, E. P. Development of human papillomavirus chimaeric L1/L2 candidate vaccines. **Arch Virol**, 2013.

MEHANNA, H.; BEECH, T.; NICHOLSON, T.; EL-HARIRY, I.; MCCONKEY, C.; PALERI, V.; ROBERTS, S. Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck cancer--systematic review and meta-analysis of trends by time and region. **Head Neck**, v. 35, n. 5, p. 747-755, 2013.

MEHLHORN, G.; HAUTMANN, S. K.; KOCH, M. C.; STREHL, J. D.; HARTMANN, A.; HILFRICH, R.; BECKMANN, M. W.; GRIESSER, H. HPV16-L1-specific antibody response is associated with clinical remission of high-risk HPV-positive early dysplastic lesions. **Anticancer Res**, v. 34, n. 9, p. 5127-5132, 2014.

MENDIZABAL-RUIZ, A. P.; MORALES, J. A.; RAMIREZ-JIRANO, L. J.; PADILLA-ROSAS, M.; MORAN-MOGUEL, M. C.; MONTOYA-FUENTES, H. Low frequency of human papillomavirus DNA in breast cancer tissue. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 114, n. 1, p. 189-194, 2009.

MIKYSKOVA, R.; INDROVA, M.; SIMOVA, J.; JANDLOVA, T.; BIEBLOVA, J.; JINOCHE, P.; BUBENIK, J.; VONKA, V. Treatment of minimal residual disease after surgery or chemotherapy in mice carrying HPV16-associated tumours: Cytokine and gene therapy with IL-2 and GM-CSF. **Int J Oncol**, v. 24, n. 1, p. 161-167, 2004.

MOLLING, J. W.; DE GRUIJL, T. D.; GLIM, J.; MORENO, M.; ROZENDAAL, L.; MEIJER, C. J.; VAN DEN EERTWEGH, A. J.; SCHEPER, R. J.; VON BLOMBERG, M. E.; BONTKES, H. J. CD4(+)CD25hi regulatory T-cell frequency correlates with persistence of human papillomavirus type 16 and T helper cell responses in patients with cervical intraepithelial neoplasia. **Int J Cancer**, v. 121, n. 8, p. 1749-1755, 2007.

MOODY, C. A.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. **Nat. Rev. Cancer**, v. 10, n. 8, p. 550-560, 2010.

MORROW, M. P.; YAN, J.; SARDESAI, N. Y. Human papillomavirus therapeutic vaccines: targeting viral antigens as immunotherapy for precancerous disease and cancer. **Expert Rev Vaccines**, v. 12, n. 3, p. 271-283, 2013.

MOU, X.; CHEN, L.; LIU, F.; SHEN, Y.; WANG, H.; LI, Y.; YUAN, L.; LIN, J.; TENG, L.; XIANG, C. Low Prevalence of Human Papillomavirus (HPV) in Chinese Patients with Breast Cancer. **J. Int. Med. Res.**, v. 39, n. 5, p. 1636-1644, 2011.

MUNOZ, N.; CASTELLSAGUE, X.; DE GONZALEZ, A. B.; GISSMANN, L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine**, v. 24 Suppl 3, p. S3/1-10, 2006.

MUSTAFA, W.; MACIAG, P. C.; PAN, Z. K.; WEAVER, J. R.; XIAO, Y.; ISAACS, S. N.; PATERSON, Y. *Listeria monocytogenes* delivery of HPV-16 major capsid protein L1 induces systemic and mucosal cell-mediated CD4+ and CD8+ T-cell responses after oral immunization. **Viral Immunol**, v. 22, n. 3, p. 195-204, 2009.

NOMINE, Y.; MASSON, M.; CHARBONNIER, S.; ZANIER, K.; RISTRANI, T.; DERYCKERE, F.; SIBLER, A. P.; DESPLANCQ, D.; ATKINSON, R. A.; WEISS, E.; ORFANOUDAKIS, G.; KIEFFER, B.; TRAVE, G. Structural and functional analysis of E6 oncoprotein: insights in the molecular pathways of human papillomavirus-mediated pathogenesis. **Mol Cell**, v. 21, n. 5, p. 665-678, 2006.

NOMINE, Y.; RISTRANI, T.; LAURENT, C.; LEFEVRE, J. F.; WEISS, E.; TRAVE, G. Formation of soluble inclusion bodies by hvp e6 oncoprotein fused to maltose-binding protein. **Protein Expr Purif**, v. 23, n. 1, p. 22-32, 2001.

NONNENMACHER, B.; BREITENBACH, V.; VILLA, L. L.; PROLLA, J. C.; BOZZETTI, M. C. Genital human papillomavirus infection identification by molecular biology among asymptomatic women. **Rev. Saude Publica**, v. 36, n. 1, p. 95-100, 2002.

PAAVONEN, J.; JENKINS, D.; BOSCH, F. X.; NAUD, P.; SALMERON, J.; WHEELER, C. M.; CHOW, S. N.; APTER, D. L.; KITCHENER, H. C.; CASTELLSAGUE, X.; DE CARVALHO, N. S.; SKINNER, S. R.; HARPER, D. M.; HEDRICK, J. A.; JAISAMRARN, U.; LIMSON, G. A.; DIONNE, M.; QUINT, W.; SPIESSENS, B.; PEETERS, P.; STRUYF, F.; WIETING, S. L.; LEHTINEN, M. O.; DUBIN, G. Efficacy of a prophylactic adjuvanted bivalent L1 virus-like-particle vaccine against infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: an interim analysis of a phase III double-blind, randomised controlled trial. **Lancet**, v. 369, n. 9580, p. 2161-2170, 2007.

PALEFSKY, J. M. Epidemiology of Human papillomavirus infections. Disponível em: <https://www.uptodate.com/contents/epidemiology-of-human-papillomavirus-infections> . Acesso em 8 fevereiro 2017.

PAO, C. C.; LIN, C. Y.; YAO, D. S.; TSENG, C. J. Differential expression of cytokine genes in cervical cancer tissues. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 214, n. 3, p. 1146-1151, 1995.

PAOLINI, F.; COTA, C.; AMANTEA, A.; CURZIO, G.; VENUTI, A. Mucosal Alpha-Papillomavirus (HPV89) in a rare skin lesion. **Virol J**, v. 12, p. 105, 2015.

PASTRANA, D. V.; GAMBHIRA, R.; BUCK, C. B.; PANG, Y. Y.; THOMPSON, C. D.; CULP, T. D.; CHRISTENSEN, N. D.; LOWY, D. R.; SCHILLER, J. T.; RODEN, R. B. Cross-neutralization of cutaneous and mucosal Papillomavirus types with anti-sera to the amino terminus of L2. **Virology**, v. 337, n. 2, p. 365-372, 2005.

PENG, S.; JI, H.; TRIMBLE, C.; HE, L.; TSAI, Y. C.; YEATERMEYER, J.; BOYD, D. A.; HUNG, C. F.; WU, T. C. Development of a DNA vaccine targeting human papillomavirus type 16 oncoprotein E6. **J. Virol.**, v. 78, n. 16, p. 8468-8476, 2004.

PETO, J.; GILHAM, C.; FLETCHER, O.; MATTHEWS, F. E. The cervical cancer epidemic that screening has prevented in the UK. **Lancet**, v. 364, n. 9430, p. 249-256, 2004.

PICKARD, R. K.; XIAO, W.; BROUTIAN, T. R.; HE, X.; GILLISON, M. L. The prevalence and incidence of oral human papillomavirus infection among young men and women, aged 18-30 years. **Sex Transm Dis**, v. 39, n. 7, p. 559-566, 2012.

PRESCOTT, E. L.; BRIMACOMBE, C. L.; HARTLEY, M.; BELL, I.; GRAHAM, S.; ROBERTS, S. Human papillomavirus type 1 E1^{E4} protein is a potent inhibitor of the serine-arginine (SR) protein kinase SRPK1 and inhibits phosphorylation of host SR proteins and of the viral transcription and replication regulator E2. **J Virol**, v. 88, n. 21, p. 12599-12611, 2014.

PULENDRAN, B.; LI, S.; NAKAYA, H. I. Systems vaccinology. **Immunity**, v. 33, n. 4, p. 516-529, 2010.

PULENDRAN, B.; OH, J. Z.; NAKAYA, H. I.; RAVINDRAN, R.; KAZMIN, D. A. Immunity to viruses: learning from successful human vaccines. **Immunol Rev**, v. 255, n. 1, p. 243-255, 2013.

RAJ, K.; BERGUERAND, S.; SOUTHERN, S.; DOORBAR, J.; BEARD, P. E1 empty set E4 protein of human papillomavirus type 16 associates with mitochondria. **J. Virol.**, v. 78, n. 13, p. 7199-7207, 2004.

RESSING, M. E.; VAN DRIEL, W. J.; BRANDT, R. M.; KENTER, G. G.; DE JONG, J. H.; BAUKNECHT, T.; FLEUREN, G. J.; HOOGERHOUT, P.; OFFRINGA, R.; SETTE, A.; CELIS, E.; GREY, H.; TRIMBOS, B. J.; KAST, W. M.; MELIEF, C. J. Detection of T helper responses, but not of human papillomavirus-specific cytotoxic T lymphocyte responses, after peptide vaccination of patients with cervical carcinoma. **J Immunother**, v. 23, n. 2, p. 255-266, 2000.

REUSSER, N. M.; DOWNING, C.; GUIDRY, J.; TYRING, S. K. HPV Carcinomas in Immunocompromised Patients. **J Clin Med**, v. 29, n. 4 (2), p. 260 - 281, 2015.

REZAZADEH, A.; LABER, D. A.; GHIM, S. J.; JENSON, A. B.; KLOECKER, G. The role of human papilloma virus in lung cancer: a review of the evidence. **Am J Med Sci**, v. 338, n. 1, p. 64-67, 2009.

RICHARDS, R. M.; LOWY, D. R.; SCHILLER, J. T.; DAY, P. M. Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 5, p. 1522-1527, 2006.

RODEN, R. B.; DAY, P. M.; BRONZO, B. K.; YUTZY, W. H. T.; YANG, Y.; LOWY, D. R.; SCHILLER, J. T. Positively charged termini of the L2 minor capsid protein are necessary for papillomavirus infection. **J Virol**, v. 75, n. 21, p. 10493-10497, 2001.

RONCO, L. V.; KARPOVA, A. Y.; VIDAL, M.; HOWLEY, P. M. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. **Genes Dev**, v. 12, n. 13, p. 2061-2072, 1998.

ROSE, R. C.; BONNEZ, W.; STRIKE, D. G.; REICHMAN, R. C. Expression of the full-length products of the human papillomavirus type 6b (HPV-6b) and HPV-11 L2 open reading frames by recombinant baculovirus, and antigenic comparisons with HPV-11 whole virus particles. **J Gen Virol**, v. 71 (Pt 11), p. 2725-2729, 1990.

ROSE, R. C.; BONNEZ, W.; STRIKE, D. G.; REICHMAN, R. C. Expression of the full-length products of the human papillomavirus type 6b (HPV-6b) and HPV-11 L2 open reading frames by recombinant baculovirus, and antigenic comparisons with HPV-11 whole virus particles. **J Gen Virol**, v. 71 (Pt 11), p. 2725-2729, 1990.

SAKAUCHI, D. **Potencial vacinal de proteínas recombinantes do capsídeo de papilomavírus humano**. 2016. 90 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

SANTIN, A. D.; BELLONE, S.; PALMIERI, M.; ZANOLINI, A.; RAVAGGI, A.; SIEGEL, E. R.; ROMAN, J. J.; PECORELLI, S.; CANNON, M. J. Human papillomavirus type 16 and 18 E7-pulsed dendritic cell vaccination of stage IB or IIA cervical cancer patients: a phase I escalating-dose trial. **J Virol**, v. 82, n. 4, p. 1968-1979, 2008.

SANTURIO, J. M.; LEAL, A. T.; LEAL, A. B. M.; ALVES, S. H.; LUBECK, I.; GRIEBELER, J.; COPETTI, M. V. Teste de ELISA indireto para diagnóstico sorológico de pitiose. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 1, n. 26, p. 47 - 50, 2006.

SCHELHAAS, M.; SHAH, B.; HOLZER, M.; BLATTMANN, P.; KUHLING, L.; DAY, P. M.; SCHILLER, J. T.; HELENIUS, A. Entry of human papillomavirus type 16 by actin-dependent, clathrin- and lipid raft-independent endocytosis. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 4, p. e1002657, 2012.

SCHELLENBACHER, C.; RODEN, R.; KIRNBAUER, R. Chimeric L1-L2 virus-like particles as potential broad-spectrum human papillomavirus vaccines. **J Virol**, v. 83, n. 19, p. 10085-10095, 2009.

SCHELLENBACHER, C.; RODEN, R. B.; KIRNBAUER, R. Developments in L2-based human papillomavirus (HPV) vaccines. **Virus Res**, v. 231, p. 166-175, 2017.

SCHERER, E. M.; SMITH, R. A.; SIMONICH, C. A.; NIYONZIMA, N.; CARTER, J. J.; GALLOWAY, D. A. Characteristics of memory B cells elicited by a highly efficacious HPV vaccine in subjects with no pre-existing immunity. **PLoS Pathog**, v. 10, n. 10, p. e1004461, 2014.

SCHILLER, J. T.; MULLER, M. Next generation prophylactic human papillomavirus vaccines. **Lancet Oncol**, v. 16, n. 5, p. e217-e225, 2015.

SCHWARTZ, S. Papillomavirus transcripts and posttranscriptional regulation. **Virology**, v. 445, n. 1-2, p. 187-196, 2013.

SIMMONDS, M.; STOREY, A. Identification of the regions of the HPV 5 E6 protein involved in Bak degradation and inhibition of apoptosis. **Int. J. Cancer**, v. 123, n. 10, p. 2260-2266, 2008.

SMITH, J. L.; CAMPOS, S. K.; WANDINGER-NESS, A.; OZBUN, M. A. Caveolin-1-dependent infectious entry of human papillomavirus type 31 in human keratinocytes proceeds to the endosomal pathway for pH-dependent uncoating. **J Virol**, v. 82, n. 19, p. 9505-9512, 2008.

SOARES, C. O. Princípios, padronização e validação de provas sorológicas. In: MADRUGA, C. R., ARAÚJO, F. R.; SOARES, C. O. (Eds.). **Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária**. Campo Grande, M.S.: EMBRAPA Gado de Corte. 2001, p 145 - 178.

SPANOS, W. C.; HOOVER, A.; HARRIS, G. F.; WU, S.; STRAND, G. L.; ANDERSON, M. E.; KLINGELHUTZ, A. J.; HENDRIKS, W., BOSSLER, A. D.; LEE, J. H. The PDZ binding motif of human papillomavirus type 16 E6 induces PTPN13 loss, which allows anchorage-independent growth and synergizes with ras for invasive growth. **J Virol**, v. 82, n. 5, p. 2493 - 2500, 2008.

STANLEY, M. Potential mechanisms for HPV vaccine-induced long-term protection. **Gynecol Oncol**, v. 118, n. 1 Suppl, p. S2-7, 2010.

STANLEY, M. Immunobiology of HPV and HPV vaccines. **Gynecol Oncol**, v. 109, n. 2 Suppl, p. S15-21, 2008.

STANLEY, M. A. Human papillomavirus vaccines. **Rev Med Virol**, v. 16, n. 3, p. 139-149, 2006.

STEBEN, M.; DUARTE-FRANCO, E. Human papillomavirus infection: epidemiology and pathophysiology. **Gynecol. Oncol.**, v. 107, n. 2 Suppl 1, p. S2-5, 2007.

STELLER, M. A.; GURSKI, K. J.; MURAKAMI, M.; DANIEL, R. W.; SHAH, K. V.; CELIS, E.; SETTE, A.; TRIMBLE, E. L.; PARK, R. C.; MARINCOLA, F. M. Cell-mediated immunological responses in cervical and vaginal cancer patients immunized with a lipidated epitope of human papillomavirus type 16 E7. **Clin Cancer Res**, v. 4, n. 9, p. 2103-2109, 1998.

STRAUB, E.; FERTEY, J.; DREER, M.; IFTNER, T.; STUBENRAUCH, F. Characterization of the Human Papillomavirus 16 E8 Promoter. **J Virol**, v. 89, n. 14, p. 7304-7313, 2015.

STRAUB, E.; DREER, M.; FERTEY, J.; IFTNER, T.; STUBENRAUCH, F. The viral E8^{E2C} repressor limits productive replication of human papillomavirus 16. **J Virol**, v. 88, n. 2, p. 937-947, 2014.

THOMAS, M.; BANKS, L. Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV-18 E6. **Oncogene**, v. 17, n. 23, p. 2943-2954, 1998.

THOMAS, M.; LAURA, R.; HEPNER, K.; GUCCIONE, E.; SAWYERS, C.; LASKY, L.; BANKS, L. Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the MAGI-2 and MAGI-3 proteins for degradation. **Oncogene**, v. 21, n. 33, p. 5088-5096, 2002.

THOMAS, M.; NARAYAN, N.; PIM, D.; TOMAIC, V.; MASSIMI, P.; NAGASAKA, K.; KRANJEC, C.; GAMMOH, N.; BANKS, L. Human papillomaviruses, cervical cancer and cell polarity. **Oncogene**, v. 27, n. 55, p. 7018-7030, 2008.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res**, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

TINDLE, R. W. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v. 2, n. 1, p. 59-65, 2002.

TOUSSAINT-SMITH, E.; DONNER, D. B.; ROMAN, A. Expression of human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins in primary foreskin keratinocytes is sufficient to alter the expression of angiogenic factors. **Oncogene**, v. 23, n. 17, p. 2988-2995, 2004.

TUMBAN, E.; PEABODY, J.; PEABODY, D. S.; CHACKERIAN, B. A Pan-HPV Vaccine Based on Bacteriophage PP7 VLPs Displaying Broadly Cross-Neutralizing Epitopes from the HPV Minor Capsid Protein, L2. **PLoS One**, v. 6, n. 8, p. e23310, 2011.

TUMMERS, B.; GOEDEMANS, R.; PELASCINI, L. P.; JORDANOVA, E. S.; VAN ESCH, E. M.; MEYERS, C.; MELIEF, C. J.; BOER, J. M.; VAN DER BURG, S. H. The interferon-related developmental regulator 1 is used by human papillomavirus to suppress NFkappaB activation. **Nat Commun**, v. 6, p. 6537, 2015.

TUNGTEAKKHUN, S. S.; DUERKSEN-HUGHES, P. J. Cellular binding partners of the human papillomavirus E6 protein. **Arch. Virol.**, v. 153, n. 3, p. 397-408, 2008.

TYRING, S. K. Human papillomavirus infections: epidemiology, pathogenesis, and host immune response. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 43, n. 1 Pt 2, p. S18-26, 2000.

UNGER, E. R.; DUARTE-FRANCO, E. Human papillomaviruses: into the new millennium. **Obstet. Gynecol. Clin. North. Am.**, v. 28, n. 4, p. 653-666, vii-viii, 2001.

VAN DER BURG, S. H.; KWAPPENBERG, K. M.; O'NEILL, T.; BRANDT, R. M.; MELIEF, C. J.; HICKLING, J. K.; OFFRINGA, R. Pre-clinical safety and efficacy of TA-CIN, a recombinant HPV16 L2E6E7 fusion protein vaccine, in homologous and heterologous prime-boost regimens. **Vaccine**, v. 19, n. 27, p. 3652-3660, 2001.

VANDE POL, S. B.; KLINGELHUTZ, A. J. Papillomavirus E6 oncoproteins. **Virology**, v. 445, n. 1-2, p. 115-137, 2013.

VIEIRA, K. B.; GOLDSTEIN, D. J.; VILLA, L. L. Tumor necrosis factor alpha interferes with the cell cycle of normal and papillomavirus-immortalized human keratinocytes. **Cancer Res**, v. 56, n. 10, p. 2452-2457, 1996.

VILLA, L. L.; VIEIRA, K. B.; PEI, X. F.; SCHLEGEL, R. Differential effect of tumor necrosis factor on proliferation of primary human keratinocytes and cell lines containing human papillomavirus types 16 and 18. **Mol Carcinog**, v. 6, n. 1, p. 5-9, 1992.

VISCIDI, R. P.; SCHIFFMAN, M.; HILDESHEIM, A.; HERRERO, R.; CASTLE, P. E.; BRATTI, M. C.; RODRIGUEZ, A. C.; SHERMAN, M. E.; WANG, S.; CLAYMAN, B.; BURK, R. D. Seroreactivity to human papillomavirus (HPV) types 16, 18, or 31 and risk of subsequent HPV infection: results from a population-based study in Costa Rica. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 13, n. 2, p. 324-327, 2004.

VOGT, M.; BUTZ, K.; DYMALLA, S.; SEMZOW, J.; HOPPE-SEYLER, F. Inhibition of Bax activity is crucial for the antiapoptotic function of the human papillomavirus E6 oncoprotein. **Oncogene**, v. 25, n. 29, p. 4009-4015, 2006.

WANG, D.; LI, Z.; XIAO, J.; WANG, J.; ZHANG, L.; LIU, Y.; FAN, F.; XIN, L.; WEI, M.; KONG, Z.; YU, H.; GU, Y.; ZHANG, J.; LI, S.; XIA, N. Identification of Broad-Genotype HPV L2 Neutralization Site for Pan-HPV Vaccine Development by a Cross-Neutralizing Antibody. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0123944, 2015a.

WANG, J. W.; JAGU, S.; WU, W. H.; VISCIDI, R. P.; MACGREGOR-DAS, A.; FOGEL, J. M.; KWAK, K.; DAAYANA, S.; KITCHENER, H.; STERN, P. L.; GRAVITT, P. E.; TRIMBLE, C. L.; RODEN, R. B. Seroepidemiology of Human Papillomavirus 16 (HPV16) L2 and Generation of L2-Specific Human Chimeric Monoclonal Antibodies. **Clin Vaccine Immunol**, v. 22, n. 7, p. 806-816, 2015b.

WANG, J. W.; RODEN, R. B. L2, the minor capsid protein of papillomavirus. **Virology**, v. 445, n. 1-2, p. 175-186, 2013.

WANG, T. L.; LING, M.; SHIH, I. M.; PHAM, T.; PAI, S. I.; LU, Z.; KURMAN, R. J.; PARDOLL, D. M.; WU, T. C. Intramuscular administration of E7-transfected dendritic cells generates the most potent E7-specific anti-tumor immunity. **Gene Ther**, v. 7, n. 9, p. 726-733, 2000.

WESTRICH, J. A.; WARREN, C. J.; PYEON, D. Evasion of host immune defenses by human papillomavirus. **Virus Res**, v. 231, p. 21-33, 2017.

WILLEY, J. C.; BROUSSOUD, A.; SLEEMI, A.; BENNETT, W. P.; CERUTTI, P.; HARRIS, C. C. Immortalization of normal human bronchial epithelial cells by human papillomaviruses 16 or 18. **Cancer Res**, v. 51, n. 19, p. 5370-5377, 1991.

WOODMAN, C. B.; COLLINS, S. I.; YOUNG, L. S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. **Nat Rev Cancer**, v. 7, n. 1, p. 11-22, 2007.

WU, C. Y.; MONIE, A.; PANG, X.; HUNG, C. F.; WU, T. C. Improving therapeutic HPV peptide-based vaccine potency by enhancing CD4⁺ T help and dendritic cell activation. **J Biomed Sci**, v. 17, p. 88, 2010.

YAJID, A. I.; ZAKARIAH, M. A.; MAT ZIN, A. A.; OTHMAN, N. H. Potential Role of E4 Protein in Human Papillomavirus Screening: a Review. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 18, n. 2, p. 315-319, 2017.

YAN, X.; WANG, D.; LIANG, F.; FU, L.; GUO, C. HPV16L1-attenuated Shigella recombinant vaccine induced strong vaginal and systemic immune responses in guinea pig model. **Hum Vaccin Immunother**, v. 10, n. 12, p. 3491-3498, 2014.

YANG, A.; FARMER, E.; WU, T. C.; HUNG, C. F. Perspectives for therapeutic HPV vaccine development. **J Biomed Sci**, v. 23, n. 1, p. 75, 2016.

YANG, R.; DAY, P. M.; YUTZY, W. H. T.; LIN, K. Y.; HUNG, C. F.; RODEN, R. B. Cell surface-binding motifs of L2 that facilitate papillomavirus infection. **J Virol**, v. 77, n. 6, p. 3531-3541, 2003a.

YANG, R.; YUTZY, W. H. T.; VISCIDI, R. P.; RODEN, R. B. Interaction of L2 with beta-actin directs intracellular transport of papillomavirus and infection. **J Biol Chem**, v. 278, n. 14, p. 12546-12553, 2003b.

ZHOU, J.; LIU, W. J.; PENG, S. W.; SUN, X. Y.; FRAZER, I. Papillomavirus capsid protein expression level depends on the match between codon usage and tRNA availability. **J Virol**, v. 73, n. 6, p. 4972-4982, 1999.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. **J Natl Cancer Inst**, v. 92, n. 9, p. 690-698, 2000.

ZUR HAUSEN, J.; SCHULTE-HOLTHAUSEN, H.; WOLF, H.; DORRIES, K.; EGGER, H. Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. II. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human herpes group viruses. **Int. J. Cancer**, v. 13, n. 5, p. 657-664, 1974.