

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 –

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.

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 progride 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).

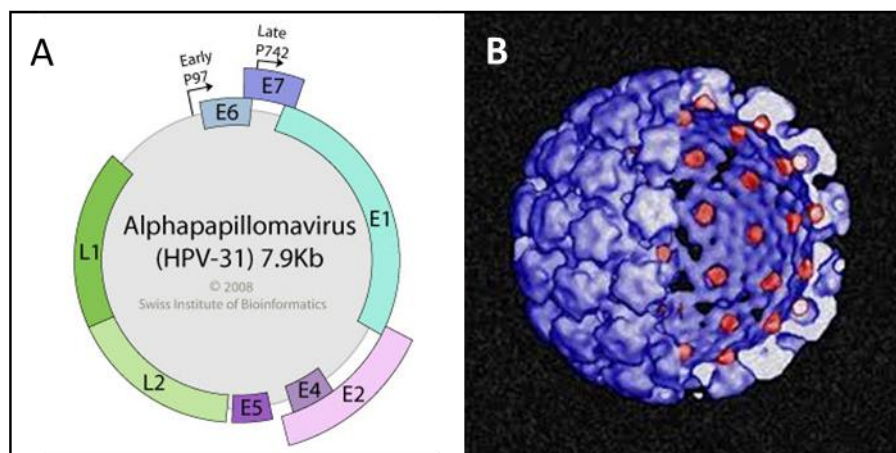
O genoma do HPV é formado por uma dupla-fita de DNA circular com aproximadamente 8.000 pb (pares de bases), podendo ser encontrado na forma episossomal como um DNA circular extracromossômico ou integrado ao genoma da célula hospedeira, entretanto ambas as formas podem coexistir em uma mesma célula. O 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

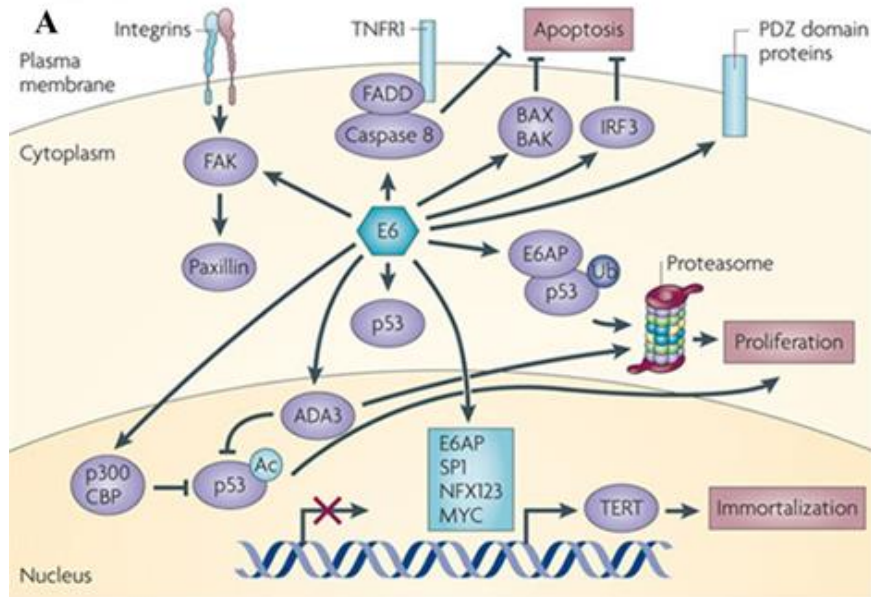
um número bem escasso de alvos de interação. Admite-se que o mRNA de E4 sofre “splicing” com cinco aminoácidos de *E1*, gerando uma proteína conhecida como E1^{E4}. A primeira atividade descrita de E1^{E4} de HPV16 foi a habilidade de interagir e desmanchar a rede de citoqueratina das células, facilitando 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).

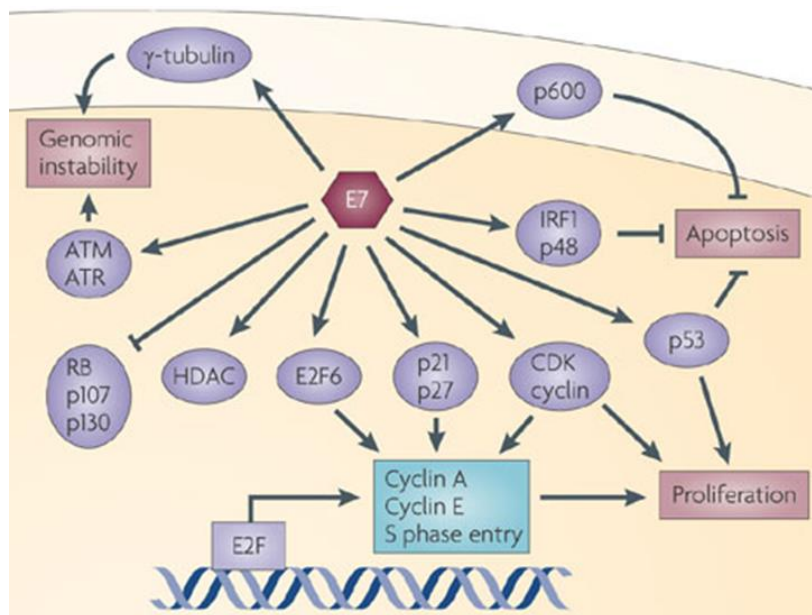
Figura 2 – E6 age sobre vários alvos celulares em diversas vias de sinalização.



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.



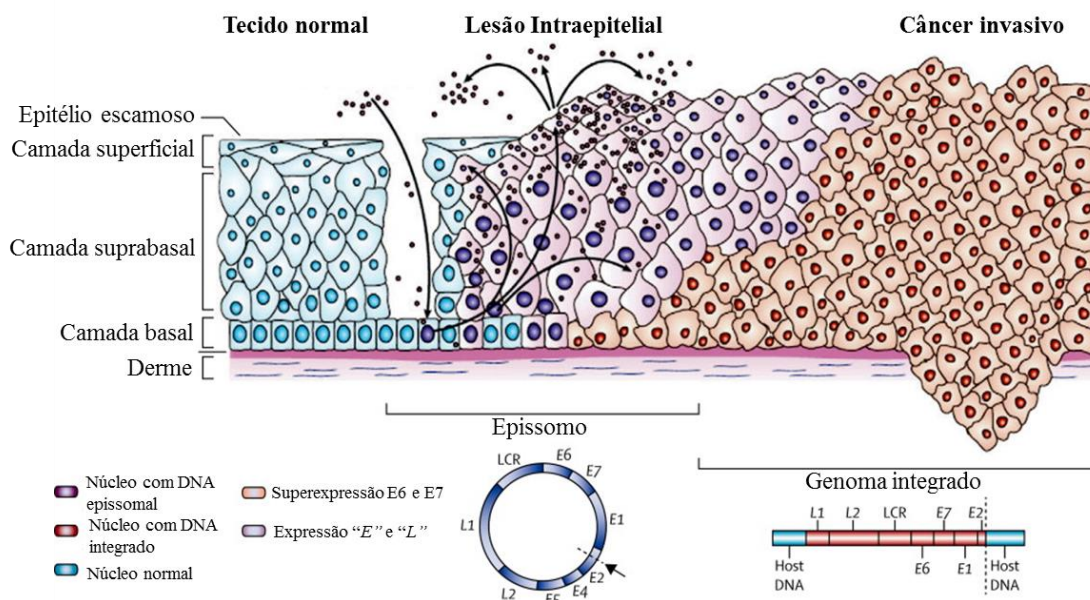
E7 de HPV de alto risco induz hiperproliferação celular através da inibição de proteínas da família RB (retinoblastoma), afeta a expressão de genes celulares pela interação com HDACs (Histonas deacetilases), induz dano ao DNA contribuindo ao acúmulo de alterações cromossômicas e inibe apoptose pela interação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

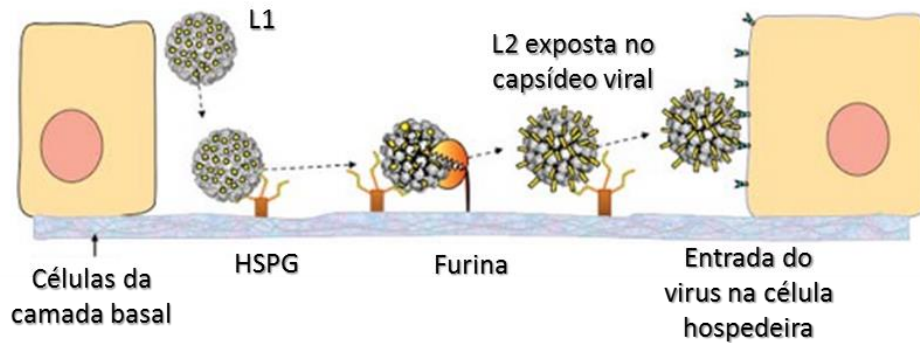
Fonte: Woodman; Collins; Young, 2007.

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, epítomos 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.

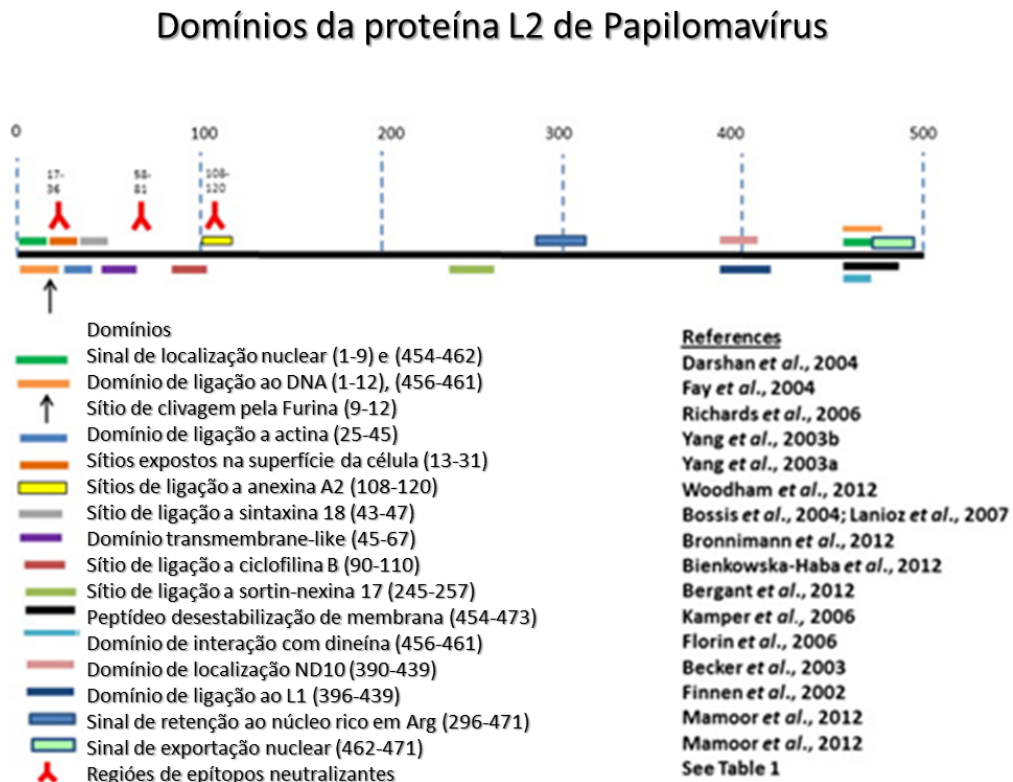


Diagrama dos epítomos capazes de gerar anticorpos neutralizantes e sítios de interação da proteína L2 com outras proteínas de diferentes vias celulares.

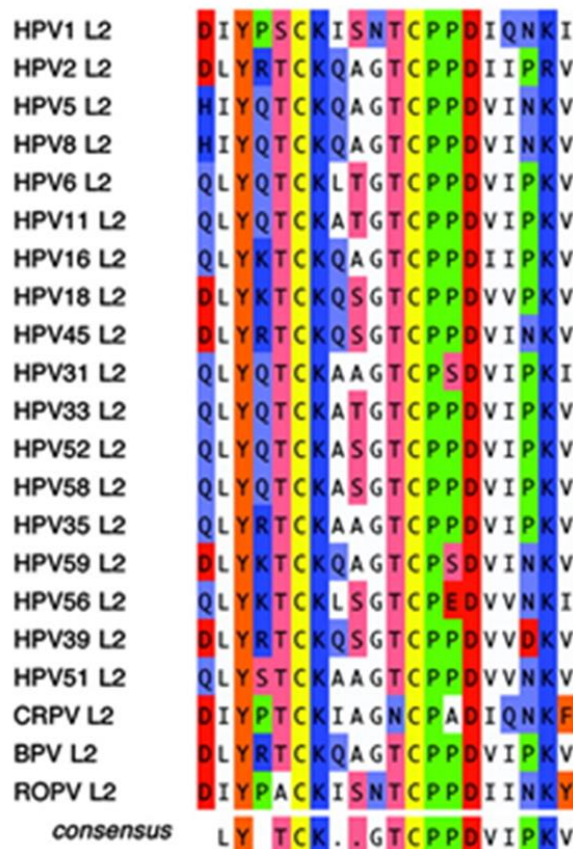
Fonte: Wang; Roden, 2013.

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 epítopo 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 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.; WIATRAK, 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.