

**ELIZABETH ALEXANDRA FLATOW**

**MODULAÇÃO FUNCIONAL DE CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS  
DERIVADAS DE MONÓCITOS MEDIADAS POR PROTEÍNAS RECOMBINANTES  
GERADAS DA FUSÃO GENÉTICA DA GLICOPROTEÍNA D DO HERPES VIRUS  
SIMPLEX-1 COM AS ONCOPROTEÍNAS E7 E E6 DO PAPILOMAVIRUS HUMANO  
16 (HPV-16)**

Tese apresentada ao Departamento de  
Imunologia do Instituto de Ciências  
Biomédicas da Universidade de São Paulo,  
para obtenção do Título de Doutora em  
Ciências.

São Paulo  
2023

**ELIZABETH ALEXANDRA FLATOW**

**MODULAÇÃO FUNCIONAL DE CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS  
DERIVADAS DE MONÓCITOS MEDIADAS POR PROTEÍNAS RECOMBINANTES  
GERADAS DA FUSÃO GENÉTICA DA GLICOPROTEÍNA D DO HERPES VIRUS  
SIMPLEX-1 COM AS ONCOPROTEÍNAS E7 E E6 DO PAPILOMAVIRUS HUMANO  
16 (HPV-16)**

Tese apresentada ao Departamento de  
Imunologia do Instituto de Ciências  
Biomédicas da Universidade de São Paulo,  
para obtenção do Título de Doutora em  
Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. José Alexandre M.  
Barbuto

Versão original

São Paulo  
2023

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Flatow, Elizabeth Alexandra

Modulação funcional de células dendríticas humanas derivadas de monócitos mediadas por proteínas recombinantes geradas da fusão genética da glicoproteína D do Herpes vírus simplex-1 (HSV-1) com as oncoproteínas E7 e E6 do Papilomavírus humano 16 (HPV-16) / Elizabeth Alexandra Flatow; orientador José Alexandre M. Barbuto. -- São Paulo, 2023.

107 p.

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

1. Células dendríticas. 2. HPV-16. 3. Proteína recombinante gDE7. I. Barbuto, José Alexandre M., orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato (a): Elizabeth Alexandra Flatow

Título da Dissertação: Modulação funcional de células dendríticas humanas derivadas de monócitos mediadas por proteínas recombinantes geradas da fusão genética da glicoproteína D do Herpes vírus simplex-1 (HSV-1) com as oncoproteínas E7 e E6 do Papilomavírus humano 16 (HPV-16)

Orientador: Prof. Dr. José Alexandre M. Barbuto

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

**Aprovado (a)**

**Reprovado (a)**

Examinador (a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinador (a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Presidente: Assinatura:.....

Nome: .....

Instituição: .....

## COMITÊ DE ÉTICA



USP - INSTITUTO DE  
CIÊNCIAS BIOMÉDICAS DA  
UNIVERSIDADE DE SÃO



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** Modulação funcional das células apresentadoras de antígenos humanas pela proteína recombinante gDE7 derivada do HPV

**Pesquisador:** ELIZABETH ALEXANDRA FLATOW

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 68362417.1.0000.5467

**Instituição Proponente:** Universidade de São Paulo

**Patrocinador Principal:** FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.146.422

#### Apresentação do Projeto:

Modulação funcional das células apresentadoras de antígenos humanas pela proteína recombinante gDE7 derivada do HPV

#### Objetivo da Pesquisa:

Investigar os efeitos da proteína gDE7 sobre a diferenciação e função de células dendríticas e macrófagos derivados in vitro a partir de monócitos do sangue periférico de doadores saudáveis e de pacientes diagnosticadas com neoplasia intraepitelial cervical de alto grau ou carcinoma in situ.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

No caso da pesquisa o risco está associado à coleta de sangue periférico para avaliação

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto bem escrito, com protocolos bem delineado e TCLE constando de todas as informações necessárias

#### Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos apresentados

#### Recomendações:

aprovar

Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, 2415

Bairro: Cidade Universitária

UF: SP

Telefone: (11)3091-7733

Município: SÃO PAULO

CEP: 05.508-000

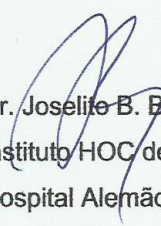
E-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 14 de Setembro de 2017

### AUTORIZAÇÃO

Em nome do Instituto HOC de Hemoterapia, autorizo a **Sra. Elizabeth Alexandra Flatow** a utilizar as câmaras LRS, peças integrantes dos kits descartáveis utilizados para a coleta de plaquetas por aférese leucorreduzidas, em pesquisa denominada “Modulação funcional de células apresentadoras de antígenos humanas por proteínas recombinantes derivadas do HPV”. As referidas câmaras contêm sangue residual com elevada quantidade de leucócitos e são removidas do kit imediatamente após sua utilização, com o consentimento escrito do doador de plaquetas para a utilização de seu conteúdo em pesquisas institucionais.

Atenciosamente.

  
Dr. Josélio B. Brandão, diretor médico  
Instituto HOC de Hemoterapia  
Hospital Alemão Oswaldo Cruz



USP - INSTITUTO DE  
CIÊNCIAS BIOMÉDICAS DA  
UNIVERSIDADE DE SÃO



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Neoplasias induzidas por papilomavírus humano (HPV): um novo enfoque terapêutico baseado em imunoterapia ativa pela estimulação direcionada de células dendríticas.

**Pesquisador:** BRUNA FELICIO MILAZZOTTO MALDONADO PORCHIA

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 82581317.5.0000.5467

**Instituição Proponente:** Universidade de São Paulo

**Patrocinador Principal:** FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.571.752

#### **Apresentação do Projeto:**

A presente proposta de estudo refere-se ao desenvolvimento de uma imunoterapia para o tratamento de neoplasias intraepiteliais cervicais de alto grau (NIC 2/3) ou de carcinoma in situ induzidos por HPV-16 ou HPV-18.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

Os objetivos já foram apreciados por ocasião da apresentação inicial do projeto. Nessa etapa estão sendo apresentados esclarecimentos às pendências.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Sem alteração em razão desses esclarecimentos.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Os questionamentos foram adequadamente atendidos tendo sido esclarecido que voluntários sadios correspondem a doadores de sangue cujas câmaras de leucorredução serão direcionadas para a presente pesquisa. Esses doadores assinarão um TCLE que está adequado. O Responsável pelo banco de sangue do Hospital Oswaldo Cruz forneceu carta de autorização.

Foi também esclarecida a questão do volume de sangue a ser coletado das pacientes.

**Endereço:** Av. Profº Lineu Prestes, 2415

**Bairro:** Cidade Universitária

**UF:** SP

**Município:** SÃO PAULO

**Telefone:** (11)3091-7733

**CEP:** 05.508-000

**E-mail:** cep@lcb.usp.br



**Projeto de Pesquisa:**  
Neoplasias Induzidas por papilomavirus humano (HPV): um novo enfoque terapêutico baseado em imunoterapia ativa pela estimulação direcionada de células dendríticas.

**Informações Preliminares**

**Responsável Principal**

CPF/Documento: 314.743.208-48	Nome: BRUNA FELICIO MILAZZOTTO MALDONADO PORCHIA RIBEIRO
Telefone: 18981375819	E-mail: brumaldonado@gmail.com

**Instituição Proponente**

CNPJ: 63.025.530/0005-38	Nome da Instituição: Universidade de São Paulo
--------------------------	--

Essa submissão de emenda é exclusiva do seu Centro Coordenador?

A emenda é exclusiva de seu Centro Coordenador, então as alterações realizadas em seu projeto, em virtude da emenda, NÃO serão replicadas nos Centros Participantes vinculados e nos Comitês de Ética das Instituições Coparticipantes, quando da sua aprovação.

É um estudo internacional? Não

**Equipe de Pesquisa**

CPF/Documento	Nome
014.376.048-38	Maricy Tacla
826.230.828-04	Edmund Chada Baracat
035.542.504-14	ELIZABETH ALEXANDRA FLATOW
163.008.688-69	Patrícia Cruz Bergami Santos
863.367.546-34	José Maria Soares Junior
007.286.078-24	José Alexandre Marzagão Barbuti
439.911.497-53	LUIS CARLOS DE SOUZA FERREIRA
056.222.865-90	KARINE BITENCOURT RODRIGUES

**Área de Estudo**

**Área Temática Especial**

Novos procedimentos terapêuticos invasivos;

**Grandes Áreas do Conhecimento (CNPq)**

- Grande Área 2. Ciências Biológicas
- Grande Área 4. Ciências da Saúde

**Propósito Principal do Estudo (OMS)**

- Clínico

**Título Público da Pesquisa:** Neoplasias Induzidas por papilomavirus humano (HPV): um novo enfoque terapêutico baseado em imunoterapia ativa pela estimulação direcionada de células dendríticas.

**Contato Público**

CPF/Documento	Nome	Telefone	E-mail
314.743.208-48	BRUNA FELICIO MILAZZOTTO MALDONADO PORCHIA RIBEIRO	18981375819	brumaldonado@gmail.com

**Contato Científico:** BRUNA FELICIO MILAZZOTTO MALDONADO PORCHIA RIBEIRO





**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

Elaborado pela Instituição Coparticipante

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Neoplasias induzidas por papilomavírus humano (HPV): um novo enfoque terapêutico baseado em imunoterapia ativa pela estimulação direcionada de células dendríticas.

**Pesquisador:** BRUNA FELICIO MILAZZOTTO MALDONADO PORCHIA RIBEIRO

**Área Temática:**

**Versão:** 4

**CAAE:** 82581317.5.3001.0068

**Instituição Proponente:** Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

**Patrocinador Principal:** FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 3.256.760

**Apresentação do Projeto:**

O estudo visa a utilização de uma abordagem imunoterapêutica baseada em células dendríticas derivadas de monócitos (Mo-DCs) autólogas sensibilizadas in vitro com a proteína gDE7E6 em associação com células dendríticas derivadas de monócitos alogênicas, no tratamento de pacientes portadoras de neoplasia intraepitelial cervical de alto grau 2/3 ou carcinoma in situ induzidos pela infecção por HPV-16 ou HPV-18. Projeto a ser desenvolvido como pós-doutorado de Bruna FMM Porchia em colaboração com o NUCEL, Hospital Alemão Oswaldo Cruz e Disciplina de Ginecologia da FMUSP. O projeto já foi aprovado pela CONEP.

**Objetivo da Pesquisa:**

Utilização de uma abordagem imunoterapêutica baseada em Mo-DCs autólogas sensibilizadas in vitro com a proteína gDE7E6 em associação com Mo-DCs alogênicas, no tratamento de pacientes portadoras de NIC 2/3 ou carcinoma in situ induzidos pela infecção por HPV-16 ou HPV-18. O estudo propõe o monitoramento de parâmetros clínico-oncológicos e imunológicos de pacientes com diagnóstico histológico de neoplasia intraepitelial de alto grau (NIC 2/3) ou carcinoma in situ induzido pela infecção pelo HPV-16 ou HPV-18 submetidas a protocolo de vacinação terapêutica.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Poderá haver benefícios terapêuticos para as pacientes com de neoplasia intraepitelial cervical de alto grau ou carcinoma in situ em decorrência da administração da vacina. Os benefícios podem se

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar  
**Bairro:** Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010  
**UF:** SP **Município:** SÃO PAULO  
**Telefone:** (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappelq.adm@hc.fm.usp.br

PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** Neoplasias induzidas por papilomavírus humano (HPV): um novo enfoque terapêutico baseado em imunoterapia ativa pela estimulação direcionada de células dendríticas.

**Pesquisador:** BRUNA FELICIO MILAZZOTTO MALDONADO PORCHIA RIBEIRO

**Área Temática:** Novos procedimentos terapêuticos invasivos;

**Versão:** 0

**CAAE:** 82581317.5.0000.5467

**Instituição Proponente:** Universidade de São Paulo

**Patrocinador Principal:** FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.182.019

**Apresentação do Projeto:**

As informações contidas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram obtidas dos documentos Informações Básicas da Pesquisa (PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_1234302\_E1.pdf de 13/02/2019) e do Projeto Detalhado.

INTRODUÇÃO

O câncer cervical é atualmente o quarto tipo de câncer mais comum em mulheres. A incidência estimada deste tipo de câncer é de 500 mil novos casos anuais que resultam em aproximadamente 250 mil mortes todos os anos no mundo (1,2). Cerca de 90% destas mortes ocorrem em regiões em desenvolvimento do globo e refletem falhas na disponibilidade de programas de rastreamento para este tipo de câncer. Existem vacinas que previnem a infecção pelo HPV, principal agente etiológico do câncer cervical. No entanto, o impacto esperado na incidência destes tumores será observado somente daqui duas ou três décadas, caso a cobertura vacinal seja elevada particularmente nos grupos de risco (2). De acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA), cerca de 5.430 mulheres morreram em decorrência desta doença no ano de 2013 no Brasil e cerca de 16.340 novos casos de câncer cervical foram notificados em 2016 no país. De acordo com essas estatísticas, o câncer cervical é o terceiro tipo de câncer mais frequente e o quarto mais letal em mulheres no país. Os tratamentos atualmente disponíveis são baseados em cirurgia,

**Endereço:** SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar

**Bairro:** Asa Norte

**CEP:** 70.719-049

**UF:** DF

**Município:** BRASÍLIA

**Telefone:** (61)3315-5877

**E-mail:** conep@saude.gov.br

**Ao meu esposo Herbert e  
aos meus pais Ênio e Cecília (*in memoriam*),  
com amor.**

**Àqueles que acreditam na ciência.**

## AGRADECIMENTOS

À minha família: meu esposo Herbert e meus filhos de quatro patas Olivia, Manfred e Jorge, por todo amor, companheirismo e paciência. Vocês são a motivação para eu levantar todas as manhãs!

À minha mãe, Cecília, por quem choro todos os dias de saudade. Perder você tão cedo me dói tanto e tornaram as coisas mais difíceis nos últimos meses.

Ao meu pai Ênio, meus irmãos Bia e Paulinho, minha avó Lurdinha, espero que se orgulhem de mim.

Aos meus sogros Jandira e Herbert (*in memoriam*), pelo incentivo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Alexandre M. Barbuto, por ter me dado a oportunidade de trabalhar novamente em seu laboratório, pela sua compreensão, aprendizado e paciência. Saber acolher, incentivar, reconhecer as características de cada um e mostrar o lado positivo de tudo é para poucos! Serei eternamente grata!

Às amigas Gabi e Carla - nem posso descrever o carinho e gratidão que sinto. Vocês são como irmãs mais novas na idade e mais velhas em conselhos, sensatez e apoio! Parte disso foi por vocês não terem soltado a minha mão!

Às amigas Sarah, Mari, Nadia, Jaque, Patty, Nataly, Livia, Joyce. Vocês são a melhor rede de apoio!

Aos colegas de laboratório que passaram nesses anos: Thiago, Aline, Célia, Liz, Bárbara, Maria, Salomão, Renata, Renato, Letícia e Giovanna, por compartilharmos conhecimento e momentos de descontração.

À Laura, a melhor psicoterapeuta, pela paciência e momentos de reflexão.

À minha banca de qualificação, Profa. Dra. Ana Paula Lepique, Profa. Dra. Silvia Boscardin e Profa. Dra. Ana Campa, pelas sugestões e discussões.

À Bruna, Karine, Prof. Luís Carlos e demais colaboradores do Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas (ICB/USP), pelas proteínas recombinantes, aprendizado e colaborações.

Ao grupo da Profa. Dra. Mayana Zatz, Thiago Mitsugi, Carolini Kaid e Oswaldo Okamoto pela colaboração com o experimento de *PCR array*.

Às minhas novas amigas do Centro de Ensino e Pesquisa do Hospital Albert Einstein pela contribuição e compreensão na reta final da tese: Fernanda e Priscila. À Dra. Luciana Marti e demais colegas de trabalho Carol, Larissa, Zayane e Caio pelo apoio.

Aos secretários do Departamento de Imunologia Eni, João, Amanda e Jotelma, sempre dispostos a ajudar.

Aos professores e demais funcionários do departamento.

Aos colegas de disciplinas e colaborações durante esses anos de ICB (iniciação científica, treinamento técnico, mestrado e doutorado).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida (Processo: 88882-327976/2019-1).

*Os últimos anos foram difíceis, espero não ter esquecido pessoas importantes que contribuíram para que eu não desistisse e chegasse até aqui.*

*A todos vocês meu MUITO OBRIGADA!*

*“as mudanças mais bonitas  
não vêm com calma e sossego  
são uma ventania incontrolável  
jogando tudo par cima  
nada cai no mesmo lugar  
nem as coisas  
nem o coração  
nem você*

*o tempo fechado nos abre”*

*(Ryane Leão)*

## RESUMO

Flatow, E.A. **Modulação funcional de células dendríticas humanas derivadas de monócitos mediadas por proteínas recombinantes geradas da fusão genética da glicoproteína D do Herpes vírus simplex-1 (HSV-1) com as oncoproteínas E7 e E6 do Papilomavírus humano 16 (HPV-16)**. 2023. 107 f. Tese (Doutorado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

O câncer cervical é uma das principais causas de morte em mulheres, e está associado à infecção persistente pelo papilomavírus humano (HPV). Vacinas terapêuticas usando as oncoproteínas E6 e E7 do HPV têm sido investigadas como novas abordagens para o tratamento. Em uma destas, a utilização de uma proteína recombinante consistindo da fusão genética da glicoproteína D do Herpes vírus simples 1 (HSV-1) com a proteína E7 do HPV-16 (gDE7) resultou em proteção completa e de longa duração em camundongos desafiados com células tumorais que expressavam as oncoproteínas E6 e E7 do HPV-16. No presente trabalho, investigamos os efeitos de gDE7, associada ou não à oncoproteína E6 do HPV-16, sobre o fenótipo e função de células dendríticas derivadas de monócitos humanos *in vitro* (Mo-DCs), de doadores saudáveis e de pacientes diagnosticados com neoplasia intraepitelial cervical (NIC) graus 2/3. Nossos resultados mostraram que Mo-DCs de doadores saudáveis tratadas por 48 horas com gDE7 tem expressão aumentada de CD86 e de CD83. Este tratamento também induz secreção de citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-12p70 pelas Mo-DCs. Nestas mesmas células, por *PCR array*, foi observado aumento de expressão de genes envolvidos na ativação das Mo-DCs e na apresentação de antígenos e diminuição de genes envolvidos na regulação da resposta imune. Já em Mo-DCs de pacientes NIC 2/3, gDE7 induziu aumento da molécula coestimuladora CD80 e de sua capacidade de estimulação da proliferação de linfócitos T CD4+. Esses resultados indicam que gDE7 tem o potencial de ativar Mo-DCs de doadores saudáveis e de pacientes portadoras de NIC 2/3 e abrem a perspectiva de exploração desse potencial na elaboração de novas abordagens terapêuticas, baseada em nestas células para tratar lesões no colo do útero associadas a infecções causadas por HPV-16+

**Palavras-chave:** Células dendríticas. HPV-16. Proteína recombinante gDE7.

## ABSTRACT

Flatow, E.A. **Modulation of human monocyte-derived dendritic cells mediated by recombinant proteins derived from the gene fusion of Herpes vírus simplex-1 (HSV-1) glycoprotein D with the Human papillomavirus 16 (HPV-16) E7 and E6 oncoproteins.** 2023. 107 f. Ph.D these (Immunology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Cervical cancer is one of the leading causes of death in women and is associated with persistent infection by human papillomavirus (HPV). Therapeutic vaccines using HPV oncoproteins E6 and E7 have been investigated as new approaches for treatment. In one of these approaches, the use of a recombinant protein consisting of the genetic fusion of glycoprotein D from Herpes simplex virus 1 (HSV-1) with the E7 protein of HPV-16 (gDE7) resulted in complete and long-lasting protection in mice challenged with tumor cells expressing HPV-16 E6 and E7 oncoproteins. In this study, we investigated the effects of gDE7, with or without HPV-16 E6 oncoprotein, on the phenotype and function of monocyte-derived human dendritic cells in vitro (Mo-DCs) from healthy donors and patients diagnosed with cervical intraepithelial neoplasia (CIN) grades 2/3. Our results showed that Mo-DCs from healthy donors treated for 48 hours with gDE7 had increased expression of CD86 and CD83. This treatment also induced secretion of pro-inflammatory cytokines TNF- $\alpha$  and IL-12p70 by Mo-DCs. In these same cells, by PCR array, an increase in expression of genes involved in Mo-DC activation and antigen presentation and a decrease in genes involved in immune response regulation were observed. In Mo-DCs from CIN 2/3 patients, gDE7 induced an increase in the co-stimulatory molecule CD80 and its ability to stimulate proliferation of CD4+ T lymphocytes. These results indicate that gDE7 has the potential to activate Mo-DCs from healthy donors and CIN 2/3 patients and open the prospect of exploring this potential in the development of new therapeutic approaches based on these cells to treat cervical lesions associated with HPV-16+ infections.

**Keywords:** Dendritic cells. HPV-16. Recombinant protein gDE7.



## LISTA DE SIGLAS

APC – *Antigen Presenting Cell*

Batf3 – *Basic Leucine Zipper Transcriptional Factor ATF-like 3*

BMDCs - *Bone Marrow Derived DCs*

BTLA – *B and T lymphocyte attenuation*

CBA – *Cytometric Bead Array*

CD – *Cluster of Differentiation*

cDC – Célula dendrítica convencional

Célula NK – *Natural Killer*

CFSE – *Carboxyfluorescein Diacetate Succinidimyl Ester*

CNA – Células não aderentes

CR3 – Receptor para o fragmento C3 do complemento

CRD1 – Domínio Rico em Cisteína 1

CTL – Linfócito T Citotóxico

DC – Célula Dendrítica

DR3 – *Death Receptor 3*

E1, E2, E4, E5, E6 e E7 – Genes de Expressão Imediata ou *Early*

Fc – Fragmento Cristalizável de imunoglobulinas

FcR – Receptor para o domínio do Fragmento cristalizável de imunoglobulinas

FMO – *Fluorescence Minus One*

FoxP3 - *Forkhead Box P3*

gD – glicoproteína D

gDE7 – Glicoproteína D do HSV-1 com a oncoproteína E7 do HPV16

GITR – *Glucocorticoid-induced TNFR family-related Protein*

HCFMUSP – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

HPV - *Human Papillomavirus*

HSV-1 – Herpes simplex virus-1

HVEM – *Herpes Vírus Entry Mediator*

iDC – Célula dendrítica imatura

IFN – Interferon

IKK $\beta$ / $\alpha$  – I $\kappa$ B quinase/I $\beta$ / $\alpha$  quinase

IL – Interleucina

ILC – *Innate Lymphoid Cell*

INCA – Instituto Nacional do Câncer

IRF – *Interferon Regulatory Factor*

L1 e L2 – Genes de Expressão Tardia ou *Late*

LC – Célula de Langerhans

LCR – Cadeia Longa de Controle

LIGHT – *Lymphotoxin-related Inducible ligand that competes for Glycoprotein D binding to HVEM on T cells*

LT- $\alpha$  – *Lymphotoxin  $\alpha$*

MDSC - *Myeloid-derived Supressor Cell*

MFI – Mediana da Intensidade de Fluorescência

MHC - *Major Histocompatibility Complex*

Mo-DC – Célula dendrítica derivada de monócitos

NCCR – Região Não Codificante

NIC – Neoplasia Intraepitelial Cervical

PBMC – *Peripheral Blood Monocyte Cell*

PD-1 – *Programmed Cell Death Protein 1*

pDC – Célula dendrítica plasmocitoide

PD-L1/PD-L2 – *Programmed Death Ligand 1/2*

PHA – fitohemaglutinina

PLC – Complexo Carreador de Peptídeos

PMC - Progenitores mieloides comuns

PMN – Células polimorfonucleares

PRR - *Pattern Recognition Receptors*

RMFI – Mediana de Intensidade de Fluorescência Relativa

TAP – *Transporter Associated with Antigen Processing*

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Th – Linfócito T *helper*

TIL – Linfócitos T infiltrantes no tumor

TLR - *Toll Like Receptor*

TNFR2 – *Tumor Necrosis Factor Receptor 2*

TNF- $\alpha$  - *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$*

Treg – Linfócitos T reguladores

URR – Região Regulatória *Upstream*

VLP - *Virus-like Particles*

ZEB2 – *Zinc Finger E-box-binding Homeobox 2*

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA</b> .....	22
1.1 <i>Sistema Imunológico e Células Dendríticas</i> .....	22
1.2 <i>Câncer Cervical e HPV</i> .....	33
1.3 <i>Modelo da proteína recombinante gDE7</i> .....	37
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	42
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	43
3.1 <i>Casuística:</i> .....	43
3.2 <i>Proteínas recombinantes</i> .....	43
3.3 <i>Processamento de sangue e obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs)</i> .....	44
3.4 <i>Diferenciação de Mo-DCs in vitro a partir de PBMCs</i> .....	45
3.5 <i>Determinação do fenótipo de membrana das Mo-DCs</i> .....	46
3.6 <i>Ensaio de indução de proliferação de linfócitos T por Mo-DCs</i> .....	48
3.7 <i>Deteção da produção de citocinas</i> .....	50
3.8 <i>RT-qPCR Array</i> .....	51
3.9 <i>Forma de análise dos resultados</i> .....	53
<b>4. RESULTADOS</b> .....	54
4.1 <i>Polimixina B neutraliza efeitos do LPS sobre a ativação de Mo-DCs</i> .....	54
4.2 <i>Efeito da proteína recombinante E6 em diferentes concentrações ou combinada com gDE7 na ativação de Mo-DCs de doadores saudáveis</i> .....	56
4.3 <i>Avaliação do efeito das proteínas recombinantes E7, gD e gDE7 em diferentes concentrações sobre a ativação de Mo-DCs de doadores saudáveis</i> .....	57
4.4 <i>Avaliação do efeito das proteínas recombinantes E7, gD e gDE7 sobre Mo-DCs de doadores saudáveis</i> .....	57

<i>4.5 Mo-Dcs secretam citocinas pró-inflamatórias em resposta ao estímulo por E7, gD e gDE7.....</i>	<i>62</i>
<i>4.6 Linfo-estimulação alogênica por Mo-DCs ativadas com E7, gD e gDE7 .....</i>	<i>64</i>
<i>4.7 gD e gDE7 induzem ativação de Mo-DCs após 48 horas de ativação .....</i>	<i>65</i>
<i>4.8 Ensaios de ativação de Mo-DCs de pacientes HPV16+ por gD e gDE7 .....</i>	<i>69</i>
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>75</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>85</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>86</b>

## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

### 1.1 Sistema Imunológico e Células Dendríticas

O sistema imunológico é composto por uma complexa rede de células, tecidos e órgãos, além das substâncias e processos químicos que eles produzem após o reconhecimento, por receptores clonais distribuídos nos linfócitos T e B, de moléculas chamadas de antígenos. Deste modo, o sistema imune pode ser definido como um sistema de reconhecimento molecular que tem como função manter a homeostasia, promovendo a eliminação de agentes que levam à perda deste estado, tais como toxinas, vírus, bactérias, fungos e parasitas, mas também células do próprio organismo que tenham escapado dos controles fisiológicos e que tenham, portanto, potencial cancerígeno (MARSHALL *et al.*, 2018) O sistema imunológico exerce suas funções através de diferentes mecanismos, que, didaticamente são divididos entre duas linhas de defesa: imunidade inata e imunidade adaptativa.

Os principais mecanismos da imunidade inata são: evitar a entrada de componentes estranhos usando barreiras físicas e químicas; prevenir a disseminação da infecção por meio de mediadores humorais, como a cascata do complemento; remover o “não-próprio” via fagocitose ou mecanismos citotóxicos. As principais células fagocíticas são os neutrófilos e os macrófagos. As células dendríticas (DCs), embora tenham atividade fagocítica, exercem papel muito secundário na imunidade inata, mas, são essenciais para desencadear a imunidade adaptativa, por serem as principais células apresentadoras de antígenos (APCs, do inglês *Antigen Presenting Cells*). A resposta inata é caracterizada por sua rapidez e independência de exposição prévia aos agentes agressores, não gerando, portanto, memória imunológica e evolutivamente desenvolveu-se antes da resposta imune adaptativa (TURVEY, BROIDE, 2009). Sabe-se também que, a imunidade inata pode desencadear e modificar a resposta adaptativa, por meio das citocinas nela produzidas e das células recrutadas para os tecidos onde ela se desenrola. Geralmente, uma vez que a imunidade inata é ativada, ela gera sinais que desencadeiam uma resposta adaptativa aos antígenos presentes no tecido inicialmente lesado, tornando o organismo capaz de responder mais rápida, específica e eficazmente a agressões associadas a tais antígenos (BONILLA, OETTGEN, 2010).

Já a resposta adaptativa é gerada pela ativação específica dos linfócitos B e T, sendo os linfócitos B responsáveis produção de anticorpos, ao se diferenciarem em plasmócitos, e os linfócitos T por funções que vão do auxílio à produção de anticorpos, como linfócitos auxiliares, à efetuação direta da resposta, como linfócitos T citotóxicos, mas passando por diversas outras funções, quer como auxiliares, quer como reguladores da resposta. Essa resposta é caracterizada por se manifestar mais lentamente, uma vez que depende da expansão clonal dos linfócitos que carregam receptores específicos para os antígenos contra os quais é dirigida. Assim, embora leve dias para se tornar possível detectá-la no primeiro contato com determinado antígeno, em contatos subsequentes ela se desenvolve muito mais rapidamente, o que define o fenômeno da “memória imunológica”. Esta memória, sendo a manifestação de resposta específica, ao contrário da resposta inata, inespecífica, é capaz de controlar muito mais eficazmente os agentes agressores que a desencadeiam, conferindo proteção duradoura ao organismo (FU, 2022).

As principais células que compõem o sistema imunológico, os leucócitos, são geradas na medula óssea. Estes se dividem em linhagem mieloide, como os granulócitos (neutrófilos, basófilos, eosinófilos), monócitos e os macrófagos dele derivados e linhagem linfoide, que engloba os linfócitos (T e B), células NK (do inglês, *natural killers*) e outras “células linfoides inatas” (ILCs, do inglês *innate lymphoid cells*). As células envolvidas na resposta inata, tanto de origem linfoide, quanto de origem mieloide, contribuem para moldar a imunidade adaptativa subsequente. Especificamente, as células dendríticas (DCs) representam uma população de células heterogêneas que iniciam a resposta adaptativa atuando ao reconhecer e processar antígenos, e apresentar tais antígenos aos linfócitos T (GUERMONPREZ *et al*, 2002; THÉRY, AMIGORENA, 2001). Essas células apresentam origem e perfil heterogêneos, o que é mais discutido a seguir.

As DCs foram descritas, como células do sistema imunológico, e caracterizadas por Steinman e Cohn em 1973 (STEINMAN, COHN, 1973) e são consideradas as principais células apresentadoras de antígenos do sistema imunológico (BANCHEREAU *et al*. 2000; BANCHEREAU, STEINMAN, 1998; REIS E SOUSA 2004). As DCs têm a habilidade, única, de iniciar as respostas imune adaptativas ao ativar células T *naïve* e, por isso também têm sido reconhecidas como as mais

potentes células apresentadoras “profissionais” de antígenos (GUERMONPREZ *et al.*, 2002; STEINMAN, 1991).

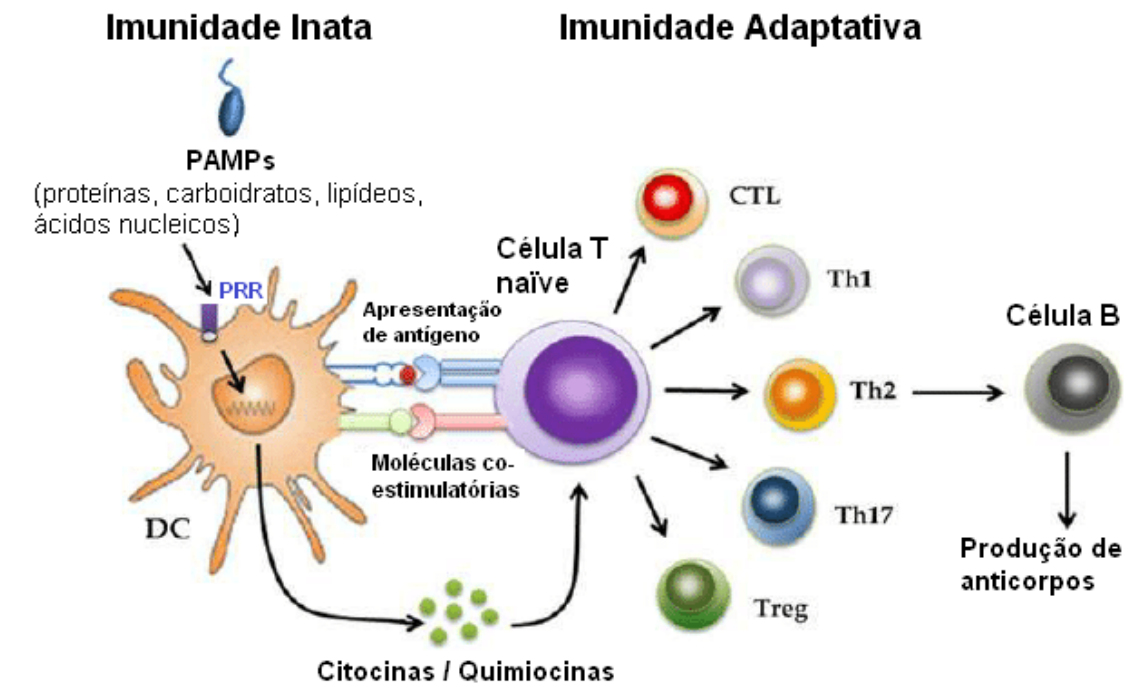
As DCs estão presentes na maioria dos tecidos e, em um estado “imaturo”, atuam como sentinelas imunológicas. Nesse estado, elas são melhores em capturar e endocitar via receptores como lectinas, receptores do tipo Toll (TLRs, do inglês, *Toll Like Receptors*), receptores para domínio Fc (fragmento cristalizável) de imunoglobulinas (FcR) e receptor para o fragmento C3 de complemento (CR3) (TOHYAMA, YAMAMURA, 2006) Todavia, uma vez detectada uma perturbação homeostática, diretamente pelos PRR (do inglês *pattern recognition receptors – PRR*) das DCs, ou, indiretamente, pelas citocinas ou outros mediadores presentes no microambiente onde as DCs se encontram, estas células sofrem uma mudança fisiológica, passando a um estado de células “ativadas” ou “maduras”. Uma vez ativadas, ocorre na DC a reorganização de estruturas celulares que levam ao aumento de motilidade e à diminuição da capacidade fagocítica da mesma para aumentar sua capacidade de apresentação de antígenos, capturados no microambiente onde ocorreu a perturbação homeostática, no contexto de moléculas de classe I e II codificadas pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês *Major Histocompatibility Complex*). Esta maturação depende de mudanças metabólicas, fenotípicas e morfológicas, como o aumento da expressão do receptor de quimiocina CCR7, a translocação de moléculas do MHC para a superfície da célula, aumento da expressão de moléculas coestimuladoras como CD80 e CD86, além de secreção de determinadas quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias (BANCHEREAU, STEINMAN, 1998; REIS E SOUSA, 2006). Assim, esta DC ativada migra para os órgãos linfóides secundários onde terá maior probabilidade de encontrar linfócitos T capazes de reconhecer os antígenos que está apresentando no contexto de suas moléculas do MHC.

Nesse contexto, as DCs podem ativar células T CD4 via MHC-II, e células T CD8 via MHC-I (THÉRY, AMIGORENA, 2001). As células T CD8<sup>+</sup>, quando ativadas, podem exercer atividade citotóxica, enquanto os linfócitos T CD4<sup>+</sup>, de acordo com o sinal recebido durante a apresentação de antígenos, diferenciam-se em várias subpopulações, entre as quais as dos linfócitos Th (*helper*) 1, Th2, Th17, ou ainda T reguladores. As células Th1 caracterizam-se pela produção de interferon (IFN)- $\gamma$  e pela expressão do fator de transcrição T-bet, enquanto as células Th2 produzem



interleucina (IL)-4, IL-5 e IL-13 e expressam o fator de transcrição GATA-3. Th1 e Th2 contribuem de maneiras distintas para eliminação de patógenos; vírus e bactérias intracelulares são, tipicamente, controlados por respostas de padrão Th1 e helmintos por resposta de padrão Th2 (GROGAN *et al.*, 2001; MOSMANN *et al.*, 1986). Um outro subtipo, Th17, caracterizado pela expressão do fator de transcrição ROR- $\gamma$ t, secreta IL-17 e tem papel relevante na resposta contra bactérias extracelulares e fungos, com significativa ativação de neutrófilos (PARK *et al.*, 2005). Além desses, os linfócitos T reguladores (Treg), se caracterizam pela expressão elevada do receptor de alta afinidade para IL-2 (CD25) e pela presença do fator de transcrição FoxP3 (do inglês, *Forkhead Box P3*) (SAKAGUCHI *et al.*, 2010). As DCs, na presença de TGF- $\beta$ , induzem a diferenciação dessas células. Portanto, a combinação do tipo de DC, a via da apresentação de antígenos e os sinais coestimuladores podem direcionar a resposta imune, ativando T CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup> ou induzindo à tolerância imunológica através da ativação de células T reguladoras (JONULEIT, SCHMITT, 2003; NEVES *et al.*, 2012) (**Figura 1**).

Os diferentes tipos de DCs têm sido classificados baseados nas suas características como ontogenia, localização, expressão de marcadores de superfície e especialização funcional. Dentro desta classificação, podemos descrever populações heterogêneas, como as clássicas ou convencionais (cDCs), as plasmocitóides (pDCs), as DCs derivadas de monócitos (Mo-DCs) e as células de Langerhans (LCs) (VILLANI *et al.*, 2017; WCULEK *et al.*, 2019) A **figura 2** cita moléculas expressas na superfície dessas subpopulações de DC, bem como fatores de transcrição e funções que diferem esses subtipos.



**Figura 1. Representação do reconhecimento e processamento antigênico por uma célula dendrítica.** DC ativando linfócito T *naíve* pela interação do TCR com antígeno no MHC e ligação de moléculas coestimuladoras além da secreção de citocinas que induzem a diferenciação em diferentes subtipos de linfócitos T, e também a subsequente ativação de linfócitos B. (Adaptado de NEVES *et al.*, 2012).

Enquanto as LCs e Mo-DCs surgem a partir de progenitores comuns a monócitos, as pDCs e cDCs se originam de progenitores mielóides comuns (PMCs) (BANDOLA-SIMON, ROCHE, 2018; FU *et al.*, 2018; GARDNER, PULIDO, RUFELL, 2020; WCULEK *et al.*, 2019).

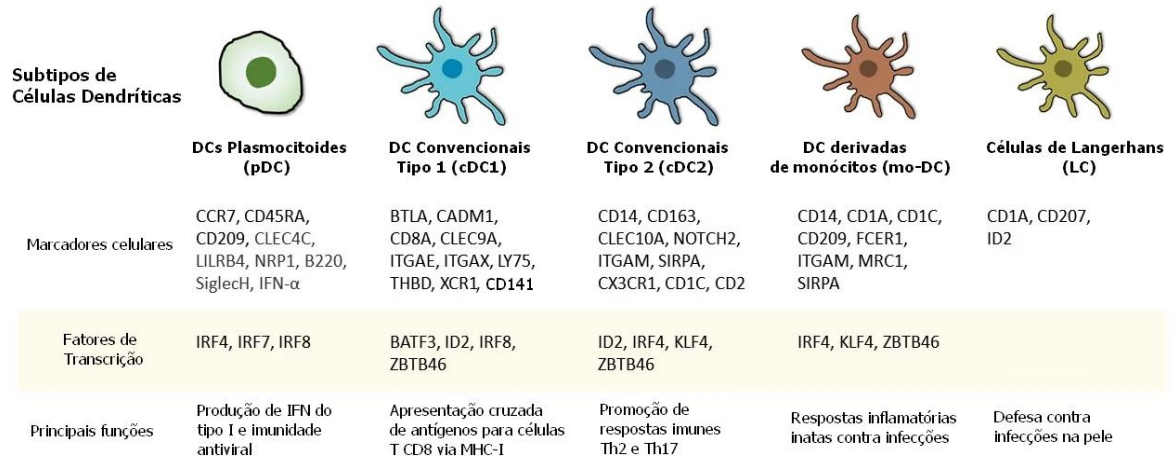
As LCs são encontradas na epiderme basal e outros epitélios escamosos estratificados, com a principal função de manter esses tecidos saudáveis, além de garantir a tolerância aos microrganismos comensais. Expressam langerina, lectina do tipo C e CD1a e, em humanos, podem ser maturadas com capacidade de realizar apresentação cruzada, com alta produção de IL-15, estimulando células T CD8 (BANCHEREAU *et al.*, 2012; ROMANO *et al.*, 2012).

As Mo-DCs são conhecidas como as “células dendríticas inflamatórias”. Tem sido descrito que elas expressam CD206 e CD209, retêm a expressão de CD14, mas variam quanto à expressão de outros marcadores. *Ex vivo*, elas secretam IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-12 e IL-23, estimulam células T CD4 e T CD8 e expressam CCR7, e *in vitro* podem ser derivadas de monócitos na presença de GM-CSF e IL-4 (COLLIN, BIGLEY, 2018).

Dentre as DCs de origem a partir de PMCs, as pDCs representam um pequeno subtipo de DCs que são caracterizadas, principalmente, pela expressão de CD123, CD303 (BDCA-2) e CD304 (BDCA-4) (DZIOONEK *et al.*, 2000) e além de baixos níveis de MHC de classe II, moléculas coestimuladoras e CD11c (MERAD, HELFT, MORTHA, 2013). As pDCs possuem diversos receptores de superfície que estão intimamente envolvidos na regulação de sua principal função fisiológica que é a produção de interferon do tipo I (IFN- $\alpha$ ), além de secretar IFN-III e outras citocinas. Elas produzem IFN do tipo I em resposta às infecções virais pela estimulação de TLR-7 e TLR-9 (LANDE *et al.*, 2007; REIZIS *et al.*, 2011) e são capazes de ativar de maneira eficiente linfócitos T citotóxicas. Seu principal fator de transcrição para produção de IFN-I é o IRF-7 (BAO, LIU, 2013; SWIECKI, COLONNA, 2015)

Em contrapartida, as DCs chamadas convencionais, também originárias de PMCs, têm grande habilidade de reconhecimento e captura de antígenos, sendo especializadas no processamento e apresentação eficiente de antígenos endógenos ou exógenos, via MHC de classe I e II, respectivamente. Além disso, são separadas em subtipos cDC1 e cDC2 que diferem quanto à dependência de fatores transcricionais, fenótipos e função (PATENTE *et al.*, 2019).

Quanto aos fatores transcricionais, as cDC1 dependem do fator regulatório de interferon 8 (do inglês, *interferon regulatory factor* - IRF8) e do *basic leucine zipper transcriptional factor ATF-like 3* (Batf3), enquanto as cDC2 dependem de IRF4 e do *zinc finger E-box-binding homeobox 2* (ZEB2) para seus desenvolvimentos. Em relação ao fenótipo, as cDC1 humanas se caracterizam pela expressão de BDCA-3+ (CD141+) enquanto as cDC2 humanas expressam BDCA-1+ (CD1c+) (ESTIPONA, 2021; GUILLIAMS *et al.*, 2014; GUTIERREZ-MARTINEZ *et al.*, 2015 ; HILDNER *et al.*, 2009) (**Figura 2**).

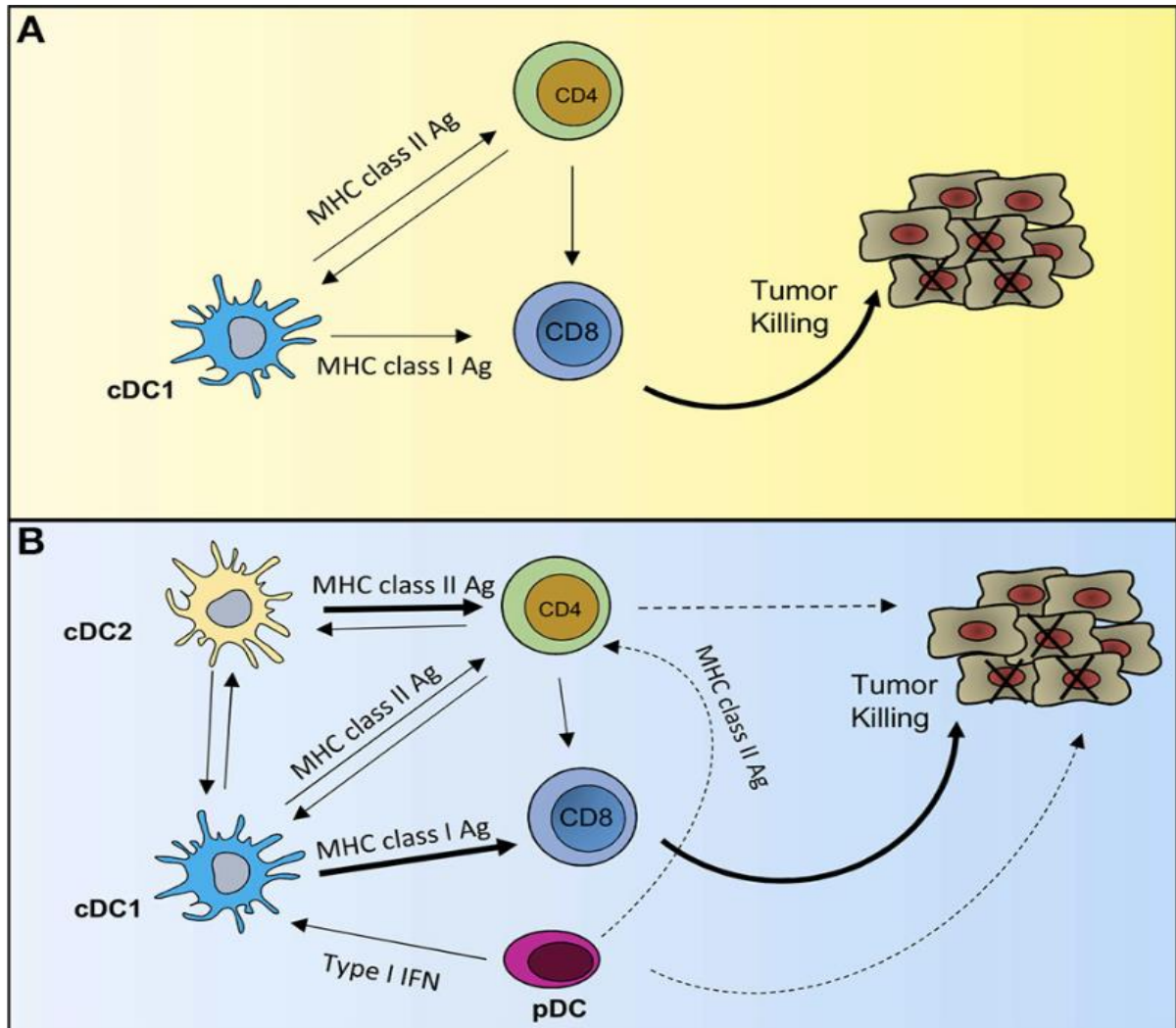


**Figura 2. Diagrama destacando as principais diferenças entre os subtipos de DCs quanto aos marcadores celulares e fatores de transcrição.** (Adaptado de ESTIPONA, 2021)

Funcionalmente as cDC1 são conhecidas como um subconjunto de DC com alta capacidade intrínseca de apresentar antígenos via MHC de classe I para ativar linfócitos T CD8+ e promover respostas Th1 e *Natural Killer* por meio de IL -12 (BACHEM *et al.*, 2010; HANIFFA *et al.*, 2012; JONGBLOED *et al.*, 2010; PILIN *et al.*, 2010). Recentemente, tem sido demonstrado que as cDC1 apresentam papel crítico na apresentação cruzada de antígenos para células T CD8 em tumores, determinante na eficácia anti-tumoral de imunoterapias (BROZ *et al.* 2015; SALMON *et al.*, 2016; SANCHEZ-PAULETE, 2017). Já as cDC2 são mais eficientes em ativar células T CD4 ao apresentar antígenos solúveis via MHC-II, regulando, assim, respostas imunes contra parasitas, patógenos extracelulares e alérgenos (ANDERSON *et al.*, 2021; CUETO, SANCHO, 2021). Contudo, é importante destacar que cDC2 apresentam importante papel na regulação de respostas anti-tumorais por células T CD4 que podem potencializar as respostas das células T CD8 no microambiente tumoral (BINNEWIES *et al.*, 2019; IWANOWYCZ *et al.*, 2019; NOUBADE, MAJRI-MORRISON, TARBEL, 2019; WCULEK *et al.*, 2020). (**Figura 3**).

Sabe-se que apresentação cruzada é um fenômeno conhecido pela apresentação de antígenos exógenos não-citosólicos via moléculas codificadas pelo MHC de classe I (GUERMONPREZ, AMIGORENA, 2005). Dessa maneira, na resposta contra vírus, as DCs, mesmo quando não infectadas podem, portanto, capturar e apresentar peptídeos virais via MHC de classe I (HUBER *et al.* 2014), fenômeno que é essencial em infecções por papilomavírus humano (HPV, do inglês,

*Human Papillomavirus*) com tropismo epitelial, por exemplo (EGAWA *et al.* 2015). Além disso, como já mencionado, a apresentação cruzada também possui papel essencial na resposta contra tumores.



**Figura 3. Potenciais cenários de contribuição entre subtipos de cDCs durante a imunidade contra tumores.** (A) Representação de uma resposta anti-tumoral efetiva pela ação exclusiva de cDC1 na ativação de células T CD4 e T CD8; (B) Possível papel de cDC2 auxiliando na potencialização da resposta anti-tumoral, por interações multicelulares. (Fonte: NOUBADE *et al.*, 2019)

Embora outras células, como macrófagos e linfócitos B, sejam capazes de realizar apresentação cruzada de antígenos, as DCs são consideradas as mais eficazes em realizar tal apresentação. Apesar de ainda ser objeto de debate, acredita-se que isso ocorra devido a um mecanismo que diminui a acidificação dos endossomos nessas células (CRUZ *et al.*, 2017). Quando os lisossomos se fundem

com fagossomos, há um acúmulo de proteases e uma bomba de prótons acidifica o fagossomo, levando à degradação proteica e geração de peptídeos para apresentação via MHC de classe II. A prevenção desta acidificação, mantendo o pH levemente alcalino, poderia diminuir a degradação dos antígenos, fornecendo material para a apresentação cruzada. Assim, proteínas remanescentes no fagossomo poderiam ser translocadas do compartimento endocítico para o citosol onde seriam degradadas em peptídeos pelo proteassoma, que transportados via TAP (do inglês *transporter associated with antigen processing*) para dentro do retículo endoplasmático seriam carregados e apresentados pelas moléculas de classe I do MHC (KOVACSOVICS-BANKOWSKI, ROCK, 1995). Apesar do pouco conhecimento acerca dos mecanismos moleculares envolvidos na translocação de antígenos dos endossomas/fagossomas para o citosol, parece que as DCs têm uma via endocítica especializada que pode limitar a degradação dos antígenos e recrutar componentes do retículo endoplasmático para a apresentação cruzada, onde a Sec22b (ALLOATTI *et al.*, 2017) e Sec61 estariam envolvidas (JOFFRE *et al.*, 2012).

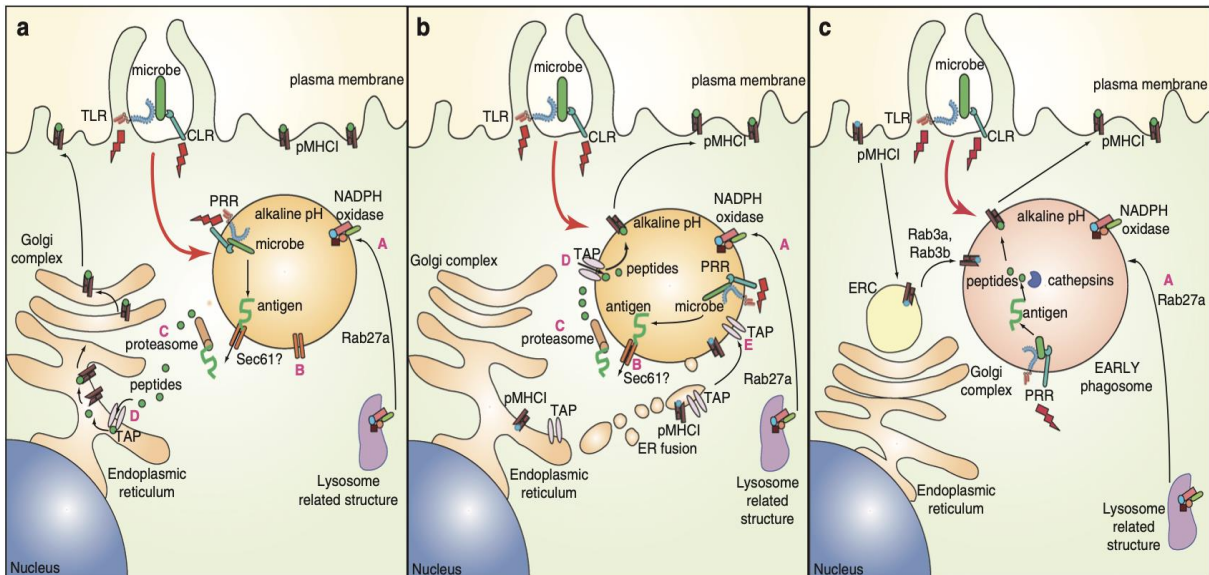
Além disso, embora ainda controversos, acredita-se que além da via do “fagossomo para o citosol”, os processos intracelulares que levam à apresentação cruzada podem envolver mais duas vias, a chamada de “vacuolar” e, a “via do ergossomo” (produto de fusão de retículo endoplasmático com o fagossomo) (NAIR-GUPTA, BLANDER, 2013).

Na via “vacuolar”, a hipótese é de que o processamento dos antígenos no endossomo/fagossomo, por catepsinas e outras proteases, geraria peptídeos que se ligariam a moléculas de classe I do MHC, que seriam “desviadas”, por proteínas especializadas, Rab11a e CD74, do retículo endoplasmático ou da membrana plasmática para os fagossomos (CRUZ *et al.* 2017).

A existência de uma terceira via, a dos ergossomas, foi sugerida pela identificação de vesículas caracterizadas pela presença simultânea de componentes do retículo endoplasmático necessários para a translocação de peptídeos para o citosol, o sistema de degradação do retículo endoplasmático, como TAP e PLC (complexo carreador de peptídeos) e de componentes do endossoma/fagossoma. Estas vesículas seriam o resultado da fusão do retículo endoplasmático e/ou complexo de Golgi com o fagossoma (GUERMONPREZ *et al.*, 2003), e poderiam representar uma reação adaptativa da célula a condições de excesso de antígenos,



que de maneira geral, aumenta a apresentação cruzada (BASHA *et al.*, 2008). Esta terceira ainda é posta em dúvida, podendo ser, apenas, consequência da formação e remodelamento dos fagossomas durante a fusão com compartimentos lisossômicos (TOURET *et al.*, 2005). (**Figura 4**)



**Figura 4. As três vias propostas para apresentação cruzada.** Via "fagossomo para o citosol" (a); via dos ergossomas (b) e via "vacuolar" (c). (Fonte: NAIR *et al.*, 2011)

Assim, os mecanismos que levam as DCs à apresentação cruzada e suas consequências específicas, como a indução de linfócitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos contra antígenos tumorais, são questões importantes a serem exploradas. No ambiente tumoral, as DCs podem capturar antígenos provenientes das células tumorais e apresentá-los via moléculas de MHC de classe II aos linfócitos T CD4<sup>+</sup> ou de forma cruzada para células T CD8<sup>+</sup> (GUERMONPREZ *et al.*, 2002; PALUCKA, BANCHEREAU, MELLMAN, 2010).

Contudo, tal habilidade de realizar apresentação cruzada não é igual em todas as subpopulações de DCs e, quando se consideram células humanas, é executado mais eficientemente pelas cDC1 (CD141<sup>+</sup>) (BACHEM *et al.*, 2010; GUTIÉRREZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2015; MELLMAN, 2013). Porém essa habilidade não é restrita às cDC1: as LCs humanas também realizam apresentação cruzada com alta produção de IL-15, enquanto as cDC2 e Mo-DCs podem realizá-la com ativação apropriada (COLLIN, BIGLEY, 2018).

Diante desse conhecimento, protocolos de imunoterapia têm explorado a função de DCs. No estudo *in vitro* deste tipo celular em seres humanos, diferentes abordagens foram descritas para a diferenciação de DCs (CAUX *et al.*, 1996; SHORTMAN, LIU, 2002). Sallusto e Lanzavecchia observaram que células mononucleares aderentes, isoladas do sangue periférico, diferenciam-se em DCs na presença das citocinas GM-CSF e IL-4 podendo ser mantidas em meio de cultura e, quando estimuladas com TNF- $\alpha$ , assumem o fenótipo e a função de DCs maduras, gerando, assim, células dendríticas derivadas de monócito ou Mo-DCs (SALLUSTO, LANZAVECCHIA, 1994). Além disso, as PBMCs (*peripheral blood monocyte cells*) isoladas para geração de Mo-DCs podem ser carregadas com diferentes antígenos e maturadas com coquetel de citocinas para geração de vacinas terapêuticas com baixa toxicidade (BOL *et al.*, 2016; MASSA *et al.*, 2015), visto que cDCs presentes no sangue constituem uma população rara (GRANOT *et al.*, 2017).

O estabelecimento e a possibilidade de geração dessas células *in vitro* foram fundamentais também para o desenvolvimento de vacinas terapêuticas para pacientes com câncer metastático nos últimos anos (PALUCKA *et al.*, 2007; PALUCKA, BANCHEREAU, 2013; SABADO, BALAN AND BHARDWAJ, 2016), inclusive em nosso laboratório (BARBUTO *et al.*, 2004; PINHO *et al.*, 2022). O objetivo desta estratégia é induzir linfócitos T efetores contra o tumor e memória imunológica para controlar a recidiva tumoral (BANCHEREAU, PALUCKA, 2005; PALUCKA, BANCHEREAU, 2012), mas, para isso, as DCs precisam, primeiro, capturar e apresentar eficientemente os antígenos tumorais.

Entretanto, em tumores já estabelecidos, as DCs apresentam deficiências de maturação e função (BALEEIRO *et al.*, 2008; BARBUTO, 2013) o que as impedem de realizar a apresentação de antígenos eficientemente, podendo contribuir mais para o estabelecimento de um estado de tolerância ao tumor do que para sua eliminação ou controle. Aliás, já em monócitos, precursores sanguíneos de DCs, pode-se notar um desvio funcional claro na indução de linfócitos Treg (CLAVIJO-SALOMON *et al.*, 2014; RAMOS *et al.*, 2012; RAMOS *et al.*, 2013). Este desvio de função pode ser explicado pelo aumento de citocinas anti-inflamatórias no soro de pacientes diagnosticados com diversos tipos de câncer (MA *et al.*, 2013; KOWALSKA *et al.*, 2012). Assim, tais alterações podem contribuir para a manutenção de um mecanismo de escape tumoral. Além disso, há relatos que a correlação entre a alteração nos níveis de citocinas



séricas destes pacientes e as células inflamatórias que infiltram o tumor está associada à progressão tumoral (GENING *et al.*, 2014; VÄYRYNEN *et al.*, 2016), sendo de relevância clínica a detecção destas citocinas para o prognóstico (BINDER *et al.*, 2017; KOWALSKA *et al.*, 2012).

Vários estudos vêm apontando para os benefícios da imunoterapia com DCs, demonstrando segurança, presença de insignificantes efeitos colaterais adversos e, embora ainda sejam necessários mais estudos, os resultados clínicos são animadores (BARBUTO *et al.*, 2004; CLAVIJO-SALOMON *et al.*, 2014; LEPSKI *et al.*, 2023; PINHO *et al.*, 2022; YU *et al.*, 2004). Em nosso laboratório, vacinas com células híbridas dendríticas-tumorais têm sido desenvolvidas através da fusão de células tumorais de pacientes com DCs alogênicas obtidas de doadores saudáveis (BARBUTO *et al.*, 2004; PINHO *et al.*, 2022). Isso justifica-se devido à diferenciação de DCs a partir de células precursoras de pacientes portadores de câncer, como descrito acima, apresentarem um perfil indutor de células imunossupressoras (AZEVEDO-SANTOS *et al.*, 2019; CLAVIJO-SALOMON *et al.*, 2014; RAMOS *et al.*, 2012; NEVES *et al.*, 2005). Com a fusão, espera-se que as células passem a apresentar antígenos tumorais pelas moléculas de MHC tanto autólogas quanto alogênicas aos linfócitos T.

## 1.2 Câncer Cervical e HPV

Anualmente ocorrem, aproximadamente, 1,4 milhão de neoplasias induzidas por vírus, representando cerca de 10% dos casos de câncer, com a maioria (acima de 85%) ocorrendo em países de baixa e média renda. Dentre esses, os vírus associados ao maior número de casos de câncer são os vírus do papiloma humano (HPVs), que causam câncer cervical e outras malignidades epiteliais (SCHILLER, LOWY, 2021).

O câncer cervical – também chamado câncer do colo do útero – é a quarta principal causa de morte entre as mulheres no Brasil (INCA, 2019) e no mundo, segundo a Organização Mundial da Saúde (SINGH *et al.*, 2023). No Brasil é a terceira neoplasia mais frequente entre a população feminina, com uma estimativa de 17.010 novos casos em 2022, de acordo com o relatório do Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2019). O desenvolvimento deste tipo de neoplasia, desde a neoplasia

intraepitelial cervical (NIC) até o câncer cervical invasivo está associado à infecção persistente pelo HPV (ZUR HAUSEN, 2002).

Os HPVs infectam frequentemente tecidos epiteliais escamosos e causando verrugas e lesões. Com base no tropismo tecidual, aproximadamente 200 genótipos de HPV foram descritos com base na sequência do genoma viral e podem ser divididos em tipos cutâneos e mucosos, ou de “baixo risco” e “alto risco” (GUPTA, KUMAR, DAS, 2018).

Mais de 200 tipos de HPVs são conhecidos atualmente e, dentre eles, 40 genótipos possuem tropismo pela mucosa ano-genital (LIN *et al.*, 2010). Esses genótipos são subdivididos naqueles de baixo e alto risco, dependendo do seu potencial carcinogênico. Os HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59 são aqueles classificados como de alto risco, com habilidade de infectar células cutâneas ou de mucosa (COHEN *et al.*, 2019). Dentre esses tipos, o HPV16 destaca-se por ser o mais frequente e responsável por mais de 60,5% dos casos de tumores cervicais no mundo, seguido pelo HPV18 (DE MARTEL, PLUMMER, FRANCESCHI, 2017; SERRANO *et al.* 2018).

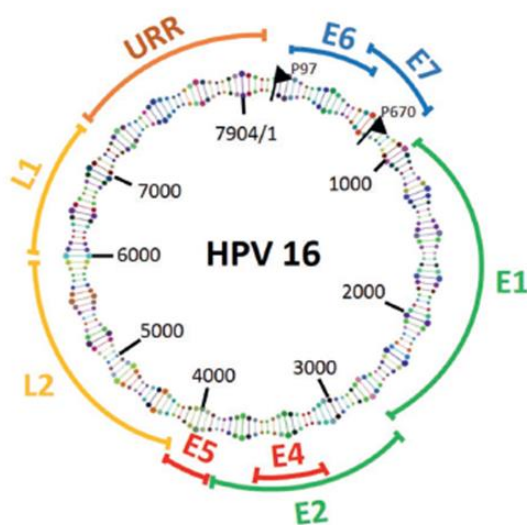
Enquanto a maioria da população humana adquire infecções por HPV, apenas cerca de 10% a 15% destes indivíduos estabelecem uma infecção persistente ao longo da vida, e apenas uma parcela populacional tem o potencial de evoluir para câncer invasivo (SCHIFFMAN *et al.*, 2007). Isso sugere que, para a maioria dos indivíduos infectados pelo HPV, os mecanismos de defesa do hospedeiro são amplamente eficazes na eliminação da infecção inicial. (WESTRICH, WARREN, PYEON, 2017).

Assim, uma vez associado à célula hospedeira, o HPV não causa a morte celular e as partículas virais infecciosas são eliminadas das superfícies das mucosas. No geral, a estratégia do vírus, inicialmente, é evitar ativar sinais inflamatórios que ativam a resposta imune inata associada ao tecido danificado. O controle imunológico natural de uma infecção por HPV é provavelmente o resultado da interação das células da resposta inata, a atividade de anticorpos específicos e de células efetoras. Esse controle inclui recrutamento de macrófagos, células NK e DCs. É possível que a resposta inata possa eliminar uma infecção por HPV, mas muitas vezes o genoma do HPV integrado às células basais passam a servir como um reservatório contínuo da infecção. Com isso, a ativação da resposta adaptativa seleciona os meios para

reconhecer especificamente o vírus e eliminar a infecção (FRAZER, 2009; WESTRICH, WARREN, PYEON, 2017).

As consequências da infecção persistente pelo HPV são as lesões intraepiteliais escamosas (neoplasia intraepitelial cervical - NIC), consideradas precursoras de câncer. As NICs são classificadas em três grupos de risco progressivo de acordo com a o estrato do epitélio afetado, definidas por: NIC1, NIC2, NIC3 (MOSCICKI *et al*, 2012; SCHIFFMAN, WENTZENSEN, 2010). NIC1 pode evoluir em uma pequena porcentagem de casos para NIC 2/3. Atualmente, estima-se que 32-43% das lesões de NIC 2/3 sofrem regressão espontânea (MCCREDIE, 2010; VICI *et al* 2016). No entanto, ainda não existem biomarcadores de prognóstico que possam distinguir a possibilidade de regressão em cada paciente.

Em relação à sua característica, o HPV é um vírus de DNA de cadeia dupla, não envelopado, com cerca de 8.000 pares de bases, coberto por proteínas do capsídeo. O genoma do HPV16, por exemplo, pode ser segmentado em três partes que codificam genes de expressão imediata ou *early* (E1, E2, E4, E5, E6 e E7), expressão tardia ou *late* (L1 e L2) e uma cadeia longa de controle (LCR) também conhecida como região não codificante (NCCR) ou região regulatória *upstream* (URR) (PAL, KUNDU, 2020)(**Figura 5**).



Gene	Atividade
L1	Proteína do capsídeo
L2	Proteína do capsídeo
E1	Replicação do genoma viral e sua manutenção
E2	Iniciação da replicação do DNA viral; regulação da transcrição de E6 e E7
E4	Liberação de partículas virais
E5	Aumenta vias de fatores de crescimento
E6	Inibe p53 e causa perda na regulação do ciclo celular
E7	Degradação de pRb levando à proliferação celular e resistência à apoptose

**Figura 5. Estrutura e organização do genoma do HPV16.** Esquema representativo do genoma do HPV-6, e uma tabela descrevendo as conseqüentes atividades de cada gene traduzido. (Adaptado de PAL, KUNDU, 2020)

Os genes L1 e L2 codificam as proteínas que formam o capsídeo viral e, por isso, são alvos de vacinas atualmente disponíveis que tem como objetivo inativar ou eliminar o vírus durante a infecção. Elas são interessantes quando se pensa em reduzir a frequência de NICs e de câncer cervical induzidos por HPV a longo prazo porque essa estratégia é ineficaz quando o genoma viral já está integrado e/ou em estágios mais avançados de transformação (PAL, KUNDU, 2020).

Já os genes E1 e E2 regulam a replicação viral e transcrição de proteínas, enquanto o E4 é o responsável pela montagem e liberação do vírus, e E5, E6 e E7 estão envolvidos com a imortalização e transformação celular (PAL, KUNDU, 2020). A progressão das lesões precursoras para tumores invasivos aumenta quando as proteínas oncogênicas E6 e E7 passam a ser expressas de forma constitutiva. Essa alta expressão de E6 e E7 é a principal característica para a patogênese do câncer cervical invasivo (ZUR HAUSEN, 2002).

As interações físicas de E6 com numerosos fatores celulares derivados do hospedeiro resultam na desregulação do ciclo celular. Essa proteína do HPV frequentemente se liga à p53, inibindo sua função, o que acarreta a degradação do complexo p53-E6 dependente de ubiquitina, causando encurtamento da meia-vida de p53 e perda de suas funções biológicas. Em contraste, a E7 que é responsável pela proliferação celular, liga-se à proteína pRb que libera o fator de transcrição E2F. Tal ligação regula a transição do ciclo celular da fase G1 para S, promovendo a proliferação celular, o que pode acelerar a tumorigênese (MANTOVANI, BANKS, 2001; MÜNGER *et al.*, 2001; ZUR HAUSEN, 2002).

Uma vez que as proteínas E6 e E7 do HPV estão expressas nas células transformadas do colo de útero, sendo necessárias para a geração de lesões malignas, elas se tornam alvos ideais para vacinas terapêuticas (HOPPE-SEYLER *et al.*, 2018).

Atualmente, o tratamento para pacientes NIC 2/3 é a excisão cirúrgica. Para o câncer cervical são utilizados cirurgia de remoção do tumor, radioterapia, quimioterapia e uso de agentes anti-angiogênicos (COHEN *et al.*, 2019; LEE *et al.*, 2016). Alternativamente, vacinas terapêuticas contra câncer cervical tendo como alvo as proteínas E6 e E7 também têm sido avaliadas, porém os resultados apresentados não têm sido satisfatórios (VICI *et al.*, 2016).

Em relação às vacinas profiláticas, atualmente, existem três vacinas comerciais contra HPVs de alto e baixo risco e todas são constituídas por partículas virais recombinantes não infecciosas (VLPs, do inglês *virus-like particles*). A Cervarix® (GlaxoSmithKline) contém VLPs dos HPVs 16 e 18, os dois genótipos de alto risco que mais causam câncer cervical em todo o mundo (DE MARTEL, PLUMMER, FRANCESCHI, 2017; SERRANO *et al.* 2018). A Gardasil® (Merck) possui VLPs dos mesmos genótipos de HPV de alto risco e também VLPs dos HPVs 6 e 11, responsáveis pela infecção e aparecimento de verrugas genitais tanto em mulheres quanto em homens (GARLAND *et al.*, 2007; JOURA *et al.*, 2015). Ainda, uma “nova versão” Gardasil (Gardasil 9®, Merck) contendo VLPs de 9 genótipos de HPV (6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58) foi desenvolvida para aumentar a estratégia de inativação da replicação viral desses e proteger contra 90% das verrugas genitais e 70% dos casos de câncer cervical (DE OLIVEIRA, FREGNANI, VILLA, 2019). Essas vacinas induzem resposta de anticorpos neutralizantes e são eficazes na prevenção da infecção dos respectivos genótipos de HPV (SCHILLER, LOWY, 2012). Porém, ainda há baixa cobertura dessas vacinas, principalmente em países menos desenvolvidos, e a presença de muitas mulheres infectadas nas áreas descobertas, devido à incidência de câncer induzido pelo HPV continua sendo uma preocupação de saúde mundial (COHEN *et al.*, 2019).

### 1.3 Modelo da proteína recombinante gDE7

Uma vez identificadas proteínas imunogênicas, vacinas baseadas em proteínas recombinantes tornaram-se alvos de muitos pesquisadores pela possibilidade de gerar imunógenos potencialmente seguros e eficazes em grandes quantidades. As terapias baseadas em proteínas recombinantes purificadas têm vantagens sobre aquelas baseadas em peptídeos porque apresentam todos os epítomos essenciais para o processamento do antígeno e ativação de células do sistema imunológico.

O uso de vacinas terapêuticas, com o intuito de estimular a resposta imune especificamente contra as células infectadas, também tem sido estudado no tratamento contra tumores induzidos por HPV. A ativação de linfócitos T citotóxicos CD8+ é a ferramenta preferida para eliminar tumores, pois eles detectam antígenos intracelulares apresentados por moléculas MHC de classe I expressas por todos os

tipos de células tumorais. No entanto, linfócitos T CD4<sup>+</sup> merecem importância pois promovem as funções efetoras e de memória dos CTLs (linfócitos T citotóxicos) (BORST *et al.*, 2018)

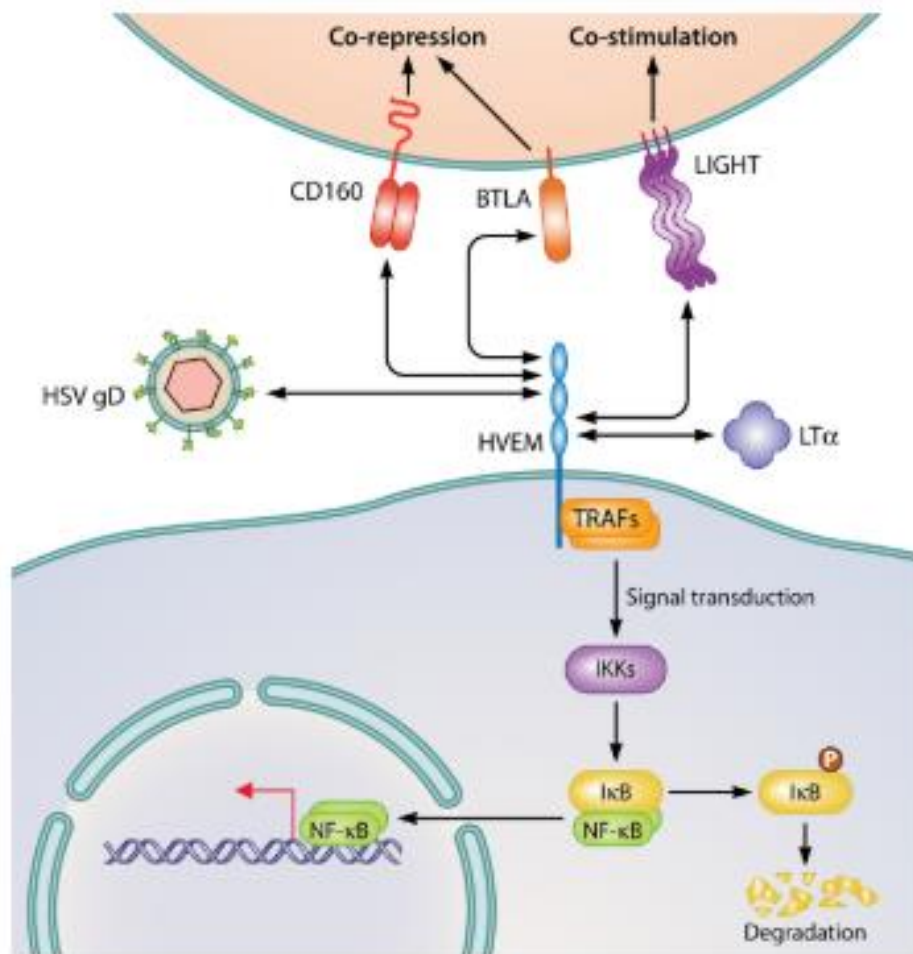
Em modelos murinos, o uso de vetores virais e bacterianos, assim como de peptídeos e DNA têm sido amplamente explorados (LEE *et al.*, 2016). Em estudos clínicos, algumas vacinas terapêuticas têm sido testadas, mas até o momento nenhuma estratégia demonstrou resultados completamente satisfatórios para uso. De maneira geral, os resultados mostraram a indução de respostas imunológicas específicas contra antígenos do HPV, sem a regressão completa das lesões (BAGARAZZI *et al.*, 2012; COHEN *et al.*, 2019).

Diante disso, Porchia *et al.* (2011) e Diniz *et al.* (2013) desenvolveram, em modelo murino, duas estratégias de imunoterapia para o controle do crescimento tumoral induzido por HPV16: uma utilizando DNA e a outra, proteína recombinante purificada. Ambas as estratégias se baseiam na geração de uma proteína híbrida através da fusão genética da glicoproteína D do herpes simplex vírus (HSV-1) com a oncoproteína E7 do HPV16 (gDE7) (PORCHIA *et al.*, 2011; DINIZ *et al.*, 2013). Os resultados mostraram que repetidas imunizações com gDE7, sem o uso de outros adjuvantes, deram proteção terapêutica parcial contra os tumores transplantados que expressavam as oncoproteínas E6 e E7 do HPV (TC-1) (PORCHIA *et al.*, 2011). Além disso, quando associada ao adjuvante poly I:C, a vacina com gDE7 induziu uma proteção de longa duração nesses animais. Tal proteção foi atribuída à infiltração do microambiente tumoral por linfócitos T CD8<sup>+</sup>, com atividade citotóxica e fenótipo de memória efetora, específicos para E7, ao mesmo tempo em que se notou diminuição relativa da frequência de células potencialmente imunossupressoras (linfócitos Treg e MDSC, do inglês *Myeloid-derived suppressor cells*). Acredita-se que o efeito antitumoral dessa imunização deu-se em razão da atividade da proteína gD, que possivelmente direcionou os antígenos, levando à ativação de DCs CD11c<sup>+</sup>CD8α<sup>+</sup> nos camundongos (que correspondem à células BDCA3<sup>+</sup> em humanos) (PORCHIA *et al.*, 2017), especializadas na apresentação cruzada para células T CD8<sup>+</sup>. Ainda, em outro modelo, gDE7 combinada com cisplatina, que também é usada em imunoterapia contra o câncer, levou à completa regressão de tumores em camundongos. Os efeitos imunológicos observados foram: indução de linfócitos T CD8<sup>+</sup> específicos para E7; aumento de infiltrado de macrófagos e DCs; e ausência de reincidência tumoral

(PORCHIA *et al.* 2022). Nestes casos, para a geração da proteína recombinante gDE7, o adjuvante escolhido foi a gD, uma glicoproteína de superfície do HSV. A gD é conhecida por interagir com células do sistema imunológico através de três receptores na membrana descritos: Nectin-1, heparan-sulfato e HVEM (*Herpes Virus Entry Mediator*), atuando como adjuvante em combinação com a E7 (SPEAR *et al.*, 2006).

O HVEM é um receptor da família de receptores do TNF; além desta citocina, outros ligantes do HVEM são altamente expressos em células do sistema imune, incluindo células T, células B, DCs, células NK, macrófagos, PMN (células polimorfonucleares), neurônios e células epiteliais (EDWARDS, LONGNECKER, 2017; PASERO *et al.*, 2012). O HVEM, também conhecido por CD270, pode interagir com ligantes os CD160 e BTLA (*B and T lymphocyte attenuation*) e LIGHT (*Lymphotoxin-related Inducible ligand that competes for Glycoprotein D binding to HVEM on T cells*) e LT- $\alpha$  (*Lymphotoxin  $\alpha$* ) ligantes de TNF, além da glicoproteína gD do HSV. BTLA e LIGHT são encontrados na maioria dos leucócitos, incluindo linfócitos B e T, granulócitos, células NK. CD160 é encontrado em linfócitos T CD4 e CD8 e células NK. BTLA, CD160 e gD (HSV) ligam-se ao domínio rico em cisteína 1 (CRD1) de HVEM, enquanto LIGHT e LT- $\alpha$  solúvel ligam-se a CRD2 e CRD3. Os resultados podem variar de sinais inibitórios através de CD160 e BTLA a sinais coestimuladores através de LIGHT. BTLA e LIGHT também podem se associar com HVEM, formando complexos heterotriméricos, a conformação mais comumente observada em linfócitos T. Esta ligação mantém HVEM em um estado inativo, sem ativação de NF- $\kappa$ B. Em contraste, a ativação de HVEM por qualquer um de seus ligantes leva à sinalização de transcrição de NF- $\kappa$ B por meio do recrutamento de membros da família TRAF pela porção citoplasmática de HVEM. A ativação subsequente de I $\kappa$ B quinase/I $\beta$ / $\alpha$  quinase (IKK $\beta$ / $\alpha$ ), fosforilação e degradação de I $\kappa$ B e ativação e translocação nuclear de NF- $\kappa$ B resultam em aumento da transcrição de fatores inflamatórios dentro da célula que expressa HVEM (**Figura 6**). Em outras palavras, a interação do HVEM, presente em DCs e linfócitos, aos ligantes LIGHT ou LT- $\alpha$ , estimula a resposta imune aumentando a ativação e proliferação linfocitária, e quando ligados a BTLA ou CD160, sinais inibitórios são transmitidos aos linfócitos T e B, levando a um estado de anergia (EDWARDS, LONGNECKER, 2017).

A gD compete pelos ligantes BTLA/CD160 sem interferir na ligação LIGHT/LT- $\alpha$  do HVEM. Todavia, estudos recentes têm mostrado a expressão alterada de HVEM em pacientes com câncer, estando, o mau prognóstico e características mais agressivas do tumor associados ao aumento de expressão deste receptor nas células neoplásicas, sugerindo, assim, o HVEM como alvo de imunoterapia (HEO *et al.*, 2007; LAN *et al.*, 2017; TSANG *et al.*, 2017).



**Figura 6. Expressão de HVEM em células do sistema imunológico.** Esquema representativo da interação entre HVEM com LIGHT, CD160, BTLA ou gD (HSV), induzindo a sinalização do fator de transcrição NF- $\kappa$ B. (Fonte: EDWARDS, LONGNECKER, 2017)

Desse modo, neste projeto, investigamos os efeitos da proteína recombinante gerada pela fusão genética de gD com a oncoproteína E7, adicionada ou não de E6 do HPV16, sobre o fenótipo e função de células dendríticas derivadas de monócitos humanos *in vitro*, de doadores saudáveis e de pacientes diagnosticados com NIC graus 2/3. Assim, nossa avaliação nos conduzirá ao conhecimento do potencial desta estratégia para ativação funcional de Mo-DCs na indução de resposta de linfócitos T



contra os antígenos E7 e E6 do HPV16, e futuramente, pode contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para estas tais pacientes.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo desse estudo foi investigar os efeitos da proteína recombinantes E6 do HPV16 e da proteína recombinante derivada da fusão genética da glicoproteína D do HSV-1 com a oncoproteína E7 (gDE7) do HPV16 sobre a diferenciação e função de células dendríticas humanas, derivadas *in vitro*, a partir de monócitos do sangue periférico de doadores saudáveis e de pacientes diagnosticadas com neoplasia intraepitelial cervical (NIC) de graus 2/3.

Para tanto, avaliamos os efeitos do tratamento de Mo-DCs de doadores saudáveis e Mo-DCs de pacientes portadoras de NIC 2/3 com as proteínas recombinantes E6, E7, gD ou gDE7, por diferentes tempos e em diferentes concentrações.

Em Mo-DCs de doadores saudáveis ativadas com E7 (0,75 µg/mL), gD (2,25 µg/mL) ou gDE7 (3 µg/mL) por 24 e 48 horas, avaliamos:

- a. O fenótipo de membrana quanto à expressão das moléculas CD80, CD83, CD86 e PD-L1;
- b. A concentração de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 e TNF- $\alpha$  nas culturas das Mo-DCs;
- c. A função linfo-estimuladora, medida pela proliferação linfocitária e pela produção das citocinas IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  em co-culturas das Mo-DCs com linfócitos T alogênêicos;
- d. A expressão de genes envolvidos com a ativação, processamento e apresentação de antígenos por DC humanas (usando o *kit* comercial “RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array Human Dendritic & Antigen Presenting Cell” - GeneGlobe ID: PAHS-406Z).

Em Mo-DCs derivadas de pacientes HPV16+ estimuladas com gD e gDE7, avaliamos:

- a. O fenótipo de membrana quanto à expressão das moléculas CD80, CD83, CD86 e PD-L1;
- b. A função linfo-estimuladora, medida pela indução de proliferação de linfócitos T alogênêicos, CD4+ e CD8+.

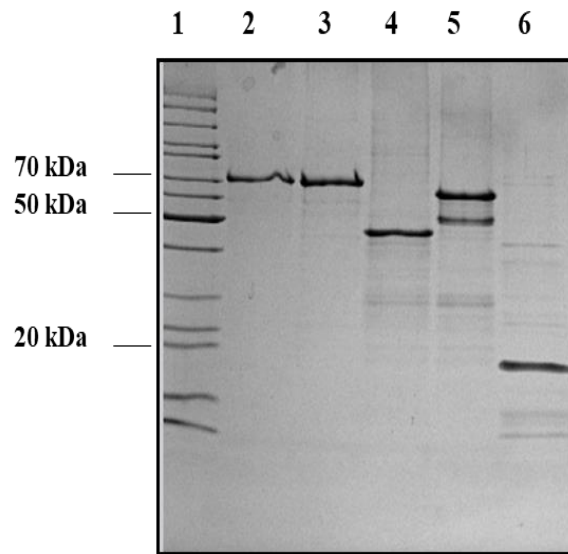
### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 *Casuística:*

Para este projeto, inicialmente utilizamos sangue proveniente de câmaras de leucorredução de doadores saudáveis do Banco de Sangue do Hospital Alemão Oswaldo Cruz, após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Para os experimentos subsequentes, o sangue foi coletado através de venóclise de doadoras saudáveis e pacientes com diagnóstico histológico de NIC 2/3 ou carcinoma *in situ*, induzidos pelo HPV16, sem tratamento prévio, acima de 18 anos, e após assinatura do TCLE. As pacientes foram recrutadas no Serviço de Ginecologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (HCFMUSP). O projeto foi aprovado submetido pela Comissão de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do ICB/USP (68362417.1.0000.5467; 82581317.5.0000.5467) e da FMUSP (82581317.5.3001.0068).

#### 3.2 *Proteínas recombinantes*

As proteínas recombinantes gD, gDE7, E7 e E6 foram produzidas (PORCHIA, *et al.*; 2011) e gentilmente cedidas pela Dra. Bruna Felício Milazzotto Maldonado Porchia Ribeiro do Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas do ICB/USP. A concentração e integridade foram avaliadas por SDS-PAGE (**Figura 7**).



**Figura 7. Caracterização da proteína gDE7 purificada por SDS-PAGE 15%.** Marcador de massa molecular (1), BSA 1µg (2), BSA 2µg (3), gD 2µg (4), gDE7 2µg (5), E7 2µg (6).

### *3.3 Processamento de sangue e obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs)*

Utilizamos amostras de sangue provenientes de câmaras de leucorredução e de sangue periférico de doadoras saudáveis e pacientes, coletado em tubos contendo heparina sódica. O volume total de sangue obtido foi diluído em PBS (1:1) e colocado em tubos cônicos contendo Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare). Para cada 30 mL de sangue diluído em PBS usamos 12 mL de Ficoll-Paque. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 900 g por 30 minutos para separação por gradiente de centrifugação das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs). Estas células foram recuperadas e lavadas 3 vezes (1200, 1100 e 900 rpm, por 10 minutos) em meio RPMI-1640. A interface de células mononucleares foi coletada, quantificada e a viabilidade avaliada pelo método de exclusão por azul de trypan.

Infelizmente, diante do contexto da pandemia pelo Sars-Cov2, nosso trabalho também sofreu com o impacto das restrições e todas as difíceis consequências que a pandemia trouxe. Por isso, parte das PBMCs obtidas das pacientes foram congeladas e analisadas posteriormente ao programado no projeto inicial. As PBMCs obtidas durante este período, após a quantificação, foram congeladas na proporção de  $1 \times 10^7$  células para cada 1 mL de meio de congelamento (SFB + 10% de DMSO) e mantidas em nitrogênio líquido até o momento da utilização nos experimentos. As células foram descongeladas em banho-maria a 37°C e posteriormente lavadas com meio de cultura

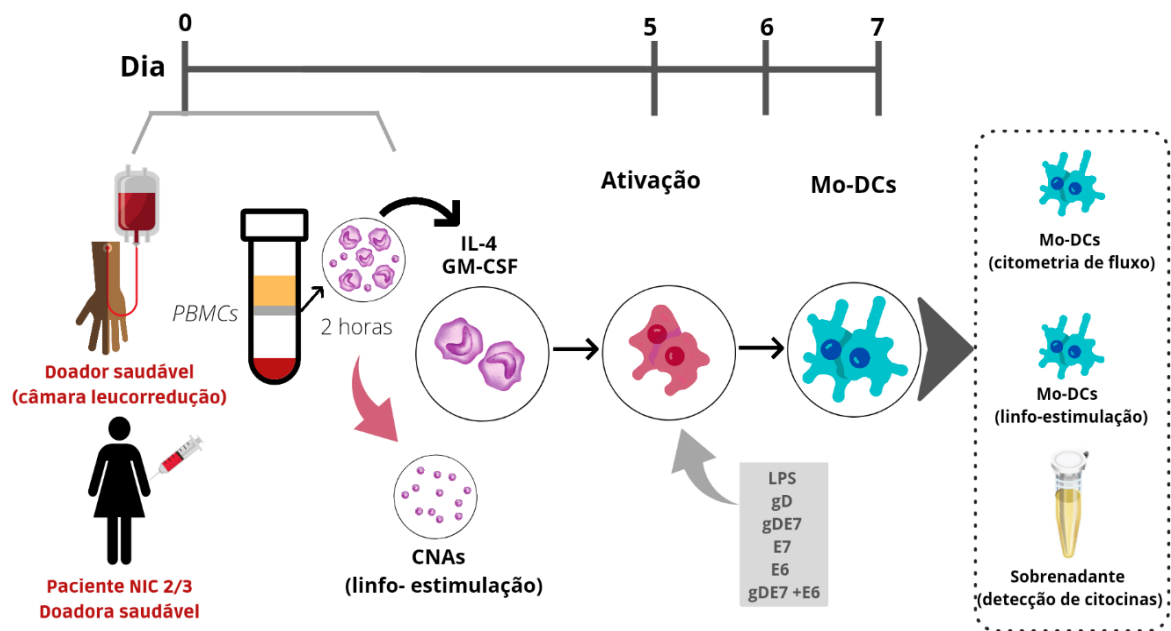
também nesta temperatura para retirada de DMSO. A viabilidade foi verificada usando azul de trypan e as células mantidas em cultura como descritas a seguir.

### 3.4 Diferenciação de Mo-DCs *in vitro* a partir de PBMCs

As PBMCs recuperadas foram cultivadas em placas de poliestireno de 12 poços contendo meio de cultura RPMI-1640, na concentração de  $5 \times 10^6$  células/mL, onde permaneceram por 2 horas em estufa com atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C para a aderência das células mononucleares (**Figura 8**). Posteriormente, as células não aderentes (CNAs) foram removidas, quantificadas e mantidas em cultura ou congeladas e mantidas a -80°C para ensaios posteriores de linfo-estimulação, quando necessário.

As células aderentes foram incubadas por 5 dias em meio RPMI-1640 acrescido de 10% de SFB e 1% de antibiótico/antimicótico (penicilina - streptomina - anfotericina B) contendo GM-CSF (50 ng/mL) e IL-4 (50 ng/mL) para diferenciação em Mo-DCs. No 5º dia, as células foram ativadas pela adição de gDE7, gD, E7, E6, gDE7 + E6 ou LPS (100 ng/mL; de *E. coli*; O111:B4; L2630, Sigma Aldrich) de acordo com os grupos (**Tabela 1**). Um grupo sem adição de estímulos foi usado como controle de células dendríticas imaturas (iDCs). Além disso, como controle negativo usamos LPS (100 ng/mL) + Polimixina B (10 µg/mL) e um grupo recebeu apenas Polimixina B (10 µg/mL). Esses controles devem-se ao fato de que as proteínas recombinantes foram produzidas em linhagem bacteriana (*E. coli*) e, por isso, para efeito de inativação de qualquer contaminação por LPS, todas as proteínas recombinantes foram incubadas com Polimixina B (10 µg/mL) durante 2 horas a 37°C imediatamente antes da adição às culturas celulares.

No sextos e/ou sétimos dias de cultura, as Mo-DCs foram removidas utilizando PBS e EDTA 2 mM, lavadas em PBS, quantificadas e, em seguida, marcadas com anticorpos monoclonais fluorescentes específicos no escuro, 20 minutos a 4°C. Após a marcação, as células foram lavadas e ressuspensas em tampão de fixação (PBS + paraformaldeído 1%) e adquiridas no citômetro de fluxo. Os sobrenadantes das culturas foram congelados para posteriores ensaios de detecção de citocinas.



**Figura 8. Cronograma de diferenciação de Mo-DCs a partir de amostras de sangue periférico ou de câmara de leucorredução.** Após separação por gradiente de densidade, as PBMCs foram cultivadas em estufa contendo CO<sub>2</sub> a 37°C por 2 horas. Em seguida, as células não aderentes (CNAs) foram retiradas e separadas para ensaio posterior de linfo-estimulação e as células aderidas receberam estímulo para diferenciação GM-CSF e IL-4. Ao 5º dia, as células Mo-DCs imaturas foram ativadas com as proteínas recombinantes gD, gDE7, E7, E6 ou LPS de acordo com os grupos e dosagens testadas. Após 24 ou 48 horas, as Mo-DCs foram recuperadas e marcadas com anticorpos contra moléculas de superfície e separadas para ensaio de linfo-estimulação. O sobrenadante recuperado foi congelado para ensaio de detecção de citocinas.

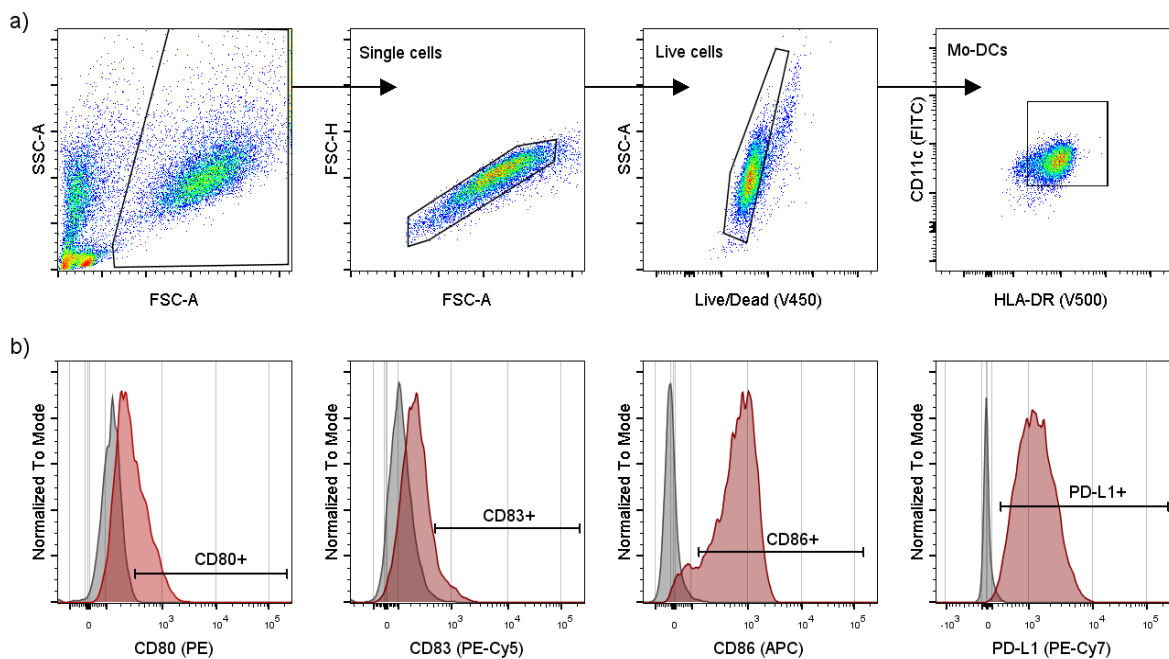
**Tabela 1: Concentrações das proteínas recombinantes utilizadas nos experimentos**

Estímulo de ativação	Concentrações utilizadas
gD	0,225 µg/mL – 2,25 µg/mL – 22,5 µg/mL
E7	0,075 µg/mL – 0,75 µg/mL – 7,5 µg/mL
E6	0,075 µg/mL – 0,75 µg/mL – 7,5 µg/mL
gDE7	0,3 µg/mL – 3,0 µg/mL – 30,0 µg/mL
gDE7 3,0 µg/mL + E6	0,075 µg/mL – 0,75 µg/mL – 7,5 µg/mL

### 3.5 Determinação do fenótipo de membrana das Mo-DCs

Para avaliação do fenótipo de membrana usamos para marcação os anticorpos: anti-CD11c (FITC), anti-CD14 (APC-H7), anti-CD40 (PE), anti-CD80 (PE), anti-CD83 (PE-Cy5), anti-CD86 (APC), anti-PD-L1 (PE-Cy7), anti-HLA-ABC (APC), anti-HLA-DR

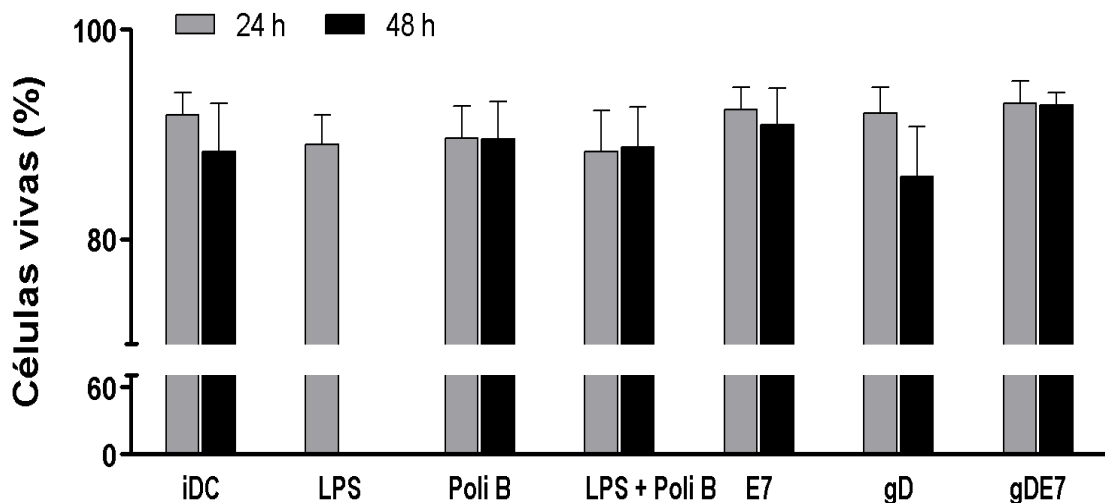
(V500), em diluições e previamente determinados. Utilizamos também o marcador de viabilidade celular Live/Dead (*Live/Dead<sup>TM</sup> fixable violet dead cell stain kit*, Invitrogen). As células foram adquiridas no citômetro de fluxo (LRSFortessa ou FCASCanto II, BD Biosciences) através do *software* FACSDiva. Pelo menos 10.000 eventos selecionados por FSC x SSC foram adquiridos por amostra. Para análise, excluimos *doublets* e células mortas. Para calcular a frequência de células positivas para cada marcador usamos uma amostra sem marcação ou FMO (*fluorescence minus one*) para determinar a população positiva dentro da subpopulação CD11c<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>. A mediana de intensidade de fluorescência relativa (RMFI) foi calculada pela MFI de cada marcador dividido pela MFI das células imaturas (iDC). A estratégia de análise da citometria de fluxo utilizando o *software* FlowJo (BD Biosciences) está representada na **figura 9**.



**Figura 9. Estratégia de seleção da população de Mo-DCs.** a) Gráficos extraídos do FlowJo, estilo *pseudocolor* onde mostramos um exemplo de estratégia para selecionar as células com tamanho e granularidade (FSC-A x SSC-A) compatíveis com os de Mo-DC, seguida da exclusão de *doublets* (FSC-A x FSC-H). Dentro desta população, selecionamos as células viáveis usando o marcador Live/Dead. Consideramos Mo-DCs aquelas duplo-positivas para HLA-DR (V500) e CD11c (FITC). b) Gráficos extraídos do FlowJo, estilo histograma normalizado pelo modal, onde usamos a estratégia de FMO (*fluorescence minus one*) para as moléculas CD80 (PE), CD83 (PE-Cy5), CD86 (APC) e PD-L1 (PE-Cy7). Os picos representados em cinza correspondem às populações 99% negativas para o respectivo marcador; os picos em vermelho exemplificam Mo-DCs ativadas e a frequência de células positivas para cada marcador delimitada pela barra dentro deste experimento.

Após recuperação das Mo-DCs ativadas por 24 e 48 horas, incubamos estas células com marcador comercial Live/Dead®. Nesses ensaios, a viabilidade das células é discriminada pela integração da membrana e coloração da calceína para indicar atividade esterásica celular. Em citometria de fluxo, consideramos, portanto, as células viáveis aquelas não marcadas. Diante disso, após selecionarmos nossa população por tamanho e granulosidade e excluirmos os *doublets*, distinguimos a frequência da população de células vivas. Mostramos que as células permanecem, em sua maioria, viáveis para análise das moléculas de superfície (**Figura 10**).

A **figura 10** mostra também que os grupos que receberam polimixina B ou LPS inativado por polimixina B têm uma porcentagem alta de viabilidade. Neste caso, é importante que não tenhamos a influência da polimixina B, pois todas as proteínas são inativadas com este antibiótico antes de adicionada à cultura e, desejamos que a mesma seja apenas para neutralizar o LPS e não estimular as Mo-DCs.



**Figura 10. Viabilidade celular de Mo-DCs ativadas pelas proteínas recombinantes E7, gD e gDE7 após 24h de 48h de estímulo.** Mo-DCs sem estímulo (iDC) ou estimuladas durante 24h ou 48 horas com LPS (100 ng/mL), Polimixina B (10 µg/mL), Polimixina B (10 µg/mL) + LPS (100 ng/mL), E7 (0,75 µg/mL), gD (2,25 µg/mL) e gDE7 (3 µg/mL). Os dados expressam a média ± erro padrão da média provenientes de sete experimentos independentes.

### 3.6 Ensaio de indução de proliferação de linfócitos T por Mo-DCs

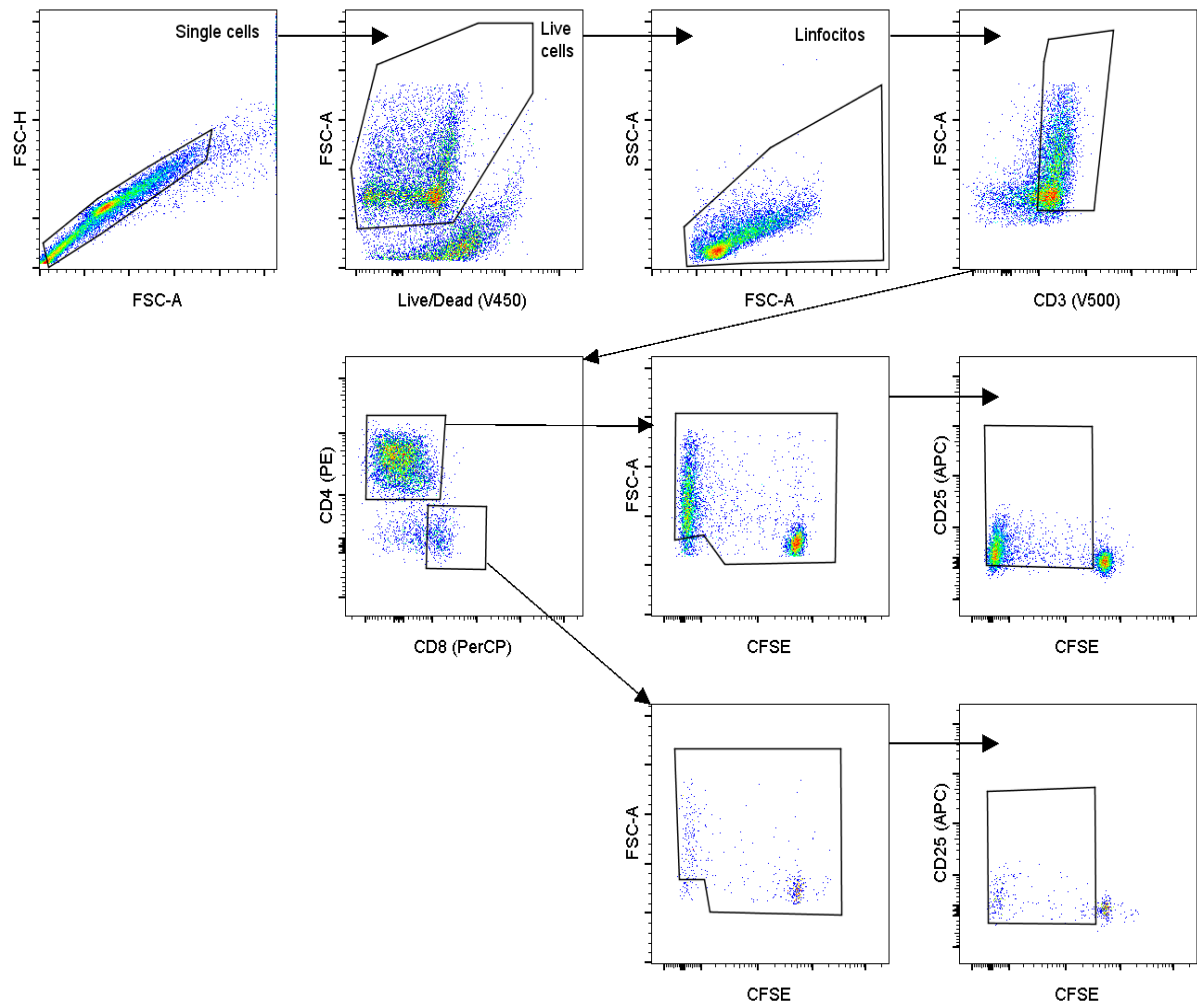
Utilizamos as CNAs provenientes da incubação das PBMCs mantidas em meio de cultura ou congeladas para os ensaios de linfo-estimulação pelas Mo-DCs. Essas



células foram incubadas com CFSE 2  $\mu$ M (*carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*) no escuro a 37°C por 10 minutos. Após este período, foi adicionado RPMI-1640 gelado seguida de incubação por 5 minutos a 4°C. As células foram lavadas e ressuspensas em meio de cultura RPMI-1640 acrescido de 10% de SFB e 1% de antibiótico/antimicótico, Para o ensaio de linfo-estimulação usamos as Mo-DCs ativadas como descrito anteriormente na presença das proteínas recombinantes ou LPS.

A co-cultura foi realizada em placa de 96 poços fundo “U” na proporção de 1:30 (célula dendrítica:linfócito T). Como controle positivo experimental, um grupo de CNAs marcadas com CFSE foi estimulado com o mitógeno fitohemaglutinina (PHA) a 2% e como controle negativo usamos um grupo sem estímulo. Após 5 dias de incubação a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, o sobrenadante foi removido e congelado para ensaio de detecção de citocinas. As células foram lavadas e marcadas com anticorpos fluorescentes para aquisição imediata em citômetro de fluxo.

Para determinação do fenótipo de membrana usamos para marcação os anticorpos: anti-CD3 (V500), anti-CD4 (PE), anti-CD8 (PerCP) e anti-CD25 (APC), em diluições previamente determinadas. Utilizamos também o marcador de viabilidade celular Live/Dead (*Live/Dead<sup>TM</sup> fixable violet dead cell stain kit*, Invitrogen). As células foram adquiridas no citômetro de fluxo (LRSFortessa ou FCASCanto II, BD Biosciences) através do *software* FACSDiva. Pelo menos 5.000 eventos selecionados por FSC x SSC foram adquiridos por amostra. Para análise, excluimos *doublets* e células mortas. Selecionamos as células positivas para cada marcador através de uma amostra sem marcação. Consideramos células que proliferaram aquelas que mostraram a diluição por CFSE e CD25<sup>+</sup> dentro das subpopulações CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> ou CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. A estratégia de análise da citometria de fluxo utilizando o *software* FlowJo (BD Biosciences) está representada na **figura 11**.



**Figura 11. Estratégia de seleção da população para análise de estímulo de linfoproliferação por Mo-DCs.** Gráficos extraídos do FlowJo, estilo *pseudocolor* onde mostramos um exemplo de estratégia para selecionar as células inicialmente pela exclusão de *doublets* (FSC-A x FSC-H), seguida da seleção de células viáveis usando o marcador Live/Dead. Consideramos os linfócitos dentro da população com tamanho e granularidade (FSC-A x SSC-A) compatíveis com as características de linfócitos em proliferação. Dentro desta população, selecionamos aqueles positivos para CD3 (V500) e assim as subpopulações CD4 (PE) e CD8 (PerCP). Excluimos por CFSE negativo x FSC-A aquelas células que possivelmente vieram da cultura de Mo-DCs e não foram marcadas por CFSE. Por fim, consideramos linfócitos que proliferaram aqueles com diluição de CFSE (CFSE<sup>low</sup>) e positivos para CD25 dentro de cada subpopulação de linfócito T marcado.

### 3.7 Detecção da produção de citocinas

Para detecção de citocinas no sobrenadante das cultura, utilizamos *kits* comerciais para CBA (*Cytometric Bead Array*, BD Biosciences) para detecção de IL-

1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, TNF- $\alpha$  e IL-10 em Mo-DCs e IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  para os ensaios de co-cultura com linfócitos T.

Os ensaios foram realizados de acordo com as instruções do fabricante dos *kits* “BD CBA Human Inflammatory Cytokines” (catálogo 551811) ou “BD CBA Human Th1/Th2 Cytokines” (catálogo 551809) usando amostras dos sobrenadantes das culturas congelados a -20°C ao final de cada experimento. Os dados foram obtidos no FACS Canto II e analisados usando o *software* FCAP Array (Softflow, Inc.).

### 3.8 RT-qPCR Array

Para os ensaios de RT-qPCR, RNA foi extraído a partir de Mo-DCs diferenciadas de PBMCs de câmara de leucorredução de 3 doadores saudáveis estimuladas ou não com gD, gDE7 e LPS, de acordo com o protocolo do *kit* Rneasy (Qiagen). Amostras de RNA foram quantificadas e avaliadas quanto à pureza e integridade usando Nanodrop (Thermo Scientific). Para cada amostra, cDNA foi sintetizado com 500 ng de RNA segundo as instruções do *kit* RT<sup>2</sup> First Strand (Qiagen). Para avaliar a expressão de genes alvos usamos o RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Human Dendritic & Antigen Presenting Cell (Qiagen, GeneGlobe ID: PAHS-406Z) segundo o protocolo do fabricante. Para as reações de qPCR foi utilizado RT<sup>2</sup> SYBER Green ROX qPCR Mastermix e os ensaios realizados em 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). A ferramenta *online* da Qiagen’s GeneGlobe foi utilizada para controle de qualidade e normalização das análises. Os dados foram analisados usando o *software* Perseus (TYANOVA *et al.*, 2016) para identificar a diferença entre as expressões gênicas. Para análise de enriquecimento de vias envolvidas de acordo com a expressão dos genes, utilizamos a ferramenta *online* gProfiler. Os dados foram expressos pela razão dos níveis de mRNA dos grupos estimulados por gD, gDE7 ou LPS pelo mRNA do grupo não estimulado (iDC).

Todo o ensaio acima descrito foi conduzido pela equipe do Laboratório de Doenças Neuromusculares e Centro de Estudo do Genoma Humano e Células-tronco coordenado pela Profa. Dra. Mayana Zatz. Os ensaios foram realizados a partir de amostras de Mo-DCs diferenciadas e ativadas em nosso laboratório e confirmadas quanto à ativação por imunofenotipagem dos marcadores previamente descritos.

Na tabela 2 consta a lista de genes examinados segundo símbolo e nome.

<b>Símbolo</b>	<b>Nome do gene</b>
CD44	<i>CD44 molecule</i>
CDC42	<i>cell division cycle 42</i>
ICAM1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>
ICAM2	<i>intercellular adhesion molecule 2</i>
RAC1	<i>Rac family small GTPase 1</i>
TAP2	<i>transporter 2, ATP binding cassette subfamily B member</i>
CCL19	<i>C-C motif chemokine ligand 19</i>
CD1A	<i>CD1a molecule</i>
CD1B	<i>CD1b molecule</i>
CD1C	<i>CD1c molecule</i>
CD1D	<i>CD1d molecule</i>
CD209	<i>CD209 molecule</i>
CD28	<i>CD28 molecule</i>
CD4	<i>CD4 molecule</i>
CD40	<i>CD40 molecule, TNF receptor superfamily 5</i>
CD40LG	<i>CD40 ligand</i>
CD74	<i>CD74 molecule</i>
CD80	<i>CD80 molecule</i>
CD86	<i>CD86 molecule</i>
CD8A	<i>CD8 subunit alpha</i>
HLA-A	<i>major histocompatibility complex, class I, A</i>
HLA-DMA	<i>major histocompatibility complex, class II, DM alpha</i>
HLA-DPA1	<i>major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1</i>
TAPBP	<i>TAP binding protein</i>
THBS1	<i>thrombospondin 1</i>
CCL5	<i>C-C motif chemokine ligand 5</i>
CCR1	<i>C-C motif chemokine receptor 1</i>
CCR2	<i>C-C motif chemokine receptor 2</i>
CCR5	<i>C-C motif chemokine receptor 5</i>
CXCR1	<i>C-X-C motif chemokine receptor 1</i>
CXCR4	<i>C-X-C motif chemokine receptor 4</i>
CSF2	<i>colony stimulating factor 2</i>
LYN	<i>LYN proto-oncogene, Src family tyrosine kinase</i>
RELB	<i>RELB proto-oncogene, NF-kB subunit</i>
TGFB1	<i>transforming growth factor beta 1</i>
CCL11	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 11</i>
CCL13	<i>C-C motif chemokine ligand 13</i>
CCL16	<i>C-C motif chemokine ligand 16</i>
CCL2	<i>C-C motif chemokine ligand 2</i>
CCL3	<i>C-C motif chemokine ligand 3</i>
CCL7	<i>C-C motif chemokine ligand 7</i>
CCL8	<i>C-C motif chemokine ligand 8</i>
CXCL1	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 1</i>
CXCL10	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 10</i>
CXCL12	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 12</i>
CXCL2	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 2</i>
FLT3LG	<i>fms related receptor tyrosine kinase 3 ligand</i>
IFNG	<i>Interferon, gamma</i>
IL10	<i>interleukin 10</i>
IL12A	<i>interleukin 12A</i>
IL12B	<i>interleukin 12B</i>

<b>IL16</b>	<i>interleukin 16</i>
<b>IL2</b>	<i>interleukin 2</i>
<b>IL6</b>	<i>interleukin 16</i>
<b>CXCL8</b>	<i>C-X-C motif chemokine ligand 8, interleukin 8</i>
<b>MIF</b>	<i>macrophage migration inhibitory factor</i>
<b>TNF</b>	<i>tumor necrosis factor</i>
<b>TNFSF11</b>	<i>TNF superfamily member 11</i>
<b>CCR3</b>	<i>C-C motif chemokine receptor 3</i>
<b>CSF1R</b>	<i>colony stimulating factor 1 receptor</i>
<b>FLT3</b>	<i>fms related receptor tyrosine kinase 3</i>
<b>ERBB2</b>	<i>erb-b2 receptor tyrosine kinase 2</i>
<b>CD2</b>	<i>CD2 molecule</i>
<b>FCER1A</b>	<i>Fc epsilon receptor Ia</i>
<b>FCER2</b>	<i>Fc epsilon receptor II</i>
<b>FCGR1A</b>	<i>Fc gamma receptor Ia</i>
<b>LRP1</b>	<i>LDL receptor related protein 1</i>
<b>TLR1</b>	<i>Toll like receptor 1</i>
<b>TLR2</b>	<i>Toll like receptor 2</i>
<b>TLR7</b>	<i>Toll like receptor 7</i>
<b>TLR9</b>	<i>Toll like receptor 9</i>
<b>VCAM1</b>	<i>vascular cell adhesion molecule 1</i>
<b>CDKN1A</b>	<i>cyclin dependent kinase inhibitor 1A</i>
<b>CEBPA</b>	<i>CCAAT enhancer binding protein alpha</i>
<b>CLEC4C</b>	<i>C-type lectin domain family 4 member C</i>
<b>FAS</b>	<i>Fas cell surface death receptor</i>
<b>IRF7</b>	<i>interferon regulatory factor 7</i>
<b>IRF8</b>	<i>interferon regulatory factor 8</i>
<b>ITGAM1</b>	<i>integrin subunit alpha M</i>
<b>ITGB2</b>	<i>integrin subunit beta 2</i>
<b>NFKB1</b>	<i>nuclear factor kappa B subunit 1</i>
<b>PTPRC</b>	<i>protein tyrosine phosphatase receptor type C</i>
<b>RELA</b>	<i>RELA proto-oncogene, NF-kB subun</i>
<b>STAT3</b>	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>

### 3.9 Forma de análise dos resultados

Os dados dos ensaios de citometria foram obtidos com o auxílio do software FlowJo (BD). O programa GraphPad Prisma foi usado para para construção dos gráficos e análise estatística. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). As comparações foram feitas por análise de variância (One-way ANOVA) seguida de teste de múltiplas comparações de Tukey. Diferenças com valores de  $P < 0,05$  foram consideradas significativas.

## 4. RESULTADOS

Neste trabalho, investigamos os efeitos das proteínas recombinantes derivadas da fusão genética da gD do HSV-1 com a oncoproteína E7 e da proteína recombinante E6 do HPV16 sobre a maturação de células dendríticas diferenciadas *in vitro* a partir de monócitos (Mo-DCs). Inicialmente, avaliamos os efeitos das proteínas recombinantes E6, E7, gD, gDE7 + E6 e gDE7 sobre as Mo-DCs de doadores saudáveis, provenientes de câmaras de leucorredução, usadas em doação de plaquetas por aférese. Posteriormente, os ensaios foram realizados usando sangue obtido de pacientes diagnosticadas com NIC graus 2/3. Os ensaios com as células de pacientes foram executados em duas etapas, devido à pandemia de COVID-19, as PBMCs coletadas durante este período foram congeladas. Para todas essas situações, PBMCs foram separadas e os monócitos cultivados na presença de IL-4 e GM-CSF. Ao 5º dia, ativamos as iDCs com as proteínas recombinantes por 24 ou 48 horas. Utilizamos LPS como controle positivo de ativação e um grupo iDC, sem estímulo, foi usado como controle sem ativação.

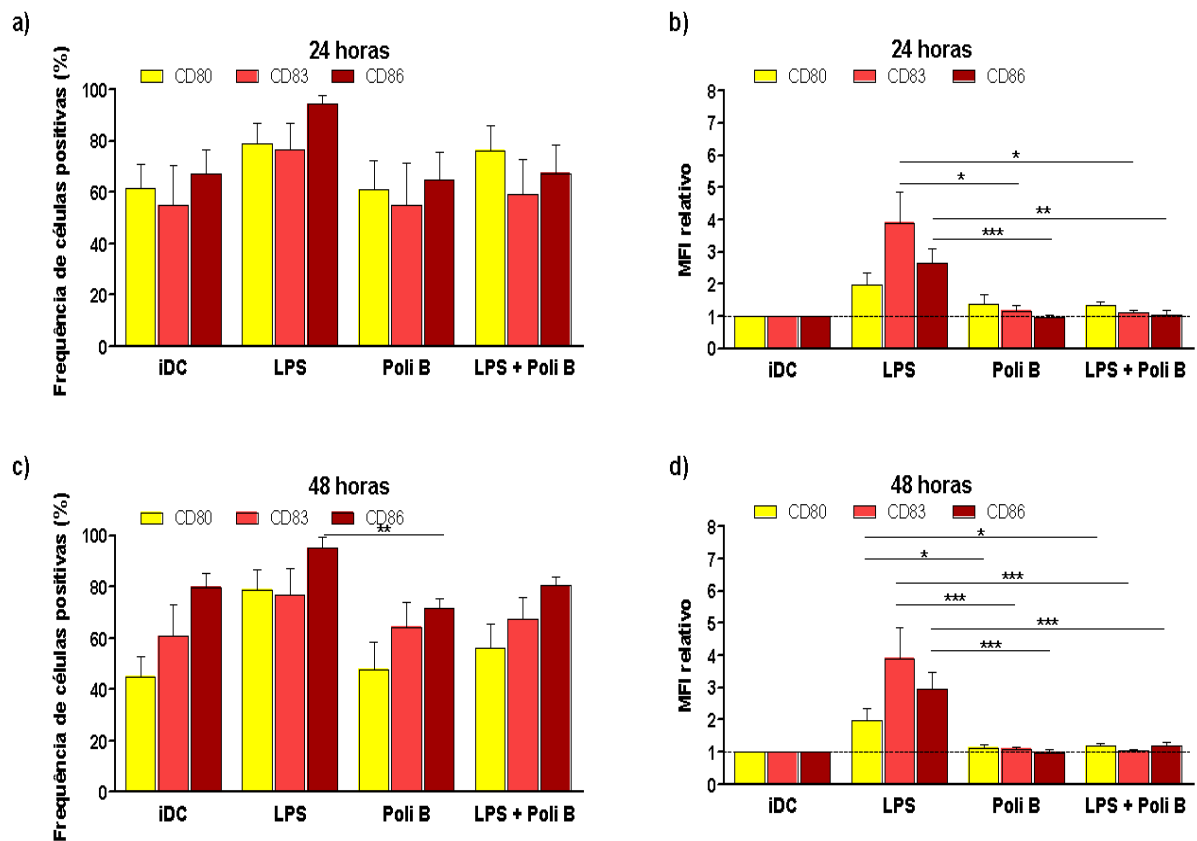
### 4.1 Polimixina B neutraliza efeitos do LPS sobre a ativação de Mo-DCs

Para examinarmos a ativação das Mo-DCs apenas pelas proteínas recombinantes, deveríamos desconsiderar o efeito do LPS residual possivelmente presente, uma vez que estas foram produzidas em linhagem bacteriana (*Escherichia coli*). Como a polimixina B é bastante utilizada para neutralizar os efeitos do LPS *in vitro*, antes de serem adicionadas às culturas, as proteínas recombinantes, gD, gDE7, E7 e E6 foram incubadas com Polimixina B por 2 horas a 37°C.

Também investigamos o efeito direto da polimixina B sobre a ativação de Mo-DCs, além de sua capacidade de inativação do LPS. Para isso, polimixina B (10 µg/mL) foi incubada com LPS (100 ng/mL). As Mo-DCs receberam polimixina B, LPS ou polimixina B + LPS e LPS sem tratamento prévio; após 24 e 48 horas, as células foram recuperadas e a expressão das moléculas coestimuladoras CD80, CD83 e CD86, avaliada.

Conforme mostrado na **figura 12**, o tratamento prévio com a polimixina B, eliminou efetivamente os efeitos do LPS mantendo os níveis de expressão das

moléculas CD80, CD83 e CD86 similares aos expressos pelas iDCs durante 24 horas, tanto quanto à frequência, quanto à MFI relativa. Nesses ensaios, ao usarmos a polimixina B sem outros estímulos, confirmamos que ela não modifica o fenótipo das Mo-DCs (ao menos nos parâmetros que avaliamos), de modo que consideramos razoável atribuir os efeitos observados após tratamento das Mo-DCs com as proteínas recombinantes às mesmas e não a efeitos residuais do LPS.



**Figura 12. Polimixina B inibe a ativação de Mo-DCs por LPS após 24 h e 48 h de estímulo.** Mo-DCs foram estimuladas durante 24 e 48 horas com LPS (100 ng/mL), Polimixina B (10 µg/mL) e Polimixina B (10 µg/mL) + (LPS 100 ng/mL), ou permaneceram sem estímulo (iDCs). Os gráficos mostram a frequência (%) de células positivas e mediana da intensidade de fluorescência (MFI) relativo para os marcadores de ativação CD80, CD83 e CD86 durante 24 (a, b) e 48 horas (c, d), respectivamente. Os dados expressam a média ± erro padrão da média de pelo menos cinco experimentos independentes para o tempo de 24 horas e nove experimentos independentes para o tempo de 48h. \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001 determinado por One-way ANOVA seguida de pós teste de Tukey.

#### 4.2 Efeito da proteína recombinante E6 em diferentes concentrações ou combinada com gDE7 na ativação de Mo-DCs de doadores saudáveis

Neste trabalho, avaliamos, primeiramente, os efeitos da proteína recombinante E6. Usando PBMCs isoladas de câmaras de leucorredução, diferentes doses de E6 combinadas ou não com gDE7 foram usadas como estímulo de Mo-DCs durante 24 e 48 horas. As doses escolhidas basearam-se nas concentrações equimolares da proteína E7 testadas juntamente com gDE7 em experimentos anteriores como demonstrado por Porchia *et al.* (2017) e que se mostraram eficientes em camundongos e humanos.

Com isso, conduzimos os experimentos a fim de determinar se a proteína recombinante E6 era capaz de levar ao aumento de expressão de moléculas coestimuladoras CD80 e CD86 e da molécula regulatória PD-L1.

Nossos resultados demonstram que a adição de E6 (0,075 - 0,75 - 7,5 µg/mL) à cultura levou a um aumento dose dependente da frequência de Mo-DCs que expressam CD80, atingindo valores superiores, inclusive, àqueles atingidos com o tratamento com LPS (**Figura 13**). Este efeito ativador foi menos nítido quando avaliamos a intensidade de fluorescência. Quando gDE7 (3 µg/mL) foi acrescentada à E6, observamos uma diminuição discreta da frequência de CD80 e, de modo semelhante, também na intensidade de marcação das células. Vimos também que E6 modificou a frequência de CD86 de maneira dose dependente, embora após 48 horas, quando gDE7 foi adicionada a expressão deste marcador diminuiu, o que não observamos em relação ao MFI. Embora E6 não modifique a frequência da expressão de PD-L1 sozinha ou na presença de gDE7, estando todos os grupos com alta percentagem de PD-L1 em sua superfície, a MFI relativa ao grupo iDC nos mostra aumento dose dependente e maior quando estimuladas por 48 horas em relação ao grupo não ativado.

Esses resultados, porém, foram obtidos em apenas dois experimentos independentes por falta da disponibilidade da proteína recombinante E6. Deste modo, eles podem ser tomados apenas como indicação do potencial ativador de E6 sobre as Mo-DCs, que, no entanto, não foi mais investigado no presente trabalho.



#### *4.3 Avaliação do efeito das proteínas recombinantes E7, gD e gDE7 em diferentes concentrações sobre a ativação de Mo-DCs de doadores saudáveis*

A fim de determinarmos os efeitos das proteínas recombinantes E7, gD e gDE7, sobre as Mo-DCs, avaliamos a expressão de CD80, CD86 e PD-L1 após 24 e 48 horas de tratamento. O tratamento foi feito com três diferentes concentrações de gDE7 (0,3 – 3 – 30 µg/mL) e seus equivalentes molares para E7 e gD.

A **figura 14** representa a frequência de expressão dos marcadores CD80, CD86 e PD-L1 pelas Mo-DCs e a MFI relativa, conforme estratégia de análise descrita anteriormente.

Como mostra a figura, após 24 horas, a frequência de células expressando CD80 mostrou tendência a aumentar de maneira dose-dependente, quer o tratamento tenha sido com E7, gD ou gDE7. Chama a atenção que gD foi a única proteína que chegou a se aproximar do LPS quanto a este parâmetro. Por outro lado, tanto E7 isoladamente, quando gDE7 parecem ter provocado aumentos menores na frequência de expressão de CD80. Fenômeno semelhante, mas mais claro, embora ainda sem atingir significância estatística, pode ser visto quando se avalia a intensidade de fluorescência das células. Para os dois outros marcadores avaliados, CD86 e PD-L1, o fenômeno geral parece ser o mesmo, porém com variações estatisticamente significativas na MFI deste marcador.

#### *4.4 Avaliação do efeito das proteínas recombinantes E7, gD e gDE7 sobre Mo-DCs de doadores saudáveis*

Diante dos resultados acima expostos, prosseguimos nossos experimentos usando as seguintes concentrações para proteínas recombinantes: E7 0,75 µg/mL, gD 2,25 µg/mL e gDE7 3 µg/mL (**Figura 15**). O objetivo, desta vez, foi determinar em qual intervalo de tempo de exposição às proteínas recombinantes 24 ou 48 horas, as Mo-DCs apresentavam maior expressão de moléculas coestimuladoras.

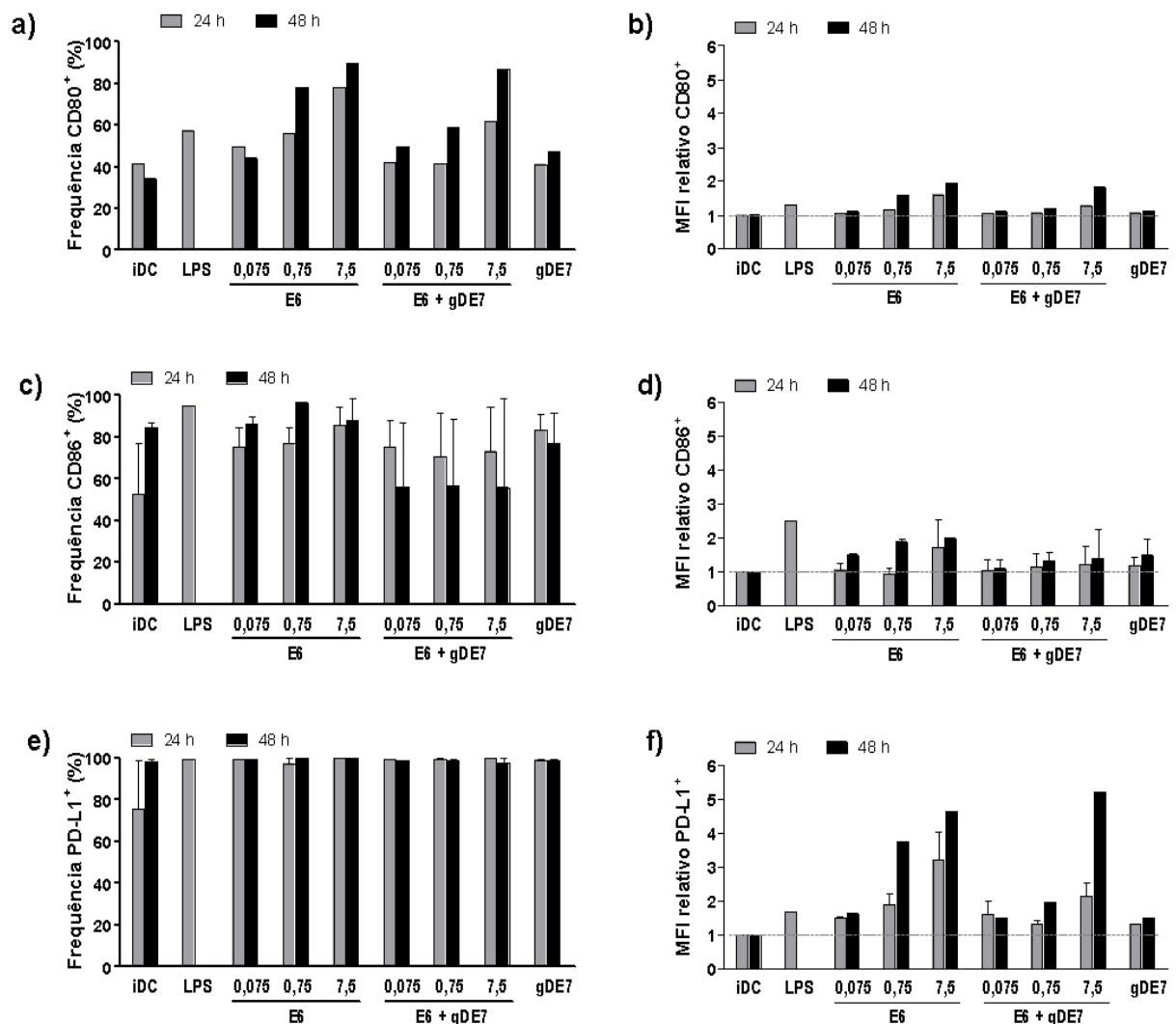
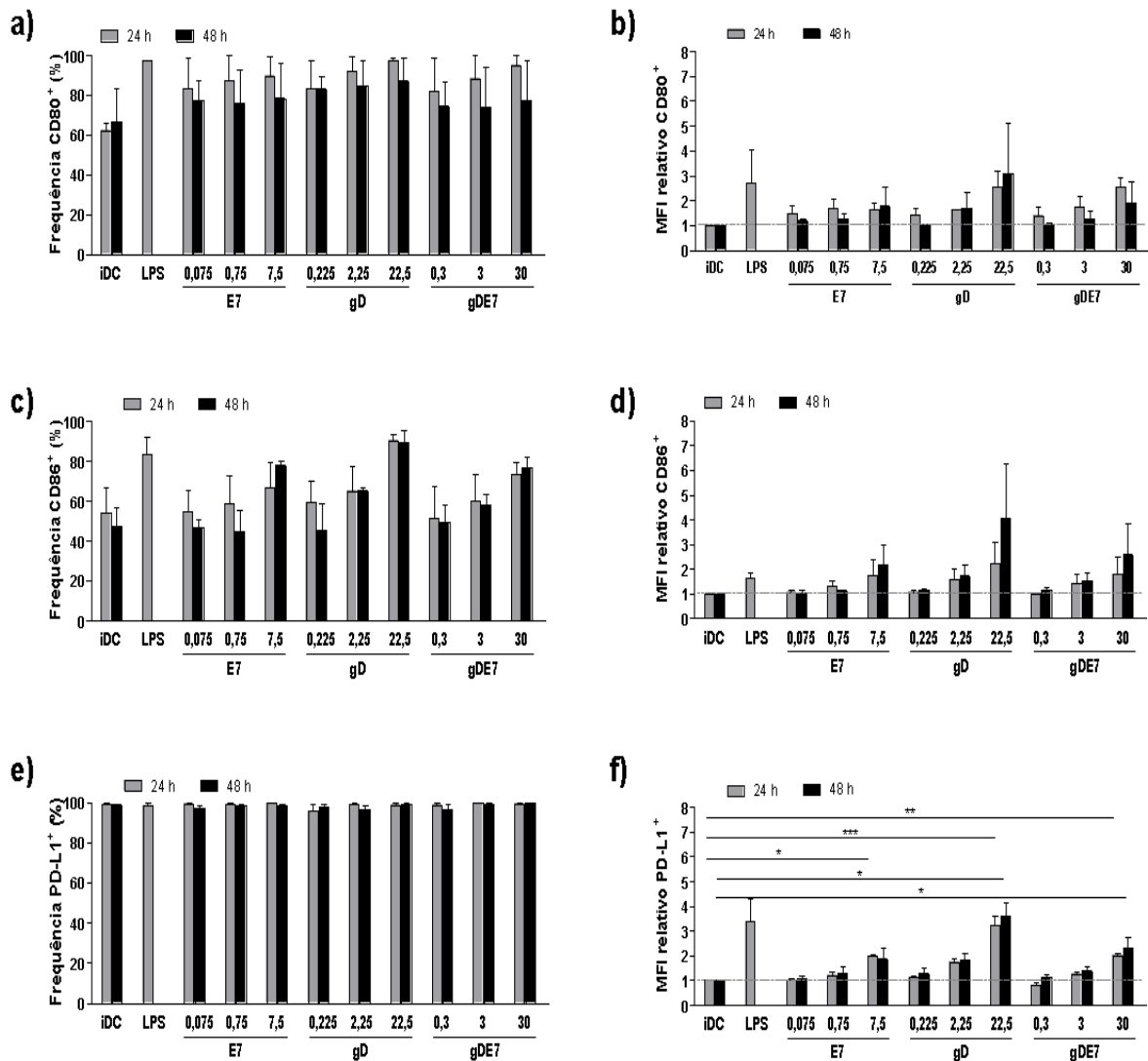


Figura 13. **Efeito da proteína recombinante E6 em diferentes concentrações ou combinada com gDE7 3,0 µg/mL na ativação de Mo-DCs.** Mo-DCs foram estimuladas durante 24 e 48 horas com E6 (0,075 – 0,75 – 7,5 µg/mL); E6 (0,075 – 0,75 – 7,5 µg/mL) + gDE7 (3,0 µg/mL), gDE7 (3,0 µg/mL), (LPS 100 ng/mL) ou permaneceram sem estímulo (iDC). Os gráficos mostram a frequência (%) de células positivas e intensidade média de fluorescência (MFI) relativo para os marcadores CD80 (a, b), CD86 (c, d) e PD-L1 (e, f). Os dados expressam média ± erro padrão da média de 2 (CD86, PD-L1) experimentos independentes ou resultado absoluto de 1 (CD80) experimento.

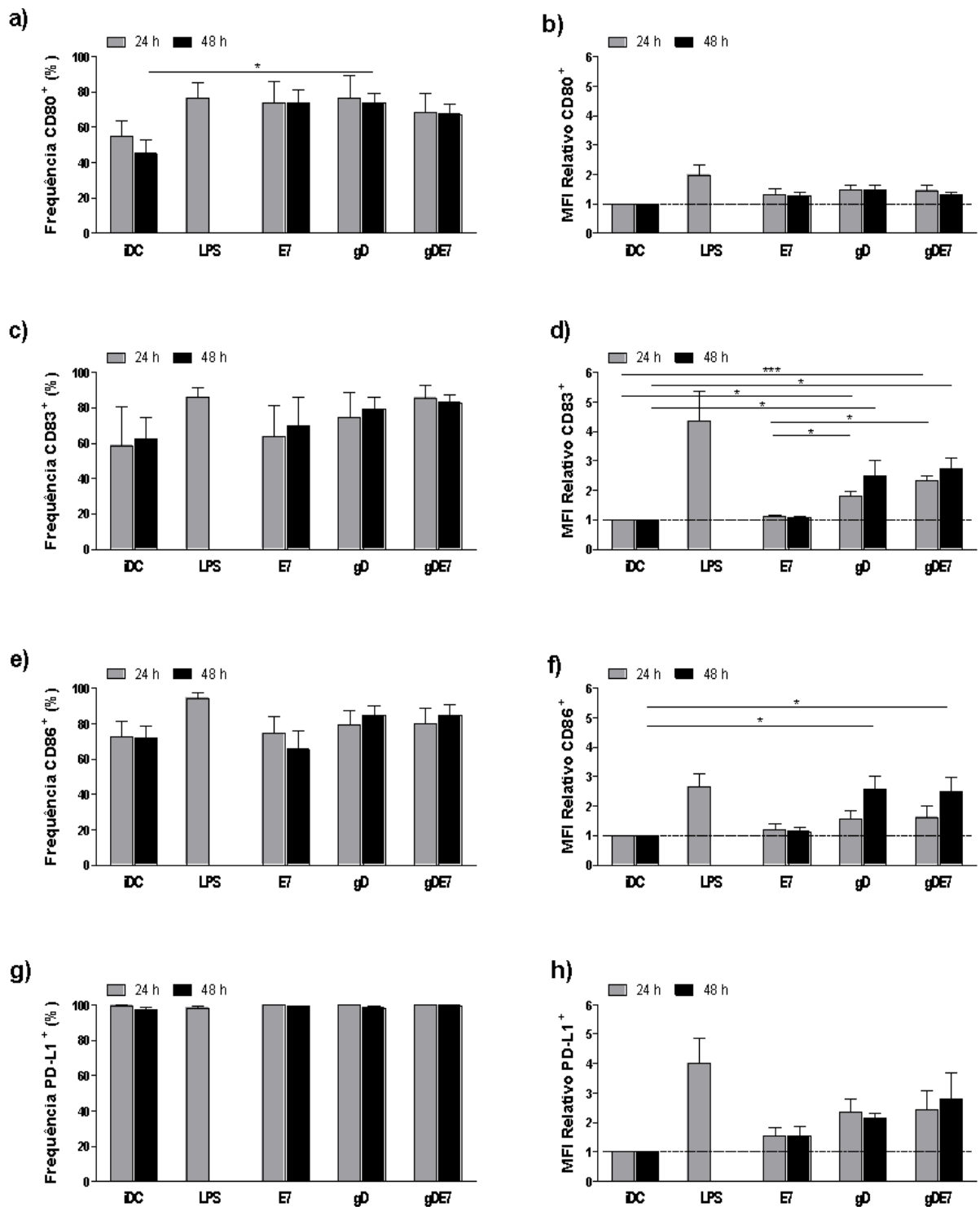
Para isso, as células recuperadas foram avaliadas quanto à expressão de marcadores de superfície e MFI relativa (à de iDC) para CD80, CD83, CD86, PD-L1, CD40 e HLA-ABC. Como controle positivo de ativação, as Mo-DCs foram estimuladas com LPS 100 ng/mL por 24 horas. Aqui não apresentamos os resultados de CD40 e HLA-ABC pois sua expressão não foi modificada por nenhum tratamento.



**Figura 14. Efeito das proteínas recombinantes E7, gD e gDE7 em diferentes concentrações na ativação de Mo-DCs.** Mo-DCs estimuladas durante 24 e 48 horas com E7 (0,075 – 0,75 – 7,5 µg/mL), gD (0,225 – 2,25 – 22,5 µg/mL), gDE7 (0,3 – 3,0 – 30,0 µg/mL), LPS (100 ng/mL) ou permaneceram sem estímulo (iDC). Os gráficos mostram a frequência (%) de células positivas e intensidade média de fluorescência (MFI) relativo para os marcadores CD80 (a, b), CD86 (c, d) e PD-L1 (e, f). Os dados expressam a média ± erro padrão da média de pelo menos dois experimentos independentes. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  determinado por One-way ANOVA seguida de pós teste de Tukey.

Nossos resultados indicam que durante 24 e 48 horas, as proteínas recombinantes E7 (0,75 µg/mL), gD (2,25 µg/mL) e gDE7 (3 µg/mL) aumentaram a expressão de CD80 quando comparada a iDC, com frequência semelhante àquela atingida pelas Mo-DCs ativadas com LPS. O mesmo foi observado nos grupos tratados com E7, gD e gDE7, com gD o aumento com significância estatística. A

análise de MFI da expressão de CD80 mostra aumento discreto da intensidade de fluorescência desta molécula pela E7, gD e gDE7 nos dois tempos avaliados. A figura nos mostra também que houve aumento da expressão de CD83 em relação a iDC pelas Mo-Dcs ativadas com E7, gD e gDE7, sendo esta última maior em 24 horas. Quando observamos MFI relativo ao grupo não ativado, E7 não aumenta a intensidade de fluorescência em nenhum dos tempos de estímulo. Já em Mo-DCs ativadas com gD por 24 e 48 horas, notamos aumento de CD83 com diferença estatística em relação às iDCs e às células tratadas com E7. Vimos também aumento de MFI nas células estimuladas com gDE7 comparadas às iDCs estatisticamente diferente em 24 e 48 horas. e ao grupo ativado com E7 durante 24 e 48 horas. Com relação ao marcador CD86, gD e gDE7 estiveram pouco aumentadas quando à presença deste marcador em 24 e 48 horas, o que não foi observado pelas Mo-DCs estimuladas com E7. Ao analisarmos intensidade de fluorescência, notamos que E7 também não aumenta em nenhum dos tempos, enquanto gD e gE7 aumentaram expressivamente quando mantidas por 48 horas em cultura, com diferença estatística comparada à iDC e níveis semelhantes aos encontrados nas Mo-DCs tratadas com LPS. PD-L1 esteve presente em todos os grupos avaliados, com alta frequência inclusive no grupo de células não ativadas. Nenhuma ativação foi notada quando observamos MFI para esta molécula estimulado por E7, gD ou gDE7, embora haja aumento discreto por gD e gDE7 em 24 e 48 horas.

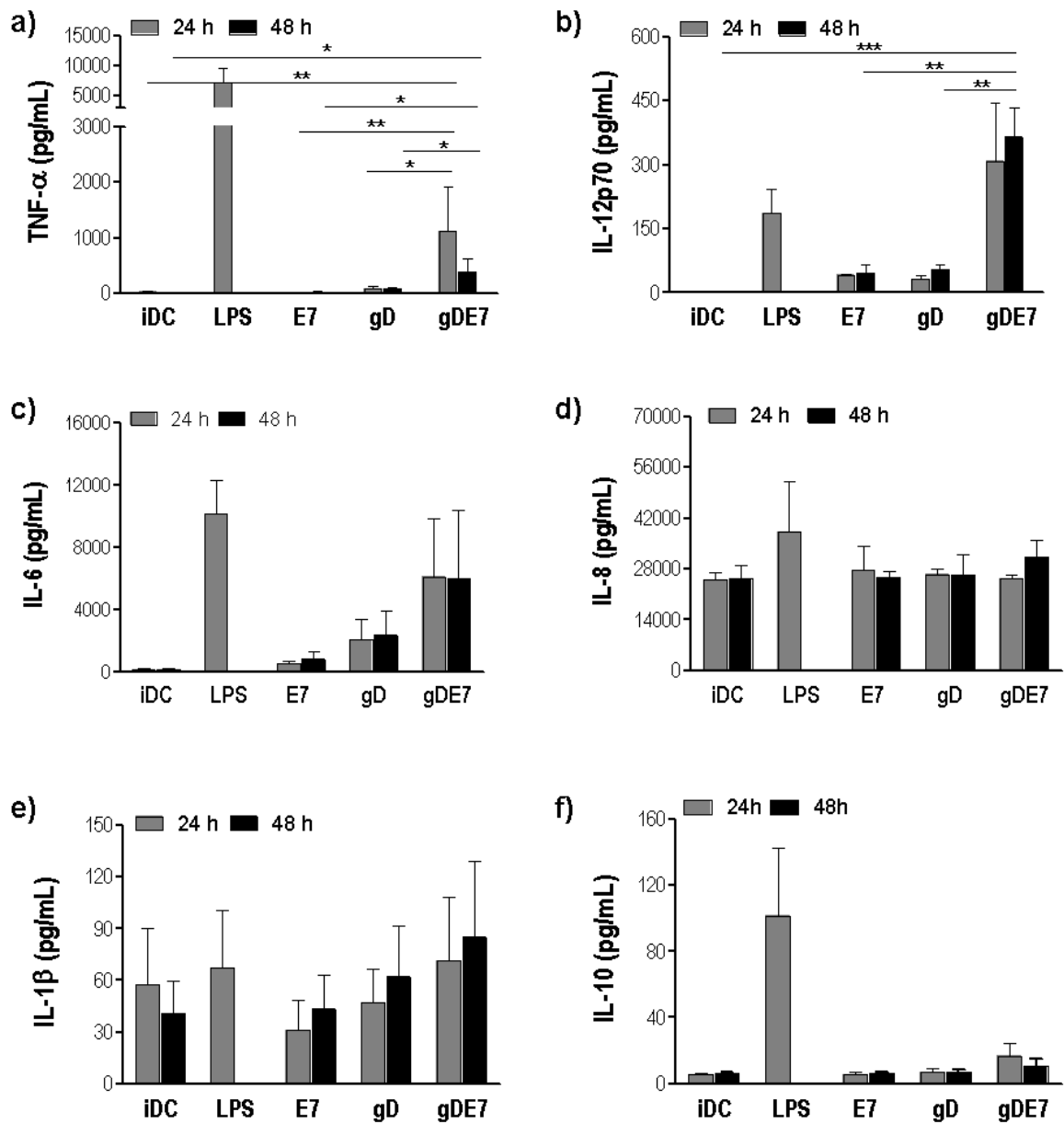


**Figura 15. Ativação de Mo-DCs estimuladas pelas proteínas recombinantes E7, gD e gDE7.** Mo-DCs foram estimuladas durante 24 e 48 horas aos estímulos E7 (0,75  $\mu\text{g/mL}$ ), gD (2,25  $\mu\text{g/mL}$ ), gDE7 (3,0  $\mu\text{g/mL}$ ) ou LPS 100 ng/mL ou permaneceram sem estímulo (iDC). Os gráficos mostram a frequência (%) de células positivas e intensidade média de fluorescência (MFI) relativo para os marcadores CD80 (a, b), CD83 (c, d), CD86 (e, f) e PD-L1 (g, h). Os dados expressam a média  $\pm$  erro padrão da média de pelo menos três experimentos independentes para o tempo de 24 h e nove experimentos para o tempo 48 h. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*  $< 0,001$  determinado por One-way ANOVA seguida de pós teste de Tukey.

#### 4.5 Mo-Dcs secretam citocinas pró-inflamatórias em resposta ao estímulo por E7, gD e gDE7

Um dos efeitos da ativação de DCs é a produção de citocinas que irão dar o terceiro sinal para direcionar o padrão da resposta de linfócitos T. Diante disso, avaliamos o padrão de citocinas presentes no sobrenadante das culturas de Mo-DCs ativadas durante 24 ou 48 horas com E7 (0,75µg/mL), gD (2,25 µg/mL) e gDE7 (3 µg/mL).

A **figura 16** nos mostra que TNF- $\alpha$  foi encontrado em maiores concentrações nas culturas de Mo-DCs estimuladas com gDE7 durante 24 e 48 horas do que nas culturas não estimuladas ou estimuladas com E7 ou gD. Quando avaliamos IL-12p70, vimos que a concentração desta citocina esteve aumentada nas culturas de Mo-DCs ativadas com gDE7 3 µg/mL durante 48 horas quando comparadas às iDCs e àquelas ativadas por E7 e gD, alcançando níveis mais elevados que as Mo-DCs ativadas com LPS. Em relação a IL-6, observamos aumento discreto em gD e gDE7 nos dois tempos testados. Nenhuma diferença de ativação foi observada para a citocina IL-8. Embora esteja aumentada nas culturas de células ativadas com gD e gDE7 por 48 horas em relação a 24 horas, não observamos aumento expressivo de IL-1 $\beta$  nos grupos testados *versus* iDC. De maneira interessante, observamos também nesta figura que E7, gD e gDE7, nos dois tempos testados, não promove aumento da secreção de IL-10, importante para indução de linfócitos T reguladores, no sobrenadante quando comparamos ao grupo iDC, com níveis muito abaixo do ao grupo tratado com LPS.

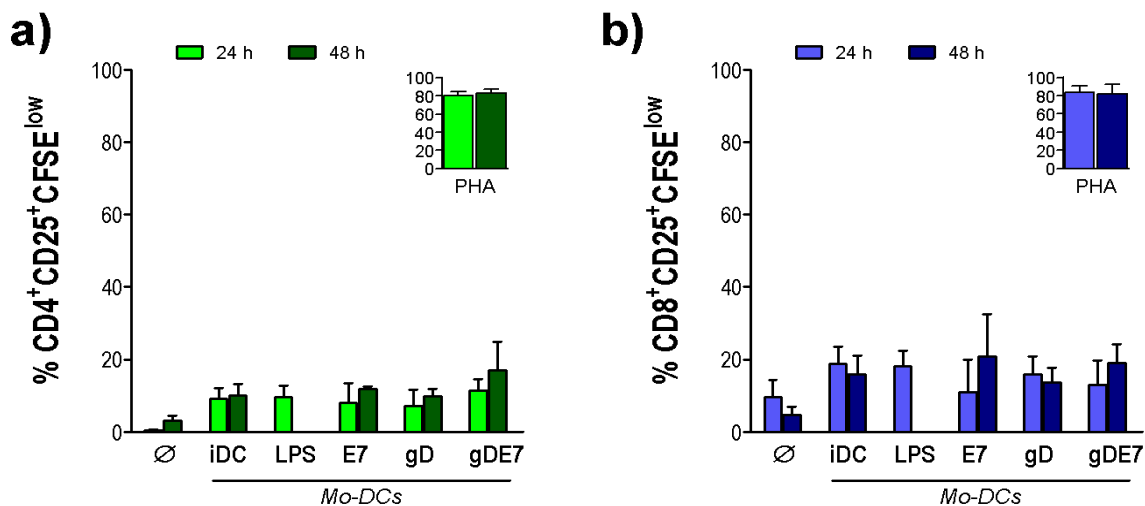


**Figura 16. Mo-Dcs secretam citocinas pro-inflamatórias em resposta as proteínas recombinantes E7, gD e gDE7.** Mo-DCs foram estimuladas durante 24h e 48 horas com E7 (0,75  $\mu\text{g/mL}$ ), gD (2,25  $\mu\text{g/mL}$ ), gDE7 (3,0  $\mu\text{g/mL}$ ), LPS (100 ng/mL) ou permaneceram sem estímulo (iDC). Liberação de TNF- $\alpha$  (a), IL-12p70 (b), IL-6 (c), IL-8 (d), IL-1 $\beta$  (e) e IL-10 (f) detectado no sobrenadante das respectivas culturas por ensaio de CBA. Os dados expressam a média  $\pm$  erro padrão da média de três experimentos independentes. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  determinado por One-way ANOVA seguida de pós teste de Tukey.

#### 4.6 Linfo-estimulação alogênica por Mo-DCs ativadas com E7, gD e gDE7

A capacidade de induzir a proliferação de linfócitos T alogênicos é característica típica de DCs ativadas.

A **figura 17** mostra a resposta proliferativa de linfócitos T CD4 e CD8 a Mo-DCs tratadas com E7, gD e gDE7. Nota-se que, enquanto o estímulo com PHA levou mais de 80% dos linfócitos a proliferar, as Mo-DCs, independentemente do tratamento, foram muito menos eficazes, mal chegando a estimular 20% dos linfócitos T CD4+ ou CD8+ a se dividirem. Ainda, quando se comparam os diferentes tratamentos recebidos pelas Mo-DCs não se encontram diferenças significativas, embora mostre um discreto aumento da proliferação de linfócitos T CD4+ pelas Mo-DCs ativadas com gDE7 por 48 horas.

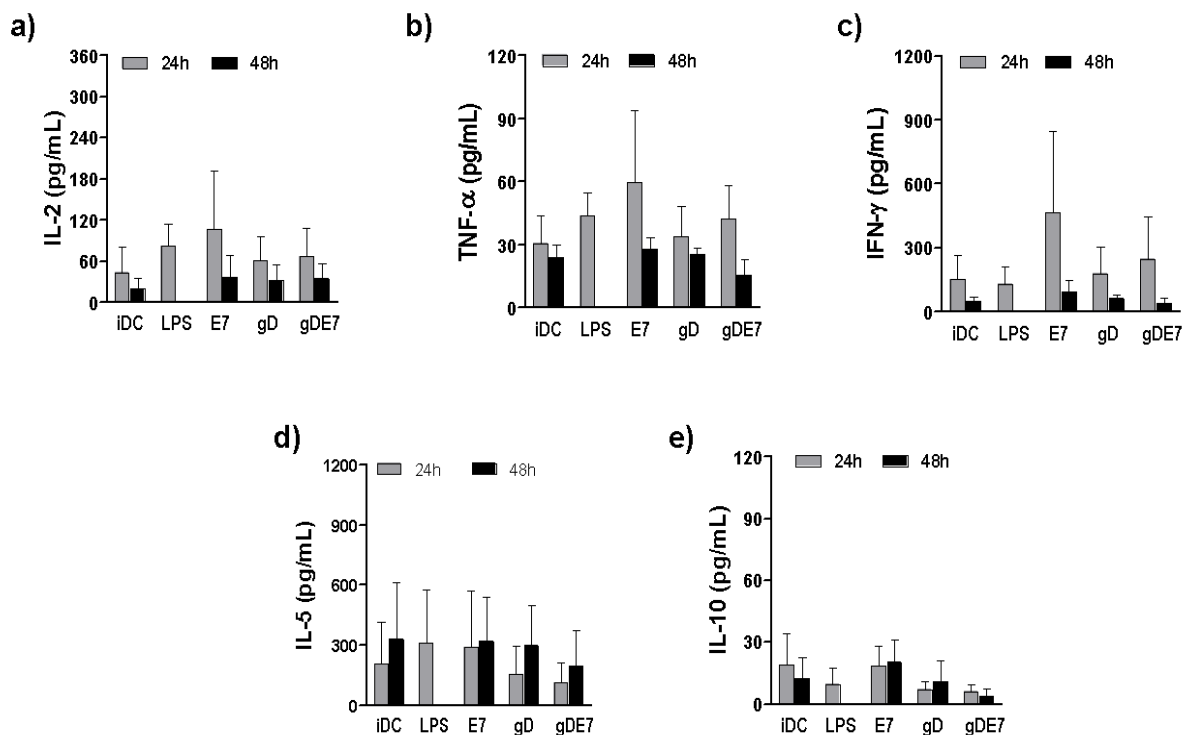


**Figura 17.** Linfo-estimulação alogênica induzida por Mo-DCs ativadas com as proteínas recombinantes E7, gD e gDE7. Mo-DCs estimuladas durante 24 e 48 horas com E7 (0,75 µg/mL), gD (2,25 µg/mL), gDE7 (3,0 µg/mL), LPS (100 ng/mL) ou sem estímulo (iDC) foram colocadas em co-cultura por 5 dias com células não aderentes alogênicas marcadas com CFSE. Como controle negativo foram utilizadas células marcadas com CFSE e não estimuladas ( $\emptyset$ ) e, como controle positivo as células foram marcadas com CFSE e estimuladas com fitohemaglutinina (PHA). As células foram avaliadas dentro da população CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (a) ou CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (b) e consideradas proliferativas aquelas CD25<sup>+</sup>CFSE<sup>low</sup>. Os dados expressam a média  $\pm$  erro padrão da média de três experimentos independentes para 24 h e seis para 48 h, respectivamente.

Dentro deste ensaio, investigamos ainda, as citocinas presentes nos sobrenadantes recuperados destas co-culturas. Utilizando método de CBA, avaliamos a quantidade de IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5 e IL-10 (**Figura 18**). Assim como observamos na porcentagem de proliferação de linfócitos T estimulados pelas Mo-



DCs, houve uma grande variação de secreção de citocinas entre os ensaios e não encontramos diferença entre os grupos experimentais. Para IL-2, TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  notamos aumento da presença destas citocinas nas co-culturas com Mo-DCs ativadas por 24 horas, especificamente E7 apresentou maiores níveis nessas três citocinas avaliadas. Em relação a IL-5 vimos discreto aumento na co-cultura com Mo-DCs ativadas E7 por 24 horas, enquanto as ativadas com gD e gDE7 mostraram pouco aumento em 48 horas. Os níveis de IL-10 encontrados nas co-culturas com Mo-DCs estimuladas por gD e gDE7 por 48 horas pelos grupos tratados com LPS e iDC. Os níveis de IL-4 não foram detectáveis nestes ensaios.



**Figura 18. Citocinas presentes na co-cultura de linfócitos T e Mo-Dcs ativadas com as proteínas recombinantes E7, gD e gDE7.** Após 5 dias de co-cultura linfócitos T + Mo-DCs estimuladas com E7 (0,75  $\mu\text{g/mL}$ ), gD (2,25  $\mu\text{g/mL}$ ), gDE7 (3,0  $\mu\text{g/mL}$ ), LPS (100 ng/mL) durante 24h e 48h ou sem estímulo (iDC). Liberação de IL-2 (a) , TNF- $\alpha$  (b), INF- $\gamma$  (c) , IL-5 (d) e IL-10 (e) no sobrenadante das respectivas co-culturas por ensaio de CBA. Os dados expressam a média  $\pm$  erro padrão da média de três experimentos independentes.

#### 4.7 gD e gDE7 induzem ativação de Mo-DCs após 48 horas de ativação

Nos ensaios anteriores vimos que a proteína recombinante gD (2,25  $\mu\text{g/mL}$ ) aumentou a expressão de CD80, CD83 e CD86 e controlou a expressão de PD-L1 por 48 horas de ativação, e gDE7 (3  $\mu\text{g/mL}$ ) aumentou a expressão de CD83 e CD86,

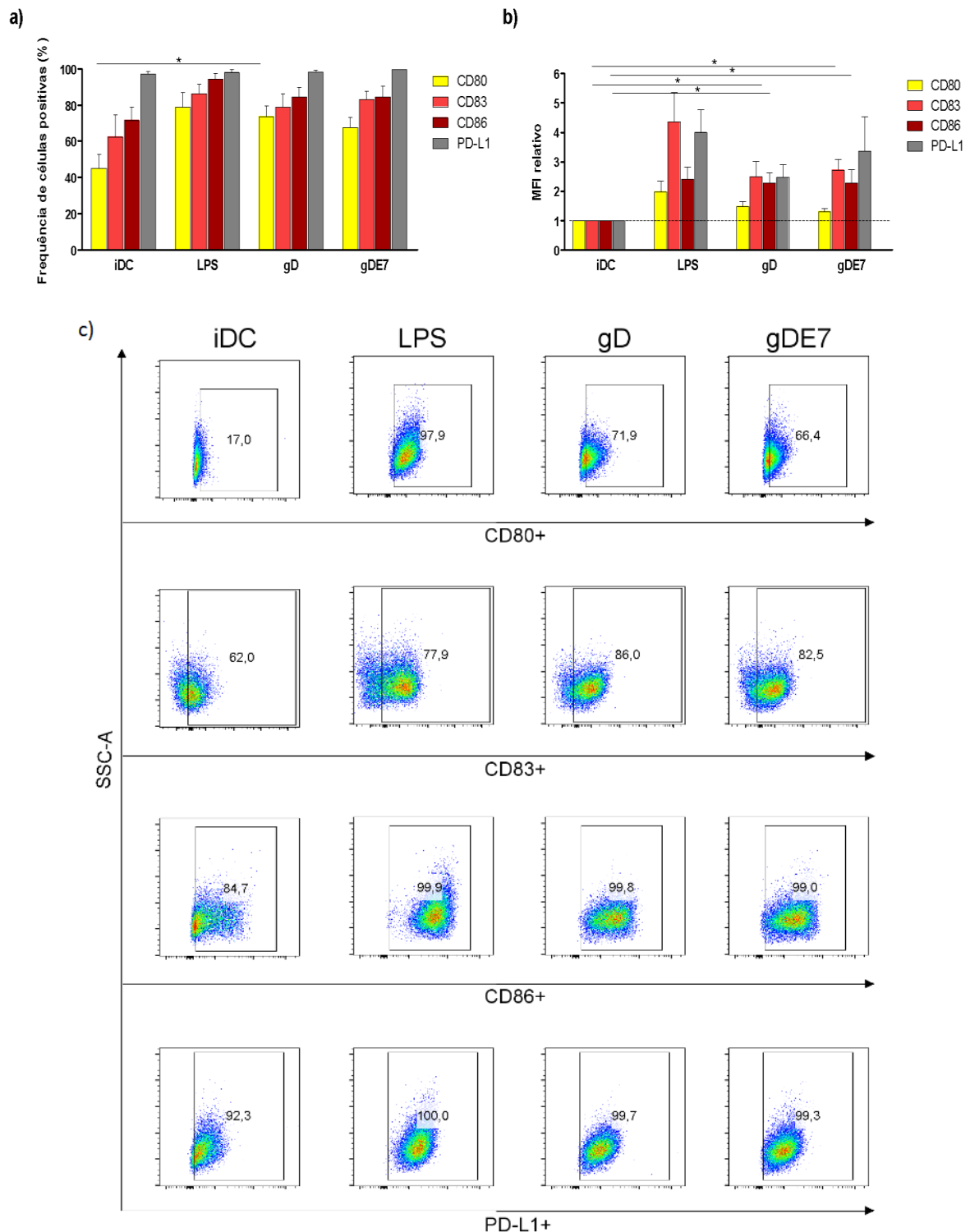
controlou a expressão de PD-L1, aumentou as citocinas IL-12p70 e TNF- $\alpha$  melhor em 48 horas de ativação. Com isso, decidimos que 48 horas seria o tempo adequado para as análises subsequentes do projeto.

A **figura 19** mostra que durante 48 horas, a proteína recombinante gD (2,25  $\mu$ g/mL) aumentou a frequência de CD80 quando comparada a iDC com diferença estatística. Observamos também um discreto aumento na frequência de CD83 em Mo-DCs ativadas com gDE7. A frequência de CD86 também apresentou aumento discreto em gD e gDE7. Assim como vimos nos ensaios anteriores, PD-L1 esteve aumentado em todos os grupos tratados, inclusive o sem estímulo (iDC). A análise de MFI da expressão dessas moléculas nos mostra que gD e gDE7 também aumentam MFI relativo a iDC das moléculas CD83 e CD86, com discreto aumento em PD-L1 por gDE7, não significativo e ainda menor em gD.

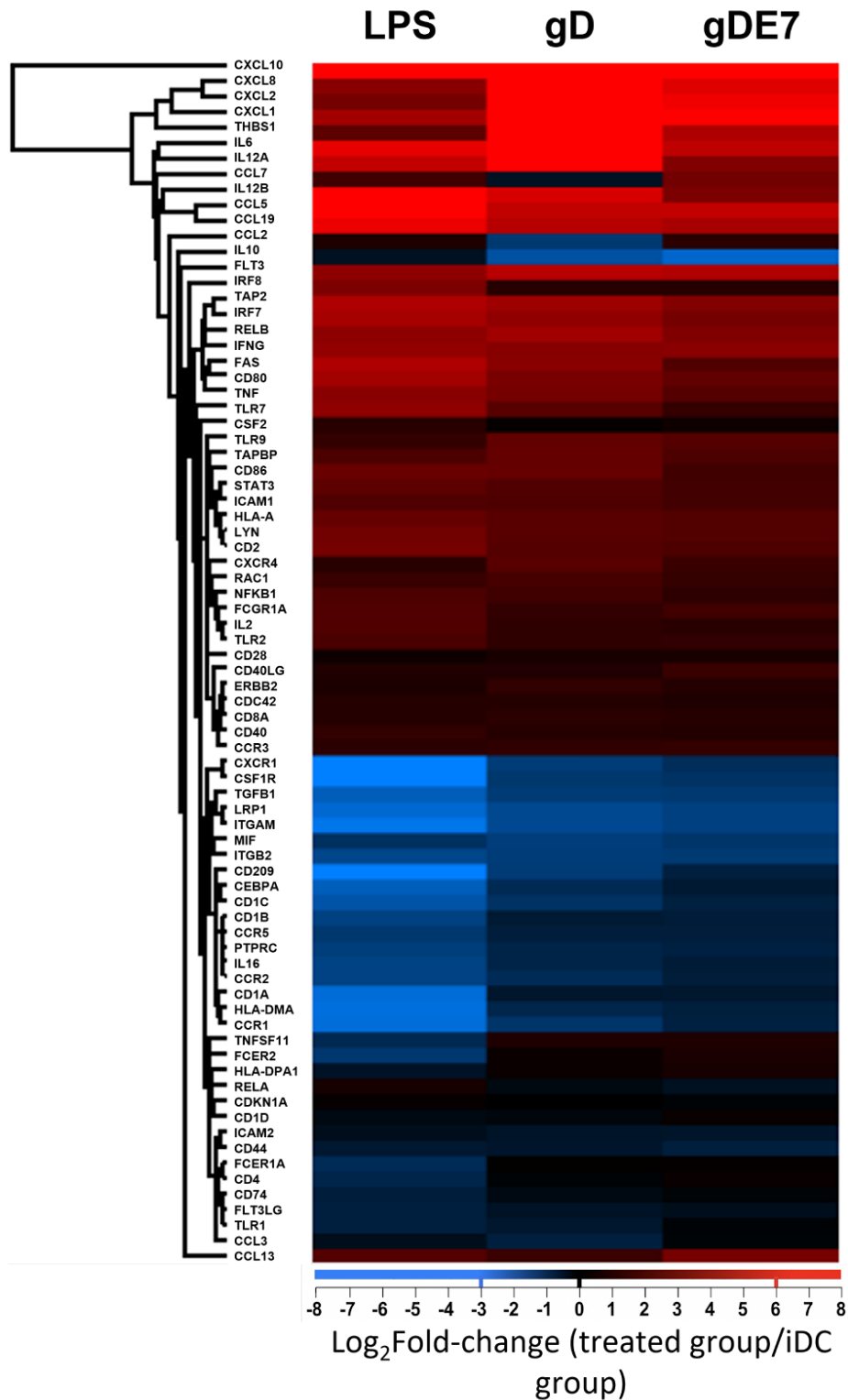
A **figura 19c** representa, em gráfico *pseudocolor*, a mudança na frequência das populações positivas para cada as moléculas CD80, CD83, CD86 e PD-L1 versus SSC (*side scatter*) em 1 experimento. iDC são as células não estimuladas e LPS foi usado como controle experimental de ativação. As características dos aumento de eventos ficam evidentes com o deslocamento da população de Mo-DCs ativadas com gD e gDE7 para CD80, CD83 e CD86 em relação ao iDC. Todos os grupos mostram uma alta frequência da expressão de PD-L1.

A fim de verificar a expressão gênica em Mo-DCs, utilizamos o *kit* comercial para PCR-array (Qiagen) para análise de genes envolvidos na ativação e apresentação de antígenos por DCs (descritos na seção 3.8). A análise de *heat map* da expressão gênica de Mo-DCs ativadas com as proteínas recombinantes gD e gDE7 por 48 horas ou LPS por 24 horas em relação ao grupo iDC está representado na **figura 20**.

Podemos observar aumento de níveis de expressão de dos seguintes genes relacionados a ativação de Mo-DCs por gDE7 em relação a iDC: ICAM1, TAP2, CCL19, CD80, CD86, HLA-A, THBS1, CCL19, LYN, RELB - genes envolvidos na captura, apresentação de antígenos e diferenciação de DCs; as citocinas e quimiocinas CCL13, CCL19, CXCL1, CXCL10, CXCL2, CXCL8, FLT3LG, IFNG, IL12A, IL12B e TNF; IRF8, LYN, RELB, STAT3 - genes relacionados à transdução de sinais. Em contrapartida, a expressão de IL-10, TGFB1, LRP1, ITGAM, MIF e ITGB2 apresentaram diminuídos comparados ao iDC.

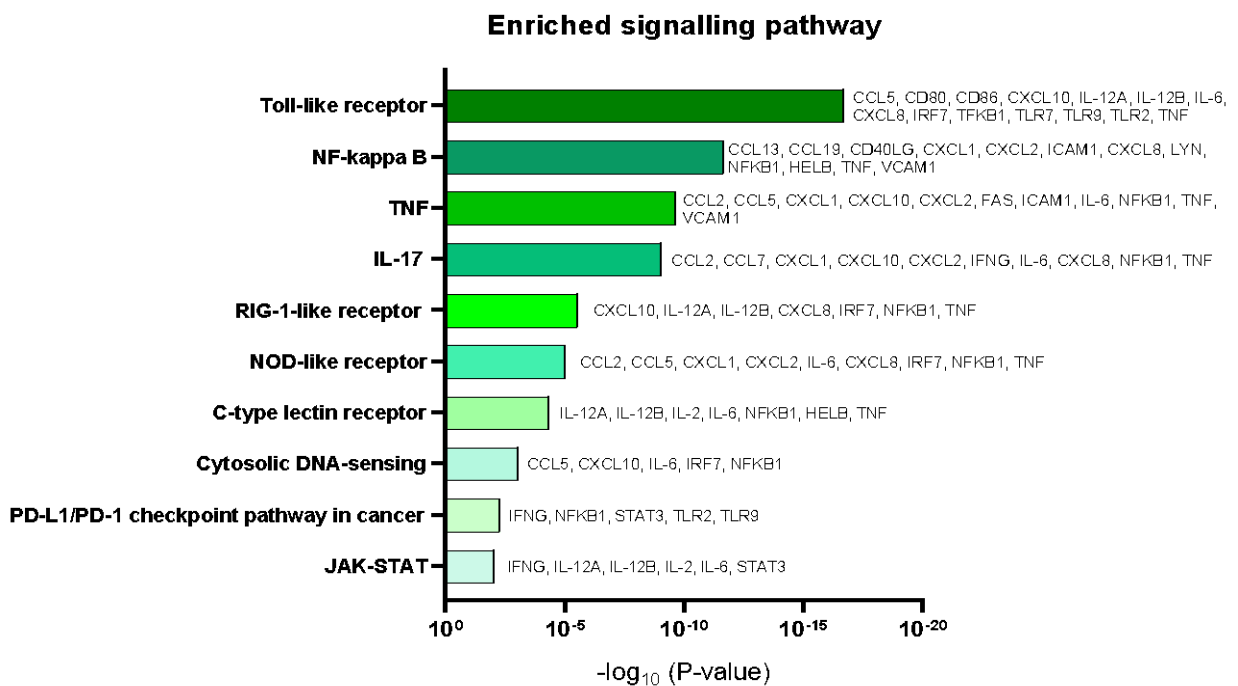


**Figura 19. As proteínas recombinantes gD e gDE7 induzem a ativação de Mo-DCs após 48 horas de estímulo.** Os gráficos mostram a frequência (%) de células positivas (a) e intensidade média de fluorescência (MFI) relativo ao iDC (b) para os marcadores CD80, CD83, CD86 e PD-L1. Representação em gráfico *pseudocolor* de análise de um experimento para definição de população positiva para cada molécula *versus* SSC-A (c). Os dados expressam a média  $\pm$  erro padrão da média de experimentos independentes sendo 9 (CD80), 6 (CD83), 10 (CD86), 8 (PD-L1). \* $p < 0,05$  determinado por One-way ANOVA seguida de pós teste de Tukey.



**Figura 20. Expressão gênica de Mo-DCs estimuladas com as proteínas recombinantes gD e gDE7 durante 48 horas.** Mo-DCs de três doadores saudáveis e estimuladas durante 48 horas com gD (2,25 µg/mL), gDE7 (3,0 µg/mL), LPS (100 ng/mL) apresentaram alteração gênica em relação às DCs não estimuladas (iDCs). O *clustergram* do RT<sup>2</sup> PCR Array foi normalizado usando Log<sub>2</sub>(fold-change) dos grupos ativados/grupo iDC.

Diante desses resultados, usando o *software gProfiler*, os diferentes genes que tiveram suas expressões modificadas pela ativação das Mo-DCs com gDE7 em relação às iDCs foram agrupados e, a partir dessa análise funcional, foi possível observar vias de sinalização envolvidas, tendo como destaque: TLR e NFκB (**Figura 21**).



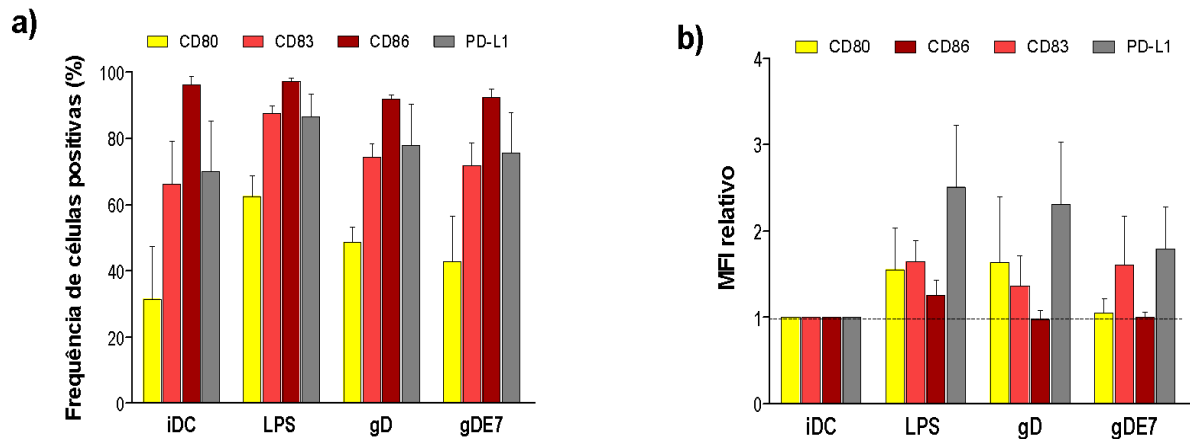
**Figura 21.** Enriquecimento de vias de sinalização após análise da expressão dos genes regulados em Mo-DCs ativadas com a proteína recombinante gDE7. Análise de Mo-DCs de três doadores saudáveis estimuladas durante 48 horas com gDE7 (3,0 µg/mL) por RT<sup>2</sup> PCR Array. A análise de enriquecimento foi realizada usando a ferramenta web *g.Profiler*. Os dados do RT<sup>2</sup> PCR Array foram normalizados usando  $\text{Log}_2(\text{fold-change})$  dos grupos ativados/grupo iDC.

#### 4.8 Ensaios de ativação de Mo-DCs de pacientes HPV16+ por gD e gDE7

Os resultados obtidos dos efeitos de gD e gDE7 nas ativações de Mo-DCs de doadores saudáveis nos direcionaram para investigar a resposta dessas mesmas células em pacientes HPV16+ diagnosticadas com NIC 2/3. Para isso, PBMCs foram separadas e incubadas como descrito anteriormente. No quinto dia de cultura foram

estimuladas por gD (2,25 µg/mL) ou gDE7 (3 µg/mL) por 48 horas. LPS 100 ng/mL durante 24 horas foi usado como controle positivo de maturação das Mo-DCs.

Devido à pandemia de COVID-19, parte do material proveniente das pacientes foi congelado. Sendo assim, consideramos descrever os resultados iniciais como Mo-DCs diferenciadas a partir de PBMCs não congeladas. Sendo assim, a **figura 22** mostra os efeitos de gD e gDE7 sobre os marcadores CD80, CD83, CD86 e PD-L1.



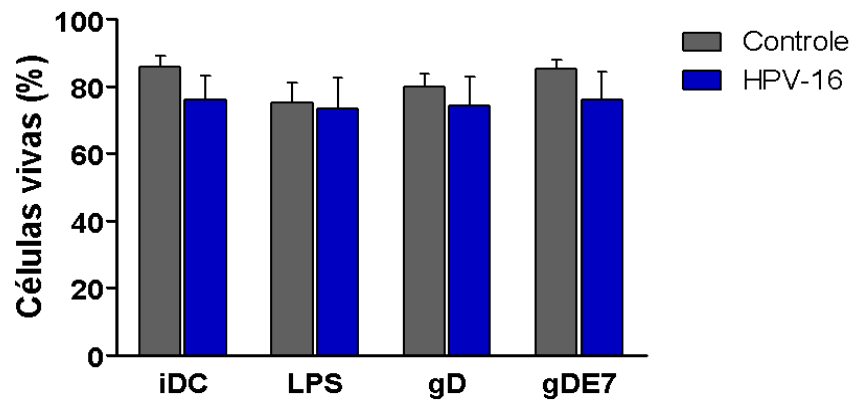
**Figura 22. Efeito das proteínas recombinantes gD e gDE7 sobre a ativação de Mo-DCs de pacientes HPV16+.** Mo-DCs de pacientes HPV16+ foram estimuladas durante 48 horas com os estímulos gD (2,25 µg/mL), gDE7 (3,0 µg/mL), LPS (100 ng/mL) ou permaneceram sem estímulo (iDC). Os gráficos mostram a frequência (%) de células positivas (a) e intensidade média de fluorescência (MFI) relativo (b) para os marcadores CD80, CD83, CD86 e PD-L1 durante 48 horas, respectivamente. Os dados expressam a média ± erro padrão da média de 2 (CD80, CD83) ou 3 (CD86, PD-L1) experimentos independentes.

Esses dados nos mostram que gD e gDE7 induziram um discreto aumento na frequência de expressão de CD80, CD83 e PD-L1 em relação ao grupo iDC, o que não foi visto em CD86. Com relação ao MFI, gD e gDE7 também não aumentou a intensidade dessa molécula. gDE7 não aumentou MFI CD80, CD86, apenas um leve aumento em CD83 e PD-L1.

Para continuarmos a avaliação da expressão destas moléculas em Mo-DCs de pacientes HPV16+, PBMCs foram descongeladas e submetidas ao mesmo protocolo de diferenciação com IL-4 e GM-CSF e ativação com gD e gDE7 por 48 horas.

Após 7 dias de cultura, avaliamos as células recuperadas através do marcador de viabilidade. Na **figura 23** vimos que as Mo-DCs de doadoras saudáveis (grupo controle) estavam em sua maioria viáveis em todos os grupos tratados e o grupo não estimulado. Embora a porcentagem de células viáveis mais baixa que o grupo

controle, as Mo-DCs das pacientes também estiveram, em sua maioria, vivas em todos os tratamentos.



**Figura 23. Viabilidade celular de Mo-DCs diferenciadas a partir de PBMCs descongeladas.** Mo-DCs não ativadas (iDC) ou ativadas com os estímulos gD (2,25 µg/mL), gDE7 3 µg/mL durante 48 horas e LPS (100 ng/mL) por 24 horas. Os dados expressam a média ± erro padrão da média proveniente de sete (pacientes HPV16) e oito (doadores saudáveis - controle).

Com isso, demos sequência a avaliação do efeito das proteínas recombinantes gD e gDE7 sobre as moléculas coestimuladoras CD80, CD83 e CD86 além da molécula reguladora PD-L1 dessas Mo-DCs derivadas de PBMCs que foram descongeladas.

A **figura 24** mostra que gD e gDE7 aumentam a frequência de CD80 nas Mo-DCs do grupo controle comparadas às iDCs e não aumentou nas Mo-DCs das pacientes HPV16+. Em relação ao MFI relativo ao grupo iDC, gD e gDE7 aumentaram a intensidade de fluorescência de CD80 em relação ao grupo iDC.

Notamos que a frequência de CD83 esteve aumentada nas Mo-DCs ativadas com gD comparado ao iDC no grupo controle, sem diferença de ativação nas Mo-DCs das pacientes. Em relação a intensidade de fluorescência de CD83, houve um discreto aumento nas Mo-DCs de doadoras saudáveis ativadas por gD e gDE7, alcançando expressão semelhante ao grupo ativado com LPS.

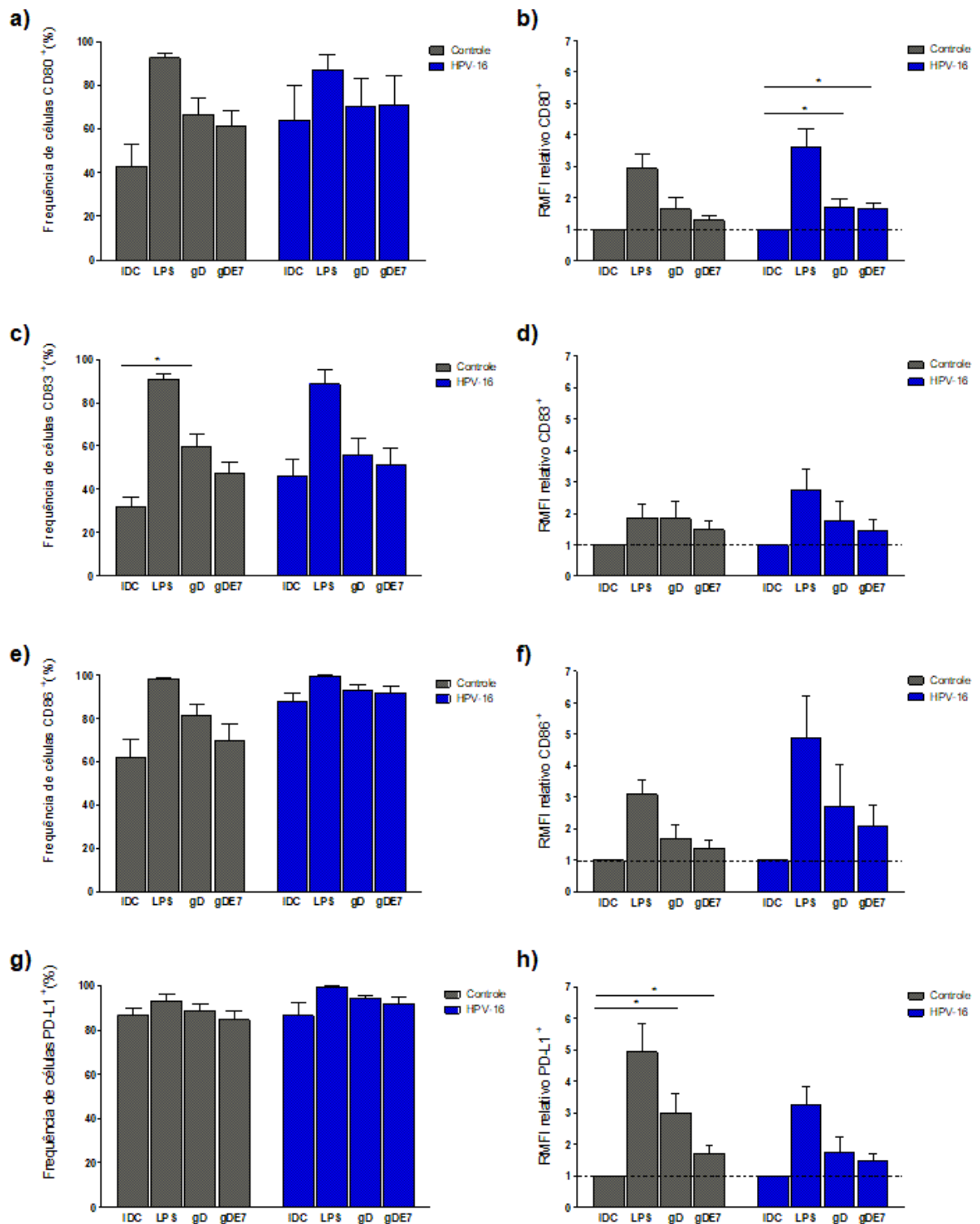
A expressão de CD86 esteve aumentada nas Mo-DCs das doadoras saudáveis ativadas com gD e gDE7. O mesmo foi observado nas Mo-DCs das pacientes HPV16+, inclusive nas células não ativadas. Em relação ao MFI desta molécula, gD e gDE7 estiveram aumentadas em relação a iDC nas Mo-DCs das pacientes e maiores também que as Mo-DCs do grupo controle.

Quando avaliamos a frequência de PD-L1, vimos que a expressão desta molécula não esteve aumentada em Mo-DCs ativadas com gD e gDE7 em relação a

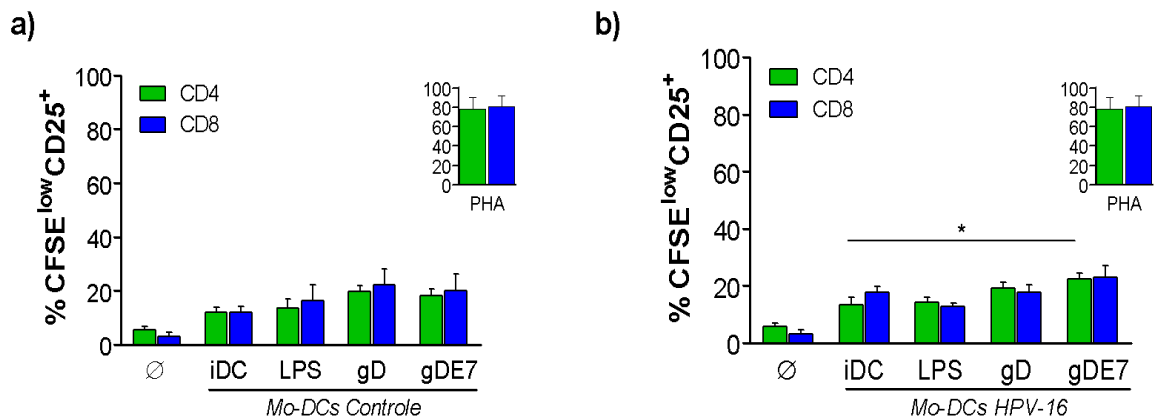
iDC em doadoras saudáveis. Vimos um aumento de fluorescência desse marcador nas Mo-DCs ativadas com gD e gDE7 em relação a iDC para o grupo controle, com diferença estatisticamente significativa. Em relação às Mo-DCs de pacientes HPV16+, vimos que a frequência de PD-L1 esteve aumentada em relação ao iDC. Para este mesmo parâmetro, as Mo-DCs ativadas com gD ou gDE7 tiveram um aumento discreto no MFI relativo ao iDC.

Ao avaliarmos a capacidade de estimulação de proliferação de linfócitos T por Mo-DCs de doadoras saudáveis e pacientes HPV16+ ativadas por 48 horas com gD e gDE7 (**Figura 25**), vimos que: embora haja proliferação de linfócitos T CD4 e CD8 em ambos os grupos comparados ao sem estímulo, não vimos diferença entre as Mo-DCs ativadas com gD e gDE7 em relação ao iDC nas doadoras saudáveis. Vale destacar que o estímulo com PHA levou mais de 80% dos linfócitos a proliferar tanto em doadoras saudáveis quanto em pacientes HPV16+. Assim como visto anteriormente, as Mo-DCs, independentemente do tratamento, foram muito menos eficazes, mal chegando a estimular 30% dos linfócitos T CD4+ ou CD8+ a se dividirem. Em pacientes HPV16+, no entanto, após 5 dias em cultura, é possível ver uma maior proliferação de linfócitos T CD4 estimulados por Mo-DCs ativadas com gDE7.





**Figura 24. Efeito das proteínas recombinantes gD e gDE7 na ativação de Mo-DCs de pacientes HPV16+ e doadores saudáveis.** Mo-DCs de pacientes HPV16+ e doadores saudáveis estimuladas com gD (2,25 µg/mL), gDE7 (3,0 µg/mL) por 48h. LPS 100 ng/mL por 24 horas ou sem estímulo (iDC). Os gráficos mostram a frequência (%) de células positivas e intensidade média de fluorescência (MFI) relativo para os marcadores CD80 (a, b), CD83 (c, d), CD86 (e, f) e PD-L1 (g, h). Os dados expressam a média ± erro padrão da média de sete (HPV16+) ou oito (Controle) experimentos independentes. \*p < 0,05 determinado por One-way ANOVA seguida de pós teste de Tukey.



**Figura 25. Linfo-estimulação alogênica por Mo-DCs ativadas com gDE7 aumenta a proliferação de linfócitos T CD4 em pacientes HPV16+.** Mo-DCs de oito doadores saudáveis (a) e sete paciente HPV16+ (b) estimuladas durante 48 horas com gD (2,25 µg/mL), gDE7 (3,0 µg/mL), LPS (100 ng/mL) ou sem estímulo (iDC) e colocadas em co-cultura por 5 dias com linfócitos T previamente marcados com CFSE. Como controle negativo foram utilizados linfócitos T marcados com CFSE sem estímulo ( $\emptyset$ ). As células foram avaliadas dentro da população de células CD3+CD4+ ou CD3+CD8+ e foram consideradas proliferativas aquelas CD25+CFSE<sup>low</sup>. Os dados expressam a média  $\pm$  erro padrão da média proveniente de sete (pacientes HPV16) e oito (doadores saudáveis - controle). \*p < 0,05 determinado por One-way ANOVA seguida de pós teste de Tukey.

## 5. DISCUSSÃO

Neste trabalho, nossa proposta foi investigar o efeito da proteína recombinante derivada da fusão de gD do HSV-1 com E7 do HPV16, e da proteína recombinante, E6 do HPV16 sobre células dendríticas derivadas de monócitos geradas *in vitro* a partir de células de doadores saudáveis ou de pacientes diagnosticadas com NIC grau 2/3. Por falta de disponibilidade da proteína E6, apenas experimentos iniciais puderam ser realizados com ela, de modo que discutimos os resultados baseados nos experimentos realizados com gDE7, onde tivemos êxito em encontrar uma dose que ativasse Mo-DCs.

As DCs são as principais APCs e têm as habilidades de capturar, processar e apresentar antígenos aos linfócitos T. Elas são identificadas pela expressão de MHC de classe II e moléculas coestimuladoras (THÉRY, AMIGORENA, 2001). Antes de receber estímulos de ativação, as DCs estão em um “estado imaturo”; DCs imaturas são pobres indutoras de respostas efetoras de linfócitos *naïve*, uma vez que têm baixa expressão de moléculas coestimuladoras na superfície, baixa expressão de receptores de quimiocinas e não secretam citocinas imunoestimulantes (STEINMAN, SWANSON, 1995; TROMBETTA, MELLMAN, 2005). As DCs representam menos de 1% das PBMCs, sendo então raras, mas potentes e que podem estimular ambas as respostas primárias e secundárias de linfócitos T. Quando ativada adequadamente, elas reduzem sua habilidade em fagocitar antígenos, aumentam a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-12, aumentam a resistência aos efeitos de IL-10, aumentam a expressão de moléculas coestimuladoras e expressão de receptores de quimiocinas que as direciona até os órgãos linfoides secundários para apresentação de antígenos aos linfócitos T. *In vitro*, a combinação de GM-CSF e IL-4 pode gerar Mo-DCs em seu estado imaturo, que são eficientes em capturar antígenos mas não têm capacidade de estimular linfócitos T e são sensíveis a efeitos imunossupressores de citocinas que podem ser produzidas pelos tumores (BANCHREAU, STEINMAN, 1998; DHODAPKAR *et al.*, 1999; SALLUSTO, LANZAVECCHIA, 1994; SCHULER, STEINMAN, 1997).

Nossos resultados demonstraram que Mo-DCs de doadores saudáveis respondem ao estímulo da proteína recombinante gDE7 (3 µg/mL) por 48 horas, aumentando CD86 e CD83 quando comparadas às iDCs.

CD83 é reconhecida como marcador de maturação em DCs, sendo um importante modulador na ativação da resposta imune, com sua presença correlacionada com aumento de estimulação de linfócitos T (AERTS-TOEGAERT *et al.*, 2007), agindo na sinalização de cálcio intracelular (PINHO *et al.*, 2014), e a região transmembrana reduzindo a degradação de moléculas CD86 e MHC classe II em DCs (TZE *et al.*, 2011). Já CD86 interage com o receptor de superfície celular CD28, presente nos linfócitos T, que se liga às moléculas coestimuladoras CD80 e CD86 em DCs ativadas (SHARPE, FREEMAN, 2002; RUDD, SCHNEIDER, 2003).

Interessantemente, também, foi observado, nesse mesmo tempo, a gDE7 consegue controlar a expressão de PD-L1 em Mo-DCs e a secreção de IL-10.

A ligação PD-1/PD-L1 é determinante em respostas imunes, levando, dentre outras coisas, a um estado de tolerância. Após reconhecimento do antígeno, os linfócitos T rapidamente expressam PD-1 (Agata *et al.*, 1996), e foi demonstrado que a expressão de PD-1 em linfócitos T ativados está envolvida na modulação da resposta inicial de linfócitos T (HONDA *et al.*, 2014). Assim como o papel de PD-1 em suprimir a atividade de linfócitos T, a inibição da ligação de PD-1/PD-L1 aumenta a resposta contra patógenos (SUN, MEZZADRA, SCHUMACHER, 2018). PD-1 (CD279) (*Programmed cell death protein 1*) é um dos receptores co-inibitórios presentes em linfócitos T estimulados (ISHIDA *et al.*, 1992) que interage com dois ligantes: PD-L1 (CD274) e PD-L2 (CD273). A expressão de PD-L2 é observada em macrófagos, DCs e mastócitos. A expressão de PD-L1 pode ser detectada em células hematopoiéticas incluindo linfócitos T, linfócitos B, macrófagos, DCs e mastócitos e células não hematopoiéticas como células endoteliais vasculares, astrócitos, células das ilhotas pancreáticas, queratinócitos e células endoteliais (SUN, MEZZADRA, SCHUMACHER, 2018). A expressão de PD-1 também pode ser induzida por outros fatores, como IL-10 e TGF- $\beta$  (SUN *et al.*, 2015; PARK *et al.*, 2016).

Além disso, DCs ativadas caracteristicamente secretam citocinas pró-inflamatórias.

Mo-DCs ativadas com gDE7 durante 48 horas também aumentaram a secreção de IL-12p70 e TNF- $\alpha$ , comparadas às iDCs, e às tratadas com E7 e gD. A IL-12p70 (IL-12) é um heterodímero composto pelas unidades p40 e p35 produzida principalmente por macrófagos e DCs. A produção de IL-12 aumenta a apresentação de antígenos por estas células e sua secreção é importante para indução de células

NK, estímulo de IFN- $\gamma$  e consequente diferenciação de linfócitos Th1. A IL-12 se liga ao receptor IL-12R que consiste em duas subunidades: IL-12R $\beta$ 1 e IL-12R $\beta$ 2, expressas em linfócitos Th1 e células NK. Ainda, IL-12 aumenta a capacidade citotóxica de linfócitos T CD8 e células NK induzindo a transcrição de genes que codificam a perforina e granzima e aumentando a expressão de moléculas de adesão (CESANO, 1993; MA *et al.*; 1997).

Diversos estudos descrevem que os efeitos de IL-12 em linfócitos T e células NK estão relacionados a habilidade em promover a produção de INF- $\gamma$  durante a infecção e inflamação (TRINCHIERI, PFLANZ, KASTELEIN, 2003). Com isso, foi estabelecido que, durante o reconhecimento de patógenos pelas DCs há um aumento na produção de IL-12 que culminam na resposta de linfócitos Th1 (HSIEH *et al.*, 1993), sendo as cDC1 uma importante fonte de IL-12 *in vivo*, expressando constitutivamente altos níveis de IL12B e, com isso, comumente associado a respostas Th1 (HILLIGAN, RONCHESE, 2020).

Sinais coestimuladores iniciados pela interação de TNF e seus receptores (superfamília de TNFR) promovem expansão clonal, diferenciação e sobrevivência de linfócitos T CD4 e CD8 e desempenham papel crucial na resposta mediada por linfócitos T, isso inclui inflamação, autoimunidade e imunoterapia contra tumores (SO, ISHII, 2019). As interações de TNF com seus receptores como 4-1BB, CD27, CD30, DR3 (*death receptor 3*), GITR (*glucocorticoid-induced TNFR family-related protein*), HVEM (*herpesvirus entry mediator*), OX40, e TNFR2 (*tumor necrosis factor receptor 2*), expressos em linfócitos T, desencadeiam sinais de ativação dependentes do reconhecimento de antígenos que levam a diferenciação desses linfócitos (CROFT, 2009; SO, CROFT, 2013; WATTS, 2005). O resultado da interação de TNF e seus ligantes como sinais coestimuladores culminam na ativação de proteínas que promovem sinalização de vias como fosfoinosítídeo 3-quinase (PI3K)-Akt (proteína quinase B), NF- $\kappa$ B e MAPK, iniciadas pelo TCR e CD28, e desempenham papéis importantes para de linfócitos T, tanto nos estágios iniciais quanto nos estágios posteriores da resposta (SO, CROFT, 2013)

Em relação à expressão gênica, os ensaios aqui apresentados indicam que Mo-DCs ativadas com gDE7 por 48 horas também mostraram uma regulação positiva de ICAM-1, importante na ligação ao receptor de adesão celular LFA-1 e induz funções de linfócitos T como motilidade e adesão, e VCAM-1, molécula de adesão encontrada

no endotélio, essencial na migração celular (CAMPBELL *et al.*, 1996). Em relação às citocinas, encontramos aumento de IL-12A e IL-12B, duas subunidades da IL-12, especificamente IL-12p70, essencial para direcionar uma resposta T CD4 (HILKENS *et al.*, 1997; VAN KOOYK, FIGDOR, 2000). Curiosamente, este resultado corrobora o que foi obtido no sobrenadante das Mo-DCs.

gD e gDE7 aumentaram a expressão gênica das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 em comparação ao grupo iDC. Essas citocinas desempenham efeitos pró-inflamatórios e direcionamento de linfócitos T. IFN- $\gamma$  promove a expressão de ligantes CXCR3, como CCL9 e CCL10 que favorecem a diferenciação Th1 (GROOM *et al.*, 2012). Já a IL-6 pode regular o desenvolvimento linfócitos T, indicando, geralmente, proliferação e diferenciação de Th2 e Th17 e inibindo Treg (GAUTREAU *et al.*, 2011; HARBOUR *et al.*, 2020). Tanto a gD quanto a gDE7 aumentaram expressivamente as quimiocinas CXCL1, CXCL2, CXCL8 e CXCL13 em Mo-DCs.

Em contraste, a expressão de IL-10, uma importante citocina imunorreguladora, esteve reduzida nas Mo-DCs ativadas com gDE7, comparando a iDC. Esse dado é interessante pois confirmam os vistos anteriormente pela baixa secreção desta citocina no ensaio por CBA. A IL-10 secretada por DCs desempenha papel importante na regulação da resposta imune e manutenção da tolerância imunológica (RUTZ, OUYANG, 2016) pela expansão de linfócitos Treg, o que pode levar à implicações importantes no desenvolvimento de novas terapias. A IL-10 regula negativamente a expressão de HLA-DR e CD86 nas DCs do sangue periférico em humanos e inibe o transporte de moléculas de MHC de classe II carregadas com peptídeos para a superfície celular em monócitos (BUELENS *et al.*, 1995; KOPPELMAN *et al.*, 1997).

Ainda, com base em Mo-DCs de doadores saudáveis, sugerimos vias de sinalização que podem estar enriquecidas com a expressão de genes relacionados à diferenciação, maturação e apresentação de antígenos por DCs. Nossos resultados mostraram que gD (2,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e gDE7 (3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) são capazes de aumentar fatores de transcrição para secreção de citocinas em resposta a estímulos inflamatórios, como a ativação de genes envolvidos na via do NF $\kappa$ B e como IRF-7, IRF-8, NF $\kappa$ B1, RELB e STAT3. A análise por *RT<sup>2</sup>PCR-array* também mostrou modulação de genes envolvidos na sinalização via TLR por gDE7.

A ativação de TLR aumenta transitoriamente a captação de antígenos solúveis, complexos imunes ou quaisquer formas de moléculas fagocitáveis e como resposta imediata a ativação de MAPK (BLANDER, MEDZHITOV, 2004; WEST et al., 2004). As vias de sinalização TLR podem ser separadas em dois grupos: uma via dependente de MyD88 que leva à produção de citocinas pró-inflamatórias com ativação NF- $\kappa$ B e MAPK, e uma via independente de MyD88 associada à indução via IFN. A sinalização via TLRs induz síntese de citocinas inflamatórias e quimiocinas, que ativam DCs e preparam uma resposta efetiva de linfócitos Th (WATTS, WEST, ZARU, 2010).

O sistema imunológico desempenha um papel fundamental na proteção contra o crescimento de tumores. As respostas baseadas em linfócitos T são essenciais para garantir a resposta imunológica específica contra antígenos não próprios. Para isso, é necessária a ativação e a regulação de moléculas co-inibitórias e coestimuladoras. Nesse contexto, as DCs encarregam-se em direcionar a resposta de linfócitos T frente a diferentes estímulos através da sua capacidade de apresentar antígenos. A expressão de sinais supressores no microambiente tumoral, como PD-L1, induz mecanismos de *feedback* regulatório e justifica a atividade limitada da imunidade antitumoral. Curiosamente, gDE7 quando usado como estimulante em contato Mo-DCs em nosso estudo aumentou a expressão de moléculas coestimuladoras e controlou a expressão de PD-L1, apresentando-se como uma ferramenta potencial para uso terapêutico.

A imunoterapia continua a representar um caminho promissor para novas terapias contra o câncer, especialmente porque muitos pacientes que respondem exibem respostas duradouras, com isso, diversos protocolos têm explorado a função das DCs. As vacinas com DCs estão associadas a toxicidades limitadas e, portanto, são consideradas uma abordagem terapêutica relativamente segura e estão sendo extensivamente avaliadas na clínica (BOL et al., 2016; WCULEK et al., 2019). Múltiplas formulações de vacinas podem levar ao aumento das respostas de células T específicas do antígeno. No entanto, monócitos de pacientes com câncer dão origem a Mo-DCs com características funcionais alteradas, o que poderia favorecer a indução de uma resposta tolerogênica, induzindo linfócitos Treg (CLAVIJO-SALOMON et al., 2015; RAMOS et al., 2012;). Dessa forma, o uso de células alogênicas de doadores saudáveis pode ser uma alternativa e vem se mostrando promissor (BARBUTO et al., 2004; PINHO et al., 2022).

A imunoterapia pode ser um componente importante de programas abrangentes de tratamento do câncer, complementando cirurgia, radioterapia e quimioterapia (WONG *et al.*, 2015). Isso requer esforços significativos voltados para o desenvolvimento e introdução de vacinas terapêuticas, inclusive, contra as lesões causadas pelo HPV (YANG, FARMER, HUNG, 2016; VONSKY *et al.*, 2019).

Desde a descoberta do primeiro tipo oncogênico de HPV, o HPV16 (DÜRST *et al.*, 1983), dados indicavam que as proteínas virais E6 e E7 são os fatores que determinam o fenótipo maligno das células cancerígenas positivas para o HPV. Especificamente, E6 e E7 são os únicos genes virais que são sempre retidos e expressos em células cancerígenas positivas para HPV e a inibição da expressão de E6 e E7 resulta na indução rápida de senescência celular (HOPPE-SEYLER *et al.*, 2018). Por isso, E6 e E7 tornaram-se alvos de diferentes estratégias terapêuticas em pacientes HPV+.

As oncoproteínas E6 e E7 do HPV16 são expressas constitutivamente em lesões precursoras de tumores cervicais e possuem papel na malignização das células tumorais. E6 e E7 determinam o ambiente ideal para sustentar sinais de proliferação. No processo de replicação do genoma viral, elas são responsáveis pela proliferação celular descontrolada e desregulação de atividades supressoras de crescimento (PAL, KUNDU, 2020). E6 tem como alvo p53, a mais bem caracterizada proteína supressora de crescimento, enquanto E7 inibe a proteína Rb. O estímulo de crescimento dado pela desintegração da proteína Rb mediado por E7, pode ser estabilizada pela p53, que também é estimulada por E6, levando, assim, à divisão celular descontrolada e evasão de mecanismos antitumorais. A expressão constitutiva do gene E7 é uma característica da infecção persistente causada por alguns tipos de HPV e associada ao câncer. Essa proteína é crucial para a transformação celular e manutenção da proliferação celular anormal, que leva ao desenvolvimento do câncer. Assim por serem específicas de células infectadas ou tumorais, E6 e E7, presentes em diversos estágios da infecção, são consideradas antígenos ideais para vacinas terapêuticas contra tumores cervicais (HANCOCK, HELLNER, DORRELL, 2018; HUNG *et al.*, 2007; TINDLE, 2002).

Ao contrário, as vacinas preventivas contra infecções por HPV são desenvolvidas contra as proteínas do capsídeo L1 e L2 que são deletadas durante a integração do genoma do HPV ao genoma celular. A vacinação profilática contra o



HPV previne até 90% das infecções e serve como uma ferramenta de proteção contra neoplasias associadas a infecções por HPV (ARBYN, SIMOENS, MARTIN-HIRSCH, 2018). O programa de vacinação contra o HPV foi introduzido pela OMS e é obrigatório em diversos países desde 2009 (CUTTS *et al.*, 2007). Porém, as vacinas profiláticas não têm efeitos terapêuticos e nem previnem o desenvolvimento de neoplasias naqueles já infectados antes da vacinação.

Vacinas terapêuticas podem ser classificadas de acordo com a sua fonte de desenvolvimento: vetores virais ou bacterianos, peptídeos ou proteínas, ácido nucleico e até mesmo células. Atualmente, existem vários estudos para tratar neoplasias cervicais em diferentes estágios, algumas delas são específicas para lesões intraepiteliais, outras testadas em ensaios clínicos com resultados promissores (VICI *et al.*, 2016; VONSKY *et al.*, 2019) e elas devem ser consideradas como uma opção terapêutica na doença cervical. Por exemplo, de Vos van Steenwijk e colaboradores (2014) avaliaram a capacidade de vacina de peptídeo longo sintético para induzir uma resposta de células T específica de HPV16, bem como para estabelecer memória imunológica de longo prazo em pacientes lesões de baixo grau do colo do útero. Além disso, foi avaliado o efeito da vacinação de reforço após 1 ano. As respostas de linfócitos T específicas do HPV16 foram detectadas após a vacinação e mantidas por pelo menos 2 anos. Curiosamente, a vacinação de reforço após 1 ano aumentou especialmente a resposta Th2 específica do HPV16, mas sugerem que a vacinação de reforço pode ter um adjuvante polarizador para Th1 (DE VOS VAN STEENWIJK *et al.*, 2014). Em outro estudo, um adenovírus recombinante expressando proteína de E6 e E7 do HPV16 pulsadas em DCs para investigar a capacidade em induzir imunidade antitumoral *in vitro* e *in vivo* (ZHOU *et al.*, 2015). Os resultados indicaram que a co-cultura da vacina DC-ofE6E7 com esplenócitos pode induzir fortemente uma resposta de linfócitos T citotóxicos específicos do tumor (CTL) e eliminar as células tumorais *in vitro*. Além disso, a imunoterapia induziu imunidade protetora contra o desafio de células cancerígenas TC-1 *in vivo*. Já com DCs, Mo-DCs autólogas carregadas com proteína recombinante E7 do HPV16 ou HPV18 foram usadas para induzir *in vitro* uma resposta específica de linfócitos T (NONN *et al.*, 2003). Foram encontradas respostas específicas para E7 em linfócitos T CD4+ de doadores saudáveis e linfócitos T CD8+ produtores de IFN- $\gamma$ . Mostraram também que DCs carregadas com o antígeno E7 estimularam respostas específicas em

populações de linfócitos infiltrantes tumorais (TIL) recém-isoladas de pacientes com câncer cervical. Interessantemente, Rahma e colaboradores (2014) demonstraram que pacientes com câncer cervical (HPV16 ou HPV18) tratadas com PBMCs pulsadas com peptídeos de E6 ou E7 induziram uma resposta imune específica contra o peptídeo relevante, apesar da doença avançada (RAHMA *et al.*, 2014). Já com modelo de vacina de DNA contra HPV, foi verificado que BMDCs (do inglês, *Bone Marrow Derived DCs*) transfectadas por 48 horas induziram aumento de CD80, CD40 e IL-12p70; estimulam aumento de secreção de IFN- $\gamma$  por linfócitos T em co-cultura (WANG *et al.*, 2011). A condição imunossupressora do microambiente tumoral limita a eficácia de vacinas terapêuticas, incluindo essas contra tumores associados ao HPV16. Os tumores cervicais podem produzir quantidades significativas de TGF- $\beta$  (SHEU *et al.*, 2001) que a diferenciação de linfócitos T regulatórios (RAO; PETRONE; PONATH, 2005).

Vacinas terapêuticas usando apenas oncoproteína E7 não são eficazes na indução da resposta de linfócitos T CD8+ específica para E7 e não conferem proteção antitumoral aos camundongos desafiados com as células TC-1 (PORCHIA *et al.*, 2011). A oncoproteína E7 possui curta meia-vida intracelular sendo rapidamente degradada via proteassomos (ROMAN, MUNGER, 2013; SMOTKIN; WETTSTEIN, 1987; VALDOVINO-TORRES *et al.*, 2008;), o que sugere que pode haver pouca apresentação do antígeno E7 para linfócitos T. Por sinal, nossos resultados também mostraram que a proteína recombinante E7 sozinha não aumentou expressão de moléculas coestimuladoras avaliadas nem a secreção de citocinas pró-inflamatórias.

Diante disso, diversos grupos de pesquisas têm desenvolvido estratégias para aumentar a imunogenicidade de E7 através da sua apresentação via MHC de classe I e II. Uma dessas estratégias é fusionar antígenos do HPV a outras proteínas cuja resposta já é conhecida e usá-las como adjuvantes.

Porchia *et al.* (2011, 2017, 2022) demonstraram que vacinas baseadas na fusão da oncoproteína E7 à glicoproteína gD do HSV-1, em modelo pré-clínico, aumentavam a imunogenicidade e eram capazes de potencializar respostas antitumorais, favorecendo a regressão tumoral. Em camundongos, a gDE7 promoveu ativação de DCs e linfócitos T CD8 citotóxicos específicos (PORCHIA *et al.*, 2011). Quando administrada com poly I:C, gDE7 induziu células T CD8+ específicas para E7 com atividade citotóxica e fenótipo de memória efetora (CD44+CD62L<sup>low</sup>). Além disso,

a gDE7 + poly (I:C) controlou a expansão de linfócitos T reguladores induzidos por tumor e MDSCs. Ainda, gDE7 ativou DCs de camundongos CD11c+CD8 $\alpha$ + e BDCA3+ humanas, especializadas na apresentação cruzada de antígenos (PORCHIA *et al.*, 2017). gDE7 também foi avaliada associada à cisplatina, um imunoterápico comumente usado como tratamento para pacientes com câncer cervical, em modelo murino (PORCHIA *et al.*, 2022). O tratamento combinado resultou em efeitos sinérgicos, incluindo ativação de linfócitos T CD8+ específicos para E7, infiltração tumoral de macrófagos e DCs e prevenção de recidivas tumorais em diferentes locais anatômicos. Além disso, o protocolo permitiu a redução da dosagem de cisplatina e seus efeitos tóxicos intrínsecos, sem reduzir os resultados antitumorais (PORCHIA *et al.*, 2022).

A utilização da gD nesta fusão gênica permite a competição pela ligação ao receptor HVEM e consequente inibição da ligação do BTLA, bloqueando os sinais inibitórios promovidos por esta ligação e favorecendo a ativação de linfócitos T. HVEM, um dos receptores de TNFRSF, via ligação com LIGHT desempenha papel importante na resposta de linfócitos T contra tumores. Camundongos inoculados com células tumorais expressando agonista de HVEM na sua superfície, geram imunidade antitumoral dependente de linfócitos T CD4, indicando que a sinalização de HVEM ajuda na resposta de células T induzindo regressão do tumor (PARK *et al.*, 2012).

Diante disso, utilizamos a gDE7, visto que a proteína gD é conhecida pela sua interação com receptores HVEM em células do sistema imune, incluindo DCs, como descrito anteriormente. A proteína gD pode modular a via de sinalização mediada pelo receptor HVEM e, assim, beneficiar vias estimuladoras do sistema imune; uma dessas vias conhecidas é a do fator de transcrição NF- $\kappa$ B (CHEUNG *et al.*, 2009).

Como vimos, em doadores saudáveis, a proteína recombinante gDE7 aumentou as moléculas coestimuladoras CD86 e CD83 em sua superfície, aumentou citocinas importantes na indução de respostas de linfócitos T, como IL-12, confirmadas pela expressão desses genes quando comparadas às iDCs. A expressão de genes também mostrou que as vias de TLR e NF $\kappa$ B estariam envolvidas nessa ativação.

Nosso trabalho mostrou também que em pacientes HPV16+ resultados semelhantes foram encontrados quanto ao fenótipo de Mo-DCs ativadas com gDE7 (3  $\mu$ g/mL) por 48 horas, onde houve aumento de expressão de CD80 nestas células.

Ademais, houve aumento de proliferação de linfócitos T CD4 alogeneicos estimulados com essas Mo-DCs.

Subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> requerem sinais coestimuladores e co-inibitórios para sua diferenciação, ativação e direcionamento das funções (GRATZ *et al.*, 2013; SUN, ZHANG, 2014). A expressão de moléculas com estimuladoras em DCs, juntamente com citocinas, polariza os subconjuntos Th afetando sua diferenciação e função. O *status* de ativação de células T por meio de sinais coestimuladores, vindos, por exemplo, da ligação de CD28 com CD80 ou CD86, induz ainda mais receptores de sinais adicionais nesses linfócitos T. Além disso, seu *status* de ativação é ajustado durante o processo de diferenciação. As citocinas secretadas pelos subconjuntos de células Th polarizadas induzem vários tipos de respostas imunes.

A combinação sinérgica de vacinas terapêuticas com radioterapia, quimioterapia, imunomoduladores ou inibidores de *checkpoint* imunológico abre um novo e interessante cenário para o tratamento de doenças causadas por HPV. Os resultados com gDE7 são promissores e trazem novas perspectivas para tratamentos alternativos de tumores associados ao HPV. Em conjunto, nossos resultados sugerem uma nova proposta de ativação de Mo-DCs que podem levar, futuramente, à uma abordagem terapêutica, baseada em DCs para tratar lesões no colo do útero associadas à infecção por HPV16+.

## 6. CONCLUSÃO

Neste trabalho, nosso objetivo original foi avaliar o efeito das proteínas recombinantes derivadas da fusão genética de gD do HSV-1 com a oncoproteína E7 e os efeitos da proteína recombinante E6, do HPV16, sobre fenótipo e função linfoestimuladora de células dendríticas derivadas de monócitos gerados *in vitro* a partir de células de doadores saudáveis ou de pacientes diagnosticadas com NIC 2/3. Por falta de disponibilidade da proteína E6, apenas experimentos iniciais puderam ser realizados com ela, de modo que as conclusões se baseiam nos experimentos realizados com gDE7.

Nossos resultados indicam que o tratamento de Mo-DCs de doadores saudáveis com gDE7 (3 µg/mL) por 48 horas:

- aumenta a expressão de moléculas coestimuladoras CD86 e CD83 e secreção das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-12p70 comparadas às células imaturas (iDCs).
- não aumenta a expressão de PD-L1 e a secreção de IL-10 em relação ao grupo iDC.
- induz a expressão de genes associados à apresentação de antígenos quando comparadas às expressões dos mesmos genes por iDCs.

Em Mo-DCs de pacientes HPV16+, a expressão de CD80 esteve aumentada após 48 horas de tratamento com gDE7 (3 µg/mL), e, também não se detectou aumento de PD-L1. Vimos também que estas Mo-DCs estimulam a proliferação de linfócitos T CD4 alogênêicos.

Este comportamento fenotípico foi coerente com a análise de expressão gênica realizada em Mo-DCs de doadores saudáveis ativados com gDE7, que mostrou o aumento da expressão de genes relacionados à diferenciação, maturação e apresentação de antígenos por células dendríticas (destacando-se as vias dos TLR e do NF $\kappa$ B).

Assim, os resultados em seu conjunto apontam para um potencial da proteína de fusão gDE7 de estimular Mo-DCs com cinéticas de expressão diversas entre as moléculas coestimuladoras e a molécula reguladora PD-L1. Enquanto as primeiras parecem ter sua expressão rapidamente aumentada, o aumento de PD-L1 parece ser mais lento. Se este fenômeno se confirmar, ele poderia ser uma explicação para a eficácia de gDE7 como agente imunoestimulador.

## REFERÊNCIAS

Aerts-Toegaert C, Heirman C, Tuyaerts S, Corthals J, Aerts JL, Bonehill A, Thielemans K, Breckpot K. CD83 expression on dendritic cells and T cells: correlation with effective immune responses. *Eur J Immunol*. 2007 Mar;37(3):686-95. doi: 10.1002/eji.200636535. PMID: 17301951.

Agata Y, Kawasaki A, Nishimura H, Ishida Y, Tsubata T, Yagita H, Honjo T. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol*. 1996 May;8(5):765-72. doi: 10.1093/intimm/8.5.765. PMID: 8671665.

Alloatti A, Rookhuizen DC, Joannas L, Carpiere JM, Iborra S, Magalhaes JG, Yatim N, Kozik P, Sancho D, Albert ML, Amigorena S. Critical role for Sec22b-dependent antigen cross-presentation in antitumor immunity. *J Exp Med*. 2017 Aug 7;214(8):2231-2241. doi: 10.1084/jem.20170229. Epub 2017 Jun 29. Erratum in: *J Exp Med*. 2018 Feb 15;: PMID: 28663435; PMCID: PMC5551575.

Anderson DA 3rd, Dutertre CA, Ginhoux F, Murphy KM. Genetic models of human and mouse dendritic cell development and function. *Nat Rev Immunol*. 2021 Feb;21(2):101-115. doi: 10.1038/s41577-020-00413-x. Epub 2020 Sep 9. PMID: 32908299.

Arbyn M, Xu L, Simoens C, Martin-Hirsch PP. Prophylactic vaccination against human papillomaviruses to prevent cervical cancer and its precursors. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018 May 9;5(5):CD009069. doi: 10.1002/14651858.CD009069.pub3. PMID: 29740819; PMCID: PMC6494566.

Bachem A, Güttler S, Hartung E, Ebstein F, Schaefer M, Tannert A, Salama A, Movassaghi K, Opitz C, Mages HW, Henn V, Kloetzel PM, Gurka S, Kroczeck RA. Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c+CD141+ cells as homologues of mouse CD8+ dendritic cells. *J Exp Med*. 2010 Jun 7;207(6):1273-81. doi: 10.1084/jem.20100348. Epub 2010 May 17. PMID: 20479115; PMCID: PMC2882837.

Bachem A, Güttler S, Hartung E, Ebstein F, Schaefer M, Tannert A, Salama A, Movassaghi K, Opitz C, Mages HW, Henn V, Kloetzel PM, Gurka S, Kroczeck RA. Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c+CD141+ cells as homologues of mouse CD8+ dendritic cells. *J Exp Med*. 2010 Jun 7;207(6):1273-81. doi: 10.1084/jem.20100348. Epub 2010 May 17. PMID: 20479115; PMCID: PMC2882837.

Bagarazzi ML, Yan J, Morrow MP, Shen X, Parker RL, Lee JC, Giffear M, Pankhong P, Khan AS, Broderick KE, Knott C, Lin F, Boyer JD, Draghia-Akli R, White CJ, Kim JJ, Weiner DB, Sardesai NY. Immunotherapy against HPV16/18 generates potent TH1 and cytotoxic cellular immune responses. *Sci Transl Med.* 2012 Oct 10;4(155):155ra138. doi: 10.1126/scitranslmed.3004414. PMID: 23052295; PMCID: PMC4317299.

Baleeiro RB, Anselmo LB, Soares FA, Pinto CA, Ramos O, Gross JL, Haddad F, Younes RN, Tomiyoshi MY, Bergami-Santos PC, Barbuto JA. High frequency of immature dendritic cells and altered in situ production of interleukin-4 and tumor necrosis factor-alpha in lung cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2008 Sep;57(9):1335-45. doi: 10.1007/s00262-008-0468-7. Epub 2008 Feb 20. PMID: 18286287.

Baleeiro RB, Bergami-Santos PC, Tomiyoshi MY, Gross JL, Haddad F, Pinto CA, Soares FA, Younes RN, Barbuto JA. Expression of a dendritic cell maturation marker CD83 on tumor cells from lung cancer patients and several human tumor cell lines: is there a biological meaning behind it? *Cancer Immunol Immunother.* 2008 Feb;57(2):265-70. doi: 10.1007/s00262-007-0344-x. Epub 2007 Jul 13. PMID: 17628801.

Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:767-811. doi: 10.1146/annurev.immunol.18.1.767. PMID: 10837075.

Banchereau J, Palucka AK. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Rev Immunol.* 2005 Apr;5(4):296-306. doi: 10.1038/nri1592. PMID: 15803149.

Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998 Mar 19;392(6673):245-52. doi: 10.1038/32588. PMID: 9521319.

Banchereau J, Thompson-Snipes L, Zurawski S, Blanck JP, Cao Y, Clayton S, Gorvel JP, Zurawski G, Klechevsky E. The differential production of cytokines by human Langerhans cells and dermal CD14(+) DCs controls CTL priming. *Blood.* 2012 Jun 14;119(24):5742-9. doi: 10.1182/blood-2011-08-371245. Epub 2012 Apr 25. PMID: 22535664; PMCID: PMC3382933.

Bandola-Simon J, Roche PA. Dysfunction of antigen processing and presentation by dendritic cells in cancer. *Mol Immunol.* 2019 Sep;113:31-37. doi: 10.1016/j.molimm.2018.03.025. Epub 2018 Apr 5. PMID: 29628265; PMCID: PMC6173666.

Bao M, Liu YJ. Regulation of TLR7/9 signaling in plasmacytoid dendritic cells. *Protein Cell.* 2013 Jan;4(1):40-52. doi: 10.1007/s13238-012-2104-8. Epub 2012 Nov 7. PMID: 23132256; PMCID: PMC3667388.

Barbuto JA, Ensina LF, Neves AR, Bergami-Santos P, Leite KR, Marques R, Costa F, Martins SC, Camara-Lopes LH, Buzaid AC. Dendritic cell-tumor cell hybrid vaccination for metastatic cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2004 Dec;53(12):1111-8. doi: 10.1007/s00262-004-0551-7. PMID: 15185011.

Barbuto JA. Are dysfunctional monocyte-derived dendritic cells in cancer an explanation for cancer vaccine failures? *Immunotherapy*. 2013 Feb;5(2):105-7. doi: 10.2217/imt.12.153. PMID: 23413899.

Basha G, Lizée G, Reinicke AT, Seipp RP, Omilusik KD, Jefferies WA. MHC class I endosomal and lysosomal trafficking coincides with exogenous antigen loading in dendritic cells. *PLoS One*. 2008 Sep 19;3(9):e3247. doi: 10.1371/journal.pone.0003247. PMID: 18802471; PMCID: PMC2532750.

Binder M, O'Byrne MM, Maurer MJ, Ansell S, Feldman AL, Cerhan J, Novak A, Porrata LF, Markovic S, Link BK, Witzig TE. Associations between elevated pre-treatment serum cytokines and peripheral blood cellular markers of immunosuppression in patients with lymphoma. *Am J Hematol*. 2017 Aug;92(8):752-758. doi: 10.1002/ajh.24758. Epub 2017 Jun 1. PMID: 28383112.

Binnewies M, Mujal AM, Pollack JL, Combes AJ, Hardison EA, Barry KC, Tsui J, Ruhland MK, Kersten K, Abushawish MA, Spasic M, Giurintano JP, Chan V, Daud AI, Ha P, Ye CJ, Roberts EW, Krummel MF. Unleashing Type-2 Dendritic Cells to Drive Protective Antitumor CD4<sup>+</sup> T Cell Immunity. *Cell*. 2019 Apr 18;177(3):556-571.e16. doi: 10.1016/j.cell.2019.02.005. Epub 2019 Apr 4. PMID: 30955881; PMCID: PMC6954108.

Blander JM, Medzhitov R. Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors. *Science*. 2004 May 14;304(5673):1014-8. doi: 10.1126/science.1096158. PMID: 15143282.

Bol KF, Schreiber G, Gerritsen WR, de Vries IJ, Figdor CG. Dendritic Cell-Based Immunotherapy: State of the Art and Beyond. *Clin Cancer Res*. 2016 Apr 15;22(8):1897-906. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1399. PMID: 27084743.

Bonilla FA, Oettgen HC. Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S33-40. doi: 10.1016/j.jaci.2009.09.017. Epub 2010 Jan 12. PMID: 20061006.

Borst J, Ahrends T, Bąbała N, Melief CJM, Kastenmüller W. CD4<sup>+</sup> T cell help in cancer immunology and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2018 Oct;18(10):635-647. doi: 10.1038/s41577-018-0044-0. PMID: 30057419.



Broz ML, Binnewies M, Boldajipour B, Nelson AE, Pollack JL, Erle DJ, Barczak A, Rosenblum MD, Daud A, Barber DL, Amigorena S, Van't Veer LJ, Sperling AI, Wolf DM, Krummel MF. Dissecting the tumor myeloid compartment reveals rare activating antigen-presenting cells critical for T cell immunity. *Cancer Cell*. 2014 Nov 10;26(5):638-52. doi: 10.1016/j.ccell.2014.09.007. Epub 2014 Oct 16. PMID: 25446897; PMCID: PMC4254577.

Buelens C, Willems F, Delvaux A, Piérard G, Delville JP, Velu T, Goldman M. Interleukin-10 differentially regulates B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) expression on human peripheral blood dendritic cells. *Eur J Immunol*. 1995 Sep;25(9):2668-72. doi: 10.1002/eji.1830250940. PMID: 7589143.

Campbell JJ, Qin S, Bacon KB, Mackay CR, Butcher EC. Biology of chemokine and classical chemoattractant receptors: differential requirements for adhesion-triggering versus chemotactic responses in lymphoid cells. *J Cell Biol*. 1996 Jul;134(1):255-66. doi: 10.1083/jcb.134.1.255. PMID: 8698820; PMCID: PMC2120921.

Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Dezutter-Dambuyant C, de Saint-Vis B, Jacquet C, Yoneda K, Imamura S, Schmitt D, Banchereau J. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. *J Exp Med*. 1996 Aug 1;184(2):695-706. doi: 10.1084/jem.184.2.695. PMID: 8760823; PMCID: PMC2192705.

Cesano A, Visonneau S, Clark SC, Santoli D. Cellular and molecular mechanisms of activation of MHC nonrestricted cytotoxic cells by IL-12. *J Immunol*. 1993 Sep 15;151(6):2943-57. PMID: 8104216.

Cheung TC, Steinberg MW, Osborne LM, Macauley MG, Fukuyama S, Sanjo H, D'Souza C, Norris PS, Pfeffer K, Murphy KM, Kronenberg M, Spear PG, Ware CF. Unconventional ligand activation of herpesvirus entry mediator signals cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Apr 14;106(15):6244-9. doi: 10.1073/pnas.0902115106. Epub 2009 Mar 30. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Sep 22;106(38):16535-6. PMID: 19332782; PMCID: PMC2669392.

Clavijo-Salomon MA, Ramos RN, Crippa A, Pizzo CR, Bergami-Santos PC, Barbuto JA. Monocyte-derived dendritic cells reflect the immune functional status of a chromophobe renal cell carcinoma patient: could it be a general phenomenon? *Cancer Immunol Immunother*. 2015 Feb;64(2):161-71. doi: 10.1007/s00262-014-1625-9. Epub 2014 Oct 15. PMID: 25314913.

Cohen PA, Jhingran A, Oaknin A, Denny L. Cervical cancer. *Lancet*. 2019 Jan 12;393(10167):169-182. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32470-X. PMID: 30638582.

Collin M, Bigley V. Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology*. 2018 May;154(1):3-20. doi: 10.1111/imm.12888. Epub 2018 Feb 27. PMID: 29313948; PMCID: PMC5904714.

Croft M. The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases. *Nat Rev Immunol*. 2009 Apr;9(4):271-85. doi: 10.1038/nri2526. PMID: 19319144; PMCID: PMC2737409.

Cruz FM, Colbert JD, Merino E, Kriegsman BA, Rock KL. The Biology and Underlying Mechanisms of Cross-Presentation of Exogenous Antigens on MHC-I Molecules. *Annu Rev Immunol*. 2017 Apr 26;35:149-176. doi: 10.1146/annurev-immunol-041015-055254. Epub 2017 Jan 11. PMID: 28125356; PMCID: PMC5508990.

Cueto FJ, Sancho D. The Flt3L/Flt3 Axis in Dendritic Cell Biology and Cancer Immunotherapy. *Cancers (Basel)*. 2021 Mar 26;13(7):1525. doi: 10.3390/cancers13071525. PMID: 33810248; PMCID: PMC8037622.

Cutts FT, Franceschi S, Goldie S, Castellsague X, de Sanjose S, Garnett G, Edmunds WJ, Claeys P, Goldenthal KL, Harper DM, Markowitz L. Human papillomavirus and HPV vaccines: a review. *Bull World Health Organ*. 2007 Sep;85(9):719-26. doi: 10.2471/blt.06.038414. PMID: 18026629; PMCID: PMC2636411.

de Azevedo-Santos APS, Rocha MCB, Guimarães SJA, Vale AAM, Laginha FM, Nascimento FRF, Nagai MA, Bergami-Santos PC, Barbuto JAM. Could Increased Expression of Hsp27, an "Anti-Inflammatory" Chaperone, Contribute to the Monocyte-Derived Dendritic Cell Bias towards Tolerance Induction in Breast Cancer Patients? *Mediators Inflamm*. 2019 Nov 18;2019:8346930. doi: 10.1155/2019/8346930. PMID: 31827382; PMCID: PMC6885848.

de Martel C, Plummer M, Vignat J, Franceschi S. Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type. *Int J Cancer*. 2017 Aug 15;141(4):664-670. doi: 10.1002/ijc.30716. Epub 2017 Jun 8. PMID: 28369882; PMCID: PMC5520228.

de Oliveira CM, Fregnani JHTG, Villa LL. HPV Vaccine: Updates and Highlights. *Acta Cytol*. 2019;63(2):159-168. doi: 10.1159/000497617. Epub 2019 Mar 14. PMID: 30870844.

de Vos van Steenwijk PJ, van Poelgeest MI, Ramwadhoebe TH, Löwik MJ, Berends-van der Meer DM, van der Minne CE, Loof NM, Stynenbosch LF, Fathallah LM, Valentijn AR, Oostendorp J, Osse EM, Fleuren GJ, Nooij L, Kagie MJ, Hellebrekers BW, Melief CJ, Welters MJ, van der Burg SH, Kenter GG. The long-term immune response after HPV16 peptide vaccination in women with low-grade pre-malignant disorders of the uterine cervix: a placebo-controlled phase II study. *Cancer Immunol Immunother*. 2014 Feb;63(2):147-60. doi: 10.1007/s00262-013-1499-2. Epub 2013 Nov 15. PMID: 24233343.

Dhodapkar MV, Steinman RM, Sapp M, Desai H, Fossella C, Krasovskiy J, Donahoe SM, Dunbar PR, Cerundolo V, Nixon DF, Bhardwaj N. Rapid generation of broad T-cell immunity in humans after a single injection of mature dendritic cells. *J Clin Invest*. 1999 Jul;104(2):173-80. doi: 10.1172/JCI6909. PMID: 10411546; PMCID: PMC408478.

Diniz MO, Cariri FA, Aps LR, Ferreira LC. Enhanced therapeutic effects conferred by an experimental DNA vaccine targeting human papillomavirus-induced tumors. *Hum Gene Ther*. 2013 Oct;24(10):861-70. doi: 10.1089/hum.2013.102. PMID: 24007495.

Dürst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983 Jun;80(12):3812-5. doi: 10.1073/pnas.80.12.3812. PMID: 6304740; PMCID: PMC394142.

Dzionek A, Fuchs A, Schmidt P, Cremer S, Zysk M, Miltenyi S, Buck DW, Schmitz J. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol*. 2000 Dec 1;165(11):6037-46. doi: 10.4049/jimmunol.165.11.6037. PMID: 11086035.

Edwards RG, Longnecker R. Herpesvirus Entry Mediator and Ocular Herpesvirus Infection: More than Meets the Eye. *J Virol*. 2017 Jun 9;91(13):e00115-17. doi: 10.1128/JVI.00115-17. PMID: 28404853; PMCID: PMC5469272.

Egawa N, Egawa K, Griffin H, Doorbar J. Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia. *Viruses*. 2015 Jul 16;7(7):3863-90. doi: 10.3390/v7072802. PMID: 26193301; PMCID: PMC4517131.

Estipona, D. A guide to dendritic cells markers: An overview of proteins used in identifying dendritic cells. 2021 < <https://www.biocompare.com/Editorial-Articles/572982-Dendritic-Cell-Markers/>>

Frazer IH. Interaction of human papillomaviruses with the host immune system: a well evolved relationship. *Virology*. 2009 Feb 20;384(2):410-4. doi: 10.1016/j.virol.2008.10.004. Epub 2008 Nov 4. PMID: 18986661.

Fu C, Zhou L, Mi QS, Jiang A. Plasmacytoid Dendritic Cells and Cancer Immunotherapy. *Cells*. 2022 Jan 11;11(2):222. doi: 10.3390/cells11020222. PMID: 35053338; PMCID: PMC8773673.

Gardner A, de Mingo Pulido Á, Ruffell B. Dendritic Cells and Their Role in Immunotherapy. *Front Immunol*. 2020 May 21;11:924. doi: 10.3389/fimmu.2020.00924. PMID: 32508825; PMCID: PMC7253577.

Garland SM, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, Perez G, Harper DM, Leodolter S, Tang GW, Ferris DG, Steben M, Bryan J, Taddeo FJ, Railkar R, Esser MT, Sings HL, Nelson M, Boslego J, Sattler C, Barr E, Koutsky LA; Females United to Unilaterally Reduce Endo/Ectocervical Disease (FUTURE) I Investigators. Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent anogenital diseases. *N Engl J Med.* 2007 May 10;356(19):1928-43. doi: 10.1056/NEJMoa061760. PMID: 17494926.

Gautreau L, Chabannes D, Heslan M, Josien R. Modulation of regulatory T cell-Th17 balance by plasmacytoid dendritic cells. *J Leukoc Biol.* 2011 Sep;90(3):521-7. doi: 10.1189/jlb.0810455. Epub 2011 Jun 7. PMID: 21653235.

Gening TP, Antoneeva II, Abakumova TV, Peskov AB, Sidorenko EG, Gening SO, Dolgova DR. Dynamics of proinflammatory cytokine levels and their role in the development of local and systemic effects during progressing cervical cancer. *Bull Exp Biol Med.* 2014 Oct;157(6):776-80. doi: 10.1007/s10517-014-2665-z. Epub 2014 Oct 29. PMID: 25348567.

Granot T, Senda T, Carpenter DJ, Matsuoka N, Weiner J, Gordon CL, Miron M, Kumar BV, Griesemer A, Ho SH, Lerner H, Thome JJC, Connors T, Reizis B, Farber DL. Dendritic Cells Display Subset and Tissue-Specific Maturation Dynamics over Human Life. *Immunity.* 2017 Mar 21;46(3):504-515. doi: 10.1016/j.immuni.2017.02.019. PMID: 28329707; PMCID: PMC5415308.

Gratz IK, Rosenblum MD, Abbas AK. The life of regulatory T cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2013 Apr;1283:8-12. doi: 10.1111/nyas.12011. Epub 2013 Feb 12. PMID: 23402657.

Grogan JL, Mohrs M, Harmon B, Lacy DA, Sedat JW, Locksley RM. Early transcription and silencing of cytokine genes underlie polarization of T helper cell subsets. *Immunity.* 2001 Mar;14(3):205-15. doi: 10.1016/s1074-7613(01)00103-0. PMID: 11290331.

Groom JR, Richmond J, Murooka TT, Sorensen EW, Sung JH, Bankert K, von Andrian UH, Moon JJ, Mempel TR, Luster AD. CXCR3 chemokine receptor-ligand interactions in the lymph node optimize CD4+ T helper 1 cell differentiation. *Immunity.* 2012 Dec 14;37(6):1091-103. doi: 10.1016/j.immuni.2012.08.016. Epub 2012 Nov 1. PMID: 23123063; PMCID: PMC3525757.

Grotzke JE, Kozik P, Morel JD, Impens F, Pietrosemoli N, Cresswell P, Amigorena S, Demangel C. Sec61 blockade by mycolactone inhibits antigen cross-presentation independently of endosome-to-cytosol export. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017 Jul 18;114(29):E5910-E5919. doi: 10.1073/pnas.1705242114. Epub 2017 Jul 5. PMID: 28679634; PMCID: PMC5530691.

Guermónprez P, Amigorena S. Pathways for antigen cross presentation. *Springer Semin Immunopathol.* 2005 Jan;26(3):257-71. doi: 10.1007/s00281-004-0176-0. Epub 2004 Dec 3. PMID: 15592842.

Guermónprez P, Saveanu L, Kleijmeer M, Davoust J, Van Endert P, Amigorena S. ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature.* 2003 Sep 25;425(6956):397-402. doi: 10.1038/nature01911. PMID: 14508489.

Guermónprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Théry C, Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:621-67. doi: 10.1146/annurev.immunol.20.100301.064828. Epub 2001 Oct 4. PMID: 11861614.

Guilliams M, Ginhoux F, Jakubzick C, Naik SH, Onai N, Schraml BU, Segura E, Tussiwand R, Yona S. Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat Rev Immunol.* 2014 Aug;14(8):571-8. doi: 10.1038/nri3712. Epub 2014 Jul 18. PMID: 25033907; PMCID: PMC4638219.

Gupta S, Kumar P, Das BC. HPV: Molecular pathways and targets. *Curr Probl Cancer.* 2018 Mar-Apr;42(2):161-174. doi: 10.1016/j.currprobcancer.2018.03.003. Epub 2018 Apr 5. PMID: 29706467.

Gutiérrez-Martínez E, Planès R, Anselmi G, Reynolds M, Menezes S, Adiko AC, Saveanu L, Guermónprez P. Cross-Presentation of Cell-Associated Antigens by MHC Class I in Dendritic Cell Subsets. *Front Immunol.* 2015 Jul 17;6:363. doi: 10.3389/fimmu.2015.00363. PMID: 26236315; PMCID: PMC4505393.

Gutiérrez-Martínez E, Planès R, Anselmi G, Reynolds M, Menezes S, Adiko AC, Saveanu L, Guermónprez P. Cross-Presentation of Cell-Associated Antigens by MHC Class I in Dendritic Cell Subsets. *Front Immunol.* 2015 Jul 17;6:363. doi: 10.3389/fimmu.2015.00363. PMID: 26236315; PMCID: PMC4505393.

Hancock G, Hellner K, Dorrell L. Therapeutic HPV vaccines. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2018 Feb;47:59-72. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2017.09.008. Epub 2017 Sep 28. PMID: 29108943.

Haniffa M, Shin A, Bigley V, McGovern N, Teo P, See P, Wasan PS, Wang XN, Malinarich F, Malleret B, Larbi A, Tan P, Zhao H, Poidinger M, Pagan S, Cookson S, Dickinson R, Dimmick I, Jarrett RF, Renia L, Tam J, Song C, Connolly J, Chan JK, Gehring A, Bertoletti A, Collin M, Ginhoux F. Human tissues contain CD141hi cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103+ nonlymphoid dendritic cells. *Immunity.* 2012 Jul 27;37(1):60-73.

doi: 10.1016/j.immuni.2012.04.012. Epub 2012 Jul 12. PMID: 22795876; PMCID: PMC3476529.

Harbour SN, DiToro DF, Witte SJ, Zindl CL, Gao M, Schoeb TR, Jones GW, Jones SA, Hatton RD, Weaver CT. T<sub>H</sub>17 cells require ongoing classic IL-6 receptor signaling to retain transcriptional and functional identity. *Sci Immunol*. 2020 Jul 17;5(49):eaaw2262. doi: 10.1126/sciimmunol.aaw2262. PMID: 32680955; PMCID: PMC7843024.

Heo SK, Yoon MA, Lee SC, Ju SA, Choi JH, Suh PG, Kwon BS, Kim BS. HVEM signaling in monocytes is mediated by intracellular calcium mobilization. *J Immunol*. 2007 Nov 1;179(9):6305-10. doi: 10.4049/jimmunol.179.9.6305. Erratum in: *J Immunol*. 2007 Dec 15;179(12):8570. PMID: 17947707.

Hildner K, Edelson BT, Purtha WE, Diamond M, Matsushita H, Kohyama M, Calderon B, Schraml BU, Unanue ER, Diamond MS, Schreiber RD, Murphy TL, Murphy KM. Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science*. 2008 Nov 14;322(5904):1097-100. doi: 10.1126/science.1164206. PMID: 19008445; PMCID: PMC2756611.

Hilkens CM, Kalinski P, de Boer M, Kapsenberg ML. Human dendritic cells require exogenous interleukin-12-inducing factors to direct the development of naive T-helper cells toward the Th1 phenotype. *Blood*. 1997 Sep 1;90(5):1920-6. PMID: 9292525.

Hilligan KL, Ronchese F. Antigen presentation by dendritic cells and their instruction of CD4+ T helper cell responses. *Cell Mol Immunol*. 2020 Jun;17(6):587-599. doi: 10.1038/s41423-020-0465-0. Epub 2020 May 20. PMID: 32433540; PMCID: PMC7264306.

Honda T, Egen JG, Lämmermann T, Kastenmüller W, Torabi-Parizi P, Germain RN. Tuning of antigen sensitivity by T cell receptor-dependent negative feedback controls T cell effector function in inflamed tissues. *Immunity*. 2014 Feb 20;40(2):235-247. doi: 10.1016/j.immuni.2013.11.017. Epub 2014 Jan 16. PMID: 24440150; PMCID: PMC4792276.

Hoppe-Seyler K, Bossler F, Braun JA, Herrmann AL, Hoppe-Seyler F. The HPV E6/E7 Oncogenes: Key Factors for Viral Carcinogenesis and Therapeutic Targets. *Trends Microbiol*. 2018 Feb;26(2):158-168. doi: 10.1016/j.tim.2017.07.007. Epub 2017 Aug 17. PMID: 28823569.

Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science*. 1993 Apr 23;260(5107):547-9. doi: 10.1126/science.8097338. PMID: 8097338.

Hung CF, Monie A, Alvarez RD, Wu TC. DNA vaccines for cervical cancer: from bench to bedside. *Exp Mol Med*. 2007 Dec 31;39(6):679-89. doi: 10.1038/emm.2007.74. PMID: 18160838; PMCID: PMC3181139.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2020 : incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. – Rio de Janeiro: INCA, 2019.

Iwanowycz S, Ngoi S, Li Y, Hill M, Koivisto C, Parrish M, Guo B, Li Z, Liu B. Type 2 dendritic cells mediate control of cytotoxic T cell resistant tumors. *JCI Insight*. 2021 Sep 8;6(17):e145885. doi: 10.1172/jci.insight.145885. PMID: 34283809; PMCID: PMC8492342.

Jongbloed SL, Kassianos AJ, McDonald KJ, Clark GJ, Ju X, Angel CE, Chen CJ, Dunbar PR, Wadley RB, Jeet V, Vulink AJ, Hart DN, Radford KJ. Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *J Exp Med*. 2010 Jun 7;207(6):1247-60. doi: 10.1084/jem.20092140. Epub 2010 May 17. PMID: 20479116; PMCID: PMC2882828.

Jonuleit H, Schmitt E. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J Immunol*. 2003 Dec 15;171(12):6323-7. doi: 10.4049/jimmunol.171.12.6323. PMID: 14662827.

Joura EA, Giuliano AR, Iversen OE, Bouchard C, Mao C, Mehlsen J, Moreira ED Jr, Ngan Y, Petersen LK, Lazcano-Ponce E, Pitisuttithum P, Restrepo JA, Stuart G, Woelber L, Yang YC, Cuzick J, Garland SM, Huh W, Kjaer SK, Bautista OM, Chan IS, Chen J, Gesser R, Moeller E, Ritter M, Vuocolo S, Luxembourg A; Broad Spectrum HPV Vaccine Study. A 9-valent HPV vaccine against infection and intraepithelial neoplasia in women. *N Engl J Med*. 2015 Feb 19;372(8):711-23. doi: 10.1056/NEJMoa1405044. PMID: 25693011.

Koppelman B, Neefjes JJ, de Vries JE, de Waal Malefyt R. Interleukin-10 down-regulates MHC class II alpha beta peptide complexes at the plasma membrane of monocytes by affecting arrival and recycling. *Immunity*. 1997 Dec;7(6):861-71. doi: 10.1016/s1074-7613(00)80404-5. PMID: 9430231.

Kovacsovics-Bankowski M, Rock KL. A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science*. 1995 Jan 13;267(5195):243-6. doi: 10.1126/science.7809629. PMID: 7809629.

Kowalska M, Tajer J, Chechlinska M, Fuksiewicz M, Kotowicz B, Syczewska M, Walewski J, Kaminska J. Discriminant analysis involving serum cytokine levels and prediction of the response to therapy of patients with Hodgkin lymphoma. *Tumour Biol*. 2012 Oct;33(5):1733-8. doi: 10.1007/s13277-012-0432-1. Epub 2012 Jun 8. PMID: 22678978.

Lan X, Li S, Gao H, Nanding A, Quan L, Yang C, Ding S, Xue Y. Increased BTLA and HVEM in gastric cancer are associated with progression and poor prognosis. *Onco Targets Ther.* 2017 Feb 16;10:919-926. doi: 10.2147/OTT.S128825. PMID: 28243127; PMCID: PMC5317317.

Lande R, Gregorio J, Facchinetti V, Chatterjee B, Wang YH, Homey B, Cao W, Wang YH, Su B, Nestle FO, Zal T, Mellman I, Schröder JM, Liu YJ, Gilliet M. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature.* 2007 Oct 4;449(7162):564-9. doi: 10.1038/nature06116. Epub 2007 Sep 16. PMID: 17873860.

Lasaro MO, Diniz MO, Reyes-Sandoval A, Ertl HC, Ferreira LC. Anti-tumor DNA vaccines based on the expression of human papillomavirus-16 E6/E7 oncoproteins genetically fused with the glycoprotein D from herpes simplex virus-1. *Microbes Infect.* 2005 Dec;7(15):1541-50. doi: 10.1016/j.micinf.2005.05.024. Epub 2005 Sep 9. PMID: 16213178.

Lee SJ, Yang A, Wu TC, Hung CF. Immunotherapy for human papillomavirus-associated disease and cervical cancer: review of clinical and translational research. *J Gynecol Oncol.* 2016 Sep;27(5):e51. doi: 10.3802/jgo.2016.27.e51. Epub 2016 May 31. PMID: 27329199; PMCID: PMC4944018.

Lepski G, Bergami-Santos PC, Pinho MP, Chauca-Torres NE, Evangelista GCM, Teixeira SF, Flatow E, de Oliveira JV, Fogolin C, Peres N, Arévalo A, Alves VAF, Barbuto JAM. Adjuvant Vaccination with Allogenic Dendritic Cells Significantly Prolongs Overall Survival in High-Grade Gliomas: Results of a Phase II Trial. *Cancers.* 2023; 15(4):1239. <https://doi.org/10.3390/cancers15041239>

Lin K, Roosinovich E, Ma B, Hung CF, Wu TC. Therapeutic HPV DNA vaccines. *Immunol Res.* 2010 Jul;47(1-3):86-112. doi: 10.1007/s12026-009-8141-6. PMID: 20066511; PMCID: PMC2891127.

Ma GF, Miao Q, Zeng XQ, Luo TC, Ma LL, Liu YM, Lian JJ, Gao H, Chen SY. Transforming growth factor- $\beta$ 1 and - $\beta$ 2 in gastric precancer and cancer and roles in tumor-cell interactions with peripheral blood mononuclear cells in vitro. *PLoS One.* 2013;8(1):e54249. doi: 10.1371/journal.pone.0054249. Epub 2013 Jan 14. PMID: 23342108; PMCID: PMC3544811.

Ma X, Aste-Amezaga M, Gri G, Gerosa F, Trinchieri G. Immunomodulatory functions and molecular regulation of IL-12. *Chem Immunol.* 1997;68:1-22. doi: 10.1159/000058687. PMID: 9329213.



- Mantovani F, Banks L. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene*. 2001 Nov 26;20(54):7874-87. doi: 10.1038/sj.onc.1204869. PMID: 11753670.
- Marshall JS, Warrington R, Watson W, Kim HL. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2018 Sep 12;14(Suppl 2):49. doi: 10.1186/s13223-018-0278-1. PMID: 30263032; PMCID: PMC6156898.
- Massa C, Thomas C, Wang E, Marincola F, Seliger B. Different maturation cocktails provide dendritic cells with different chemoattractive properties. *J Transl Med*. 2015 Jun 3;13:175. doi: 10.1186/s12967-015-0528-7. PMID: 26695182; PMCID: PMC4467838.
- McCredie MR, Paul C, Sharples KJ, Baranyai J, Medley G, Skegg DC, Jones RW. Consequences in women of participating in a study of the natural history of cervical intraepithelial neoplasia 3. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 2010 Aug;50(4):363-70. doi: 10.1111/j.1479-828X.2010.01170.x. PMID: 20716265.
- Melief CJ. Cancer immunotherapy by dendritic cells. *Immunity*. 2008 Sep 19;29(3):372-83. doi: 10.1016/j.immuni.2008.08.004. PMID: 18799145.
- Mellman I. Dendritic cells: master regulators of the immune response. *Cancer Immunol Res*. 2013 Sep;1(3):145-9. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0102. PMID: 24777676.
- Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:563-604. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-074950. PMID: 23516985; PMCID: PMC3853342.
- Moscicki AB, Schiffman M, Burchell A, Albero G, Giuliano AR, Goodman MT, Kjaer SK, Palefsky J. Updating the natural history of human papillomavirus and anogenital cancers. *Vaccine*. 2012 Nov 20;30 Suppl 5(0 5):F24-33. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.05.089. PMID: 23199964; PMCID: PMC3700362.
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*. 1986 Apr 1;136(7):2348-57. PMID: 2419430.
- Münger K, Basile JR, Duensing S, Eichten A, Gonzalez SL, Grace M, Zacny VL. Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene*. 2001 Nov 26;20(54):7888-98. doi: 10.1038/sj.onc.1204860. PMID: 11753671.

Nair P, Amsen D, Blander JM. Co-ordination of incoming and outgoing traffic in antigen-presenting cells by pattern recognition receptors and T cells. *Traffic*. 2011 Dec;12(12):1669-76. doi: 10.1111/j.1600-0854.2011.01251.x. Epub 2011 Aug 15. PMID: 21762455; PMCID: PMC5800850.

Nair-Gupta P, Blander JM. An updated view of the intracellular mechanisms regulating cross-presentation. *Front Immunol*. 2013 Nov 22;4:401. doi: 10.3389/fimmu.2013.00401. PMID: 24319447; PMCID: PMC3837292.

Neves AR, Ensina LF, Anselmo LB, Leite KR, Buzaid AC, Câmara-Lopes LH, Barbuto JA. Dendritic cells derived from metastatic cancer patients vaccinated with allogeneic dendritic cell-autologous tumor cell hybrids express more CD86 and induce higher levels of interferon-gamma in mixed lymphocyte reactions. *Cancer Immunol Immunother*. 2005 Jan;54(1):61-6. doi: 10.1007/s00262-004-0550-8. PMID: 15693140.

Neves, Bruno & Lopes, Maria & Cruz, Maria. (2012). Pathogen Strategies to Evade Innate Immune Response: A Signaling Point of View. 10.5772/37771.

Nonn M, Schinz M, Zumbach K, Pawlita M, Schneider A, Dürst M, Kaufmann AM. Dendritic cell-based tumor vaccine for cervical cancer I: in vitro stimulation with recombinant protein-pulsed dendritic cells induces specific T cells to HPV16 E7 or HPV18 E7. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2003 Sep;129(9):511-20. doi: 10.1007/s00432-003-0462-6. Epub 2003 Aug 2. PMID: 12905010.

Noubade R, Majri-Morrison S, Tarbell KV. Beyond cDC1: Emerging Roles of DC Crosstalk in Cancer Immunity. *Front Immunol*. 2019 May 9;10:1014. doi: 10.3389/fimmu.2019.01014. PMID: 31143179; PMCID: PMC6521804.

Pal A, Kundu R. Human Papillomavirus E6 and E7: The Cervical Cancer Hallmarks and Targets for Therapy. *Front Microbiol*. 2020 Jan 21;10:3116. doi: 10.3389/fmicb.2019.03116. PMID: 32038557; PMCID: PMC6985034.

Palucka AK, Ueno H, Fay JW, Banchereau J. Taming cancer by inducing immunity via dendritic cells. *Immunol Rev*. 2007 Dec;220:129-50. doi: 10.1111/j.1600-065X.2007.00575.x. PMID: 17979844.

Palucka K, Banchereau J, Mellman I. Designing vaccines based on biology of human dendritic cell subsets. *Immunity*. 2010 Oct 29;33(4):464-78. doi: 10.1016/j.immuni.2010.10.007. PMID: 21029958; PMCID: PMC2975953.

Palucka K, Banchereau J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat Rev Cancer*. 2012 Mar 22;12(4):265-77. doi: 10.1038/nrc3258. PMID: 22437871; PMCID: PMC3433802.

Palucka K, Banchereau J. Dendritic-cell-based therapeutic cancer vaccines. *Immunity*. 2013 Jul 25;39(1):38-48. doi: 10.1016/j.immuni.2013.07.004. PMID: 23890062; PMCID: PMC3788678.

Park BV, Freeman ZT, Ghasemzadeh A, Chattergoon MA, Rutebemberwa A, Steigner J, Winter ME, Huynh TV, Sebald SM, Lee SJ, Pan F, Pardoll DM, Cox AL. TGF $\beta$ 1-Mediated SMAD3 Enhances PD-1 Expression on Antigen-Specific T Cells in Cancer. *Cancer Discov*. 2016 Dec;6(12):1366-1381. doi: 10.1158/2159-8290.CD-15-1347. Epub 2016 Sep 28. PMID: 27683557; PMCID: PMC5295786.

Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol*. 2005 Nov;6(11):1133-41. doi: 10.1038/ni1261. Epub 2005 Oct 2. PMID: 16200068; PMCID: PMC1618871.

Pasero C, Olive D. Interfering with coinhibitory molecules: BTLA/HVEM as new targets to enhance anti-tumor immunity. *Immunol Lett*. 2013 Mar;151(1-2):71-5. doi: 10.1016/j.imlet.2013.01.008. Epub 2013 Feb 21. PMID: 23439006.

Patente TA, Pinho MP, Oliveira AA, Evangelista GCM, Bergami-Santos PC, Barbuto JAM. Human Dendritic Cells: Their Heterogeneity and Clinical Application Potential in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol*. 2019 Jan 21;9:3176. doi: 10.3389/fimmu.2018.03176. PMID: 30719026; PMCID: PMC6348254.

Pinho MP, Lepski GA, Rehder R, Chauca-Torres NE, Evangelista GCM, Teixeira SF, Flatow EA, de Oliveira JV, Fogolin CS, Peres N, Arévalo A, Alves V, Barbuto JAM, Bergami-Santos PC. Near-Complete Remission of Glioblastoma in a Patient Treated with an Allogenic Dendritic Cell-Based Vaccine: The Role of Tumor-Specific CD4+T-Cell Cytokine Secretion Pattern in Predicting Response and Recurrence. *Int J Mol Sci*. 2022 May 12;23(10):5396. doi: 10.3390/ijms23105396. PMID: 35628206; PMCID: PMC9141410.

Pinho MP, Migliori IK, Flatow EA, Barbuto JA. Dendritic cell membrane CD83 enhances immune responses by boosting intracellular calcium release in T lymphocytes. *J Leukoc Biol*. 2014 May;95(5):755-762. doi: 10.1189/jlb.0413239. Epub 2014 Jan 16. PMID: 24436459.

Pinho MP, Sundarasetty BS, Bergami-Santos PC, Steponavicius-Cruz K, Ferreira AK, Stripecke R, Barbuto JA. Dendritic-tumor cell hybrids induce tumor-specific immune responses more effectively than the simple mixture of dendritic and tumor cells. *Cytotherapy*. 2016 Apr;18(4):570-80. doi: 10.1016/j.jcyt.2016.01.005. PMID: 26971685.

Porchia BF, Diniz MO, Cariri FA, Santana VC, Amorim JH, Balan A, Braga CJ, Ferreira LC. Purified herpes simplex type 1 glycoprotein D (gD) genetically fused with the type 16 human papillomavirus E7 oncoprotein enhances antigen-specific CD8+ T cell responses and confers protective antitumor immunity. *Mol Pharm.* 2011 Dec 5;8(6):2320-30. doi: 10.1021/mp200194s. Epub 2011 Oct 19. PMID: 21985578.

Porchia BFMM, Aps LRMM, Moreno ACR, da Silva JR, Silva MO, Sales NS, Alves RPDS, Rocha CRR, Silva MM, Rodrigues KB, Barros TB, Pagni RL, Souza PDC, Diniz MO, Ferreira LCS. Active immunization combined with cisplatin confers enhanced therapeutic protection and prevents relapses of HPV-induced tumors at different anatomical sites. *Int J Biol Sci.* 2022 Jan 1;18(1):15-29. doi: 10.7150/ijbs.56644. PMID: 34975315; PMCID: PMC8692155.

Porchia BFMM, Moreno ACR, Ramos RN, Diniz MO, de Andrade LHTM, Rosa DS, Barbuto JAM, Boscardin SB, Ferreira LCS. Herpes Simplex Virus Glycoprotein D Targets a Specific Dendritic Cell Subset and Improves the Performance of Vaccines to Human Papillomavirus-Associated Tumors. *Mol Cancer Ther.* 2017 Sep;16(9):1922-1933. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-17-0071. Epub 2017 May 18. PMID: 28522585.

Poulin LF, Salio M, Griessinger E, Anjos-Afonso F, Craciun L, Chen JL, Keller AM, Joffre O, Zelenay S, Nye E, Le Moine A, Faure F, Donckier V, Sancho D, Cerundolo V, Bonnet D, Reis e Sousa C. Characterization of human DNGR-1+ BDCA3+ leukocytes as putative equivalents of mouse CD8alpha+ dendritic cells. *J Exp Med.* 2010 Jun 7;207(6):1261-71. doi: 10.1084/jem.20092618. Epub 2010 May 17. PMID: 20479117; PMCID: PMC2882845.

Rahma OE, Herrin VE, Ibrahim RA, Toubaji A, Bernstein S, Dakheel O, Steinberg SM, Abu Eid R, Mkrtichyan M, Berzofsky JA, Khleif SN. Pre-immature dendritic cells (PIDC) pulsed with HPV16 E6 or E7 peptide are capable of eliciting specific immune response in patients with advanced cervical cancer. *J Transl Med.* 2014 Dec 16;12:353. doi: 10.1186/s12967-014-0353-4. PMID: 25510844; PMCID: PMC4269078.

Ramos RN, Chin LS, Dos Santos AP, Bergami-Santos PC, Laginha F, Barbuto JA. Monocyte-derived dendritic cells from breast cancer patients are biased to induce CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *J Leukoc Biol.* 2012 Sep;92(3):673-82. doi: 10.1189/jlb.0112048. Epub 2012 May 25. PMID: 22636320.

Ramos RN, de Moraes CJ, Zelante B, Barbuto JA. What are the molecules involved in regulatory T-cells induction by dendritic cells in cancer? *Clin Dev Immunol.* 2013;2013:806025. doi: 10.1155/2013/806025. Epub 2013 May 22. PMID: 23762097; PMCID: PMC3674660.

- Rao PE, Petrone AL, Ponath PD. Differentiation and expansion of T cells with regulatory function from human peripheral lymphocytes by stimulation in the presence of TGF- $\beta$ . *J Immunol*. 2005 Feb 1;174(3):1446-55. doi: 10.4049/jimmunol.174.3.1446. PMID: 15661903.
- Reis e Sousa C. Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity. *Curr Opin Immunol*. 2004 Feb;16(1):21-5. doi: 10.1016/j.coi.2003.11.007. PMID: 14734106.
- Reis e Sousa C. Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol*. 2006 Jun;6(6):476-83. doi: 10.1038/nri1845. PMID: 16691244.
- Reis e Sousa C. Toll-like receptors and dendritic cells: for whom the bug tolls. *Semin Immunol*. 2004 Feb;16(1):27-34. doi: 10.1016/j.smim.2003.10.004. PMID: 14751761.
- Reizis B, Bunin A, Ghosh HS, Lewis KL, Sisirak V. Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:163-83. doi: 10.1146/annurev-immunol-031210-101345. PMID: 21219184; PMCID: PMC4160806.
- Roman A, Munger K. The papillomavirus E7 proteins. *Virology*. 2013 Oct;445(1-2):138-68. doi: 10.1016/j.virol.2013.04.013. Epub 2013 May 31. PMID: 23731972; PMCID: PMC3783579.
- Romano E, Cotari JW, Barreira da Silva R, Betts BC, Chung DJ, Avogadri F, Fink MJ, St Angelo ET, Mehrara B, Heller G, Münz C, Altan-Bonnet G, Young JW. Human Langerhans cells use an IL-15R- $\alpha$ /IL-15/pSTAT5-dependent mechanism to break T-cell tolerance against the self-differentiation tumor antigen WT1. *Blood*. 2012 May 31;119(22):5182-90. doi: 10.1182/blood-2011-09-382200. Epub 2012 Apr 17. PMID: 22510877; PMCID: PMC3369609.
- Rosendahl Huber S, van Beek J, de Jonge J, Luytjes W, van Baarle D. T cell responses to viral infections - opportunities for Peptide vaccination. *Front Immunol*. 2014 Apr 16;5:171. doi: 10.3389/fimmu.2014.00171. PMID: 24795718; PMCID: PMC3997009.
- Rudd CE, Schneider H. Unifying concepts in CD28, ICOS and CTLA4 co-receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2003 Jul;3(7):544-56. doi: 10.1038/nri1131. PMID: 12876557.
- Rutz S, Ouyang W. Regulation of Interleukin-10 Expression. *Adv Exp Med Biol*. 2016;941:89-116. doi: 10.1007/978-94-024-0921-5\_5. PMID: 27734410.
- Sabado RL, Balan S, Bhardwaj N. Dendritic cell-based immunotherapy. *Cell Res*. 2017 Jan;27(1):74-95. doi: 10.1038/cr.2016.157. Epub 2016 Dec 27. PMID: 28025976; PMCID: PMC5223236.
- Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol*. 2010 Jul;10(7):490-500. doi: 10.1038/nri2785. Epub 2010 Jun 18. PMID: 20559327.

Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med*. 1994 Apr 1;179(4):1109-18. doi: 10.1084/jem.179.4.1109. PMID: 8145033; PMCID: PMC2191432.

Salmon H, Idoyaga J, Rahman A, Leboeuf M, Remark R, Jordan S, Casanova-Acebes M, Khudoynazarova M, Agudo J, Tung N, Chakarov S, Rivera C, Hogstad B, Bosenberg M, Hashimoto D, Gnjatic S, Bhardwaj N, Palucka AK, Brown BD, Brody J, Ginhoux F, Merad M. Expansion and Activation of CD103(+) Dendritic Cell Progenitors at the Tumor Site Enhances Tumor Responses to Therapeutic PD-L1 and BRAF Inhibition. *Immunity*. 2016 Apr 19;44(4):924-38. doi: 10.1016/j.immuni.2016.03.012. PMID: 27096321; PMCID: PMC4980762.

Sánchez-Paulete AR, Teijeira A, Cueto FJ, Garasa S, Pérez-Gracia JL, Sánchez-Arráez A, Sancho D, Melero I. Antigen cross-presentation and T-cell cross-priming in cancer immunology and immunotherapy. *Ann Oncol*. 2017 Dec 1;28(suppl\_12):xii44-xii55. doi: 10.1093/annonc/mdx237. Erratum in: *Ann Oncol*. 2017 Dec 1;28(suppl\_12):xii74. PMID: 28945841.

Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*. 2007 Sep 8;370(9590):890-907. doi: 10.1016/S0140-6736(07)61416-0. PMID: 17826171.

Schiffman M, Wentzensen N. From human papillomavirus to cervical cancer. *Obstet Gynecol*. 2010 Jul;116(1):177-185. doi: 10.1097/AOG.0b013e3181e4629f. PMID: 20567185.

Schiller JT, Lowy DR. An Introduction to Virus Infections and Human Cancer. *Recent Results Cancer Res*. 2021;217:1-11. doi: 10.1007/978-3-030-57362-1\_1. PMID: 33200359; PMCID: PMC8336782.

Schiller JT, Lowy DR. Understanding and learning from the success of prophylactic human papillomavirus vaccines. *Nat Rev Microbiol*. 2012 Oct;10(10):681-92. doi: 10.1038/nrmicro2872. Epub 2012 Sep 10. PMID: 22961341; PMCID: PMC6309166.

Schuler G, Steinman RM. Dendritic cells as adjuvants for immune-mediated resistance to tumors. *J Exp Med*. 1997 Oct 20;186(8):1183-7. doi: 10.1084/jem.186.8.1183. PMID: 9379142; PMCID: PMC2199101.

Serrano B, Brotons M, Bosch FX, Bruni L. Epidemiology and burden of HPV-related disease. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2018 Feb;47:14-26. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2017.08.006. Epub 2017 Sep 2. PMID: 29037457.

Sharpe AH, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol*. 2002 Feb;2(2):116-26. doi: 10.1038/nri727. PMID: 11910893.

Sheu BC, Lin RH, Lien HC, Ho HN, Hsu SM, Huang SC. Predominant Th2/Tc2 polarity of tumor-infiltrating lymphocytes in human cervical cancer. *J Immunol*. 2001 Sep 1;167(5):2972-8. doi: 10.4049/jimmunol.167.5.2972. PMID: 11509647.

Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol*. 2002 Mar;2(3):151-61. doi: 10.1038/nri746. PMID: 11913066.

Singh D, Vignat J, Lorenzoni V, Eslahi M, Ginsburg O, Lauby-Secretan B, Arbyn M, Basu P, Bray F, Vaccarella S. Global estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2020: a baseline analysis of the WHO Global Cervical Cancer Elimination Initiative. *Lancet Glob Health*. 2023 Feb;11(2):e197-e206. doi: 10.1016/S2214-109X(22)00501-0. Epub 2022 Dec 14. PMID: 36528031; PMCID: PMC9848409.

Smotkin D, Wettstein FO. The major human papillomavirus protein in cervical cancers is a cytoplasmic phosphoprotein. *J Virol*. 1987 May;61(5):1686-9. doi: 10.1128/JVI.61.5.1686-1689.1987. PMID: 3033296; PMCID: PMC254156.

So T, Croft M. Regulation of PI-3-Kinase and Akt Signaling in T Lymphocytes and Other Cells by TNFR Family Molecules. *Front Immunol*. 2013 Jun 7;4:139. doi: 10.3389/fimmu.2013.00139. PMID: 23760533; PMCID: PMC3675380.

So T, Ishii N. The TNF-TNFR Family of Co-signal Molecules. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1189:53-84. doi: 10.1007/978-981-32-9717-3\_3. PMID: 31758531.

Spear PG, Manoj S, Yoon M, Jogger CR, Zago A, Myscofski D. Different receptors binding to distinct interfaces on herpes simplex virus gD can trigger events leading to cell fusion and viral entry. *Virology*. 2006 Jan 5;344(1):17-24. doi: 10.1016/j.virol.2005.09.016. PMID: 16364731.

Sprangers S, de Vries TJ, Everts V. Monocyte Heterogeneity: Consequences for Monocyte-Derived Immune Cells. *J Immunol Res*. 2016;2016:1475435. doi: 10.1155/2016/1475435. Epub 2016 Jul 11. PMID: 27478854; PMCID: PMC4958468.

Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med*. 1973 May 1;137(5):1142-62. doi: 10.1084/jem.137.5.1142. PMID: 4573839; PMCID: PMC2139237.

Steinman RM, Swanson J. The endocytic activity of dendritic cells. *J Exp Med*. 1995 Aug 1;182(2):283-8. doi: 10.1084/jem.182.2.283. PMID: 7629494; PMCID: PMC2192115.

- Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol.* 1991;9:271-96. doi: 10.1146/annurev.iy.09.040191.001415. PMID: 1910679.
- Sun B, Zhang Y. Overview of orchestration of CD4+ T cell subsets in immune responses. *Adv Exp Med Biol.* 2014;841:1-13. doi: 10.1007/978-94-017-9487-9\_1. PMID: 25261202.
- Sun C, Mezzadra R, Schumacher TN. Regulation and Function of the PD-L1 Checkpoint. *Immunity.* 2018 Mar 20;48(3):434-452. doi: 10.1016/j.immuni.2018.03.014. PMID: 29562194; PMCID: PMC7116507.
- Sun Z, Fourcade J, Pagliano O, Chauvin JM, Sander C, Kirkwood JM, Zarour HM. IL10 and PD-1 Cooperate to Limit the Activity of Tumor-Specific CD8+ T Cells. *Cancer Res.* 2015 Apr 15;75(8):1635-44. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3016. Epub 2015 Feb 26. PMID: 25720800; PMCID: PMC4401638.
- Swiecki M, Colonna M. The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nat Rev Immunol.* 2015 Aug;15(8):471-85. doi: 10.1038/nri3865. Epub 2015 Jul 10. PMID: 26160613; PMCID: PMC4808588.
- Théry C, Amigorena S. The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Curr Opin Immunol.* 2001 Feb;13(1):45-51. doi: 10.1016/s0952-7915(00)00180-1. PMID: 11154916.
- Tindle RW. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Nat Rev Cancer.* 2002 Jan;2(1):59-65. doi: 10.1038/nrc700. PMID: 11902586.
- Tohyama Y, Yamamura H. Complement-mediated phagocytosis--the role of Syk. *IUBMB Life.* 2006 May-Jun;58(5-6):304-8. doi: 10.1080/15216540600746377. PMID: 16754322.
- Touret N, Paroutis P, Terebiznik M, Harrison RE, Trombetta S, Pypaert M, Chow A, Jiang A, Shaw J, Yip C, Moore HP, van der Wel N, Houben D, Peters PJ, de Chastellier C, Mellman I, Grinstein S. Quantitative and dynamic assessment of the contribution of the ER to phagosome formation. *Cell.* 2005 Oct 7;123(1):157-70. doi: 10.1016/j.cell.2005.08.018. PMID: 16213220.
- Trinchieri G, Pflanz S, Kastelein RA. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity.* 2003 Nov;19(5):641-4. doi: 10.1016/s1074-7613(03)00296-6. PMID: 14614851.
- Trombetta ES, Mellman I. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:975-1028. doi: 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104538. PMID: 15771591.
- Tsang JYS, Chan KW, Ni YB, Hlaing T, Hu J, Chan SK, Cheung SY, Tse GM. Expression and Clinical Significance of Herpes Virus Entry Mediator (HVEM) in Breast Cancer. *Ann Surg*



Oncol. 2017 Dec;24(13):4042-4050. doi: 10.1245/s10434-017-5924-1. Epub 2017 Jun 13. PMID: 28612127.

Turvey SE, Broide DH. Innate immunity. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S24-32. doi: 10.1016/j.jaci.2009.07.016. Epub 2009 Nov 24. PMID: 19932920; PMCID: PMC2832725.

Tyanova S, Temu T, Sinitcyn P, Carlson A, Hein MY, Geiger T, Mann M, Cox J. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat Methods*. 2016 Sep;13(9):731-40. doi: 10.1038/nmeth.3901. Epub 2016 Jun 27. PMID: 27348712.

Tze LE, Horikawa K, Domaschenz H, Howard DR, Roots CM, Rigby RJ, Way DA, Ohmura-Hoshino M, Ishido S, Andoniou CE, Degli-Esposti MA, Goodnow CC. CD83 increases MHC II and CD86 on dendritic cells by opposing IL-10-driven MARCH1-mediated ubiquitination and degradation. *J Exp Med*. 2011 Jan 17;208(1):149-65. doi: 10.1084/jem.20092203. Epub 2011 Jan 10. PMID: 21220452; PMCID: PMC3023131.

Valdovinos-Torres H, Orozco-Morales M, Pedroza-Saavedra A, Padilla-Noriega L, Esquivel-Guadarrama F, Gutierrez-Xicotencatl L. Different Isoforms of HPV16 E7 Protein are Present in Cytoplasm and Nucleus. *Open Virol J*. 2008;2:15-23. doi: 10.2174/1874357900802010015. Epub 2008 Mar 26. PMID: 19440460; PMCID: PMC2678815.

van Kooyk Y, Figdor CG. Avidity regulation of integrins: the driving force in leukocyte adhesion. *Curr Opin Cell Biol*. 2000 Oct;12(5):542-7. doi: 10.1016/s0955-0674(00)00129-0. PMID: 10978887.

Väyrynen JP, Kantola T, Väyrynen SA, Klintrup K, Bloigu R, Karhu T, Mäkelä J, Herzig KH, Karttunen TJ, Tuomisto A, Mäkinen MJ. The relationships between serum cytokine levels and tumor infiltrating immune cells and their clinical significance in colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2016 Jul 1;139(1):112-21. doi: 10.1002/ijc.30040. Epub 2016 Mar 7. PMID: 26874795.

Vici P, Pizzuti L, Mariani L, Zampa G, Santini D, Di Lauro L, Gamucci T, Natoli C, Marchetti P, Barba M, Maugeri-Saccà M, Sergi D, Tomao F, Vizza E, Di Filippo S, Paolini F, Curzio G, Corrado G, Michelotti A, Sanguineti G, Giordano A, De Maria R, Venuti A. Targeting immune response with therapeutic vaccines in premalignant lesions and cervical cancer: hope or reality from clinical studies. *Expert Rev Vaccines*. 2016 Oct;15(10):1327-36. doi: 10.1080/14760584.2016.1176533. Epub 2016 May 9. PMID: 27063030; PMCID: PMC5152541.

Villani AC, Satija R, Reynolds G, Sarkizova S, Shekhar K, Fletcher J, Griesbeck M, Butler A, Zheng S, Lazo S, Jardine L, Dixon D, Stephenson E, Nilsson E, Grundberg I, McDonald D,

Filby A, Li W, De Jager PL, Rozenblatt-Rosen O, Lane AA, Haniffa M, Regev A, Hacohen N. Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science*. 2017 Apr 21;356(6335):eaah4573. doi: 10.1126/science.aah4573. PMID: 28428369; PMCID: PMC5775029.

Vonsky MS, Runov AL, Gordeychuk IV, Isaguliants MG. Therapeutic Vaccines Against Human Papilloma Viruses: Achievements and Prospects. *Biochemistry (Mosc)*. 2019 Jul;84(7):800-816. doi: 10.1134/S0006297919070101. PMID: 31509730.

Wang R, Pan W, Jin L, Huang W, Li Y, Wu D, Gao C, Ma D, Liao S. Human papillomavirus vaccine against cervical cancer: Opportunity and challenge. *Cancer Lett*. 2020 Feb 28;471:88-102. doi: 10.1016/j.canlet.2019.11.039. Epub 2019 Dec 5. PMID: 31812696.

Wang YT, Li W, Liu Q, Guan X, Hu J. Dendritic cells treated with HPV16mE7 in a three-dimensional model promote the secretion of IL-12p70 and IFN- $\gamma$ . *Exp Mol Pathol*. 2011 Aug;91(1):325-30. doi: 10.1016/j.yexmp.2011.03.005. Epub 2011 Apr 2. PMID: 21463625.

Watts C, West MA, Zaru R. TLR signalling regulated antigen presentation in dendritic cells. *Curr Opin Immunol*. 2010 Feb;22(1):124-30. doi: 10.1016/j.coi.2009.12.005. Epub 2010 Jan 18. PMID: 20083398.

Watts TH. TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:23-68. doi: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115839. PMID: 15771565.

Wculek SK, Cueto FJ, Mujal AM, Melero I, Krummel MF, Sancho D. Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2020 Jan;20(1):7-24. doi: 10.1038/s41577-019-0210-z. Epub 2019 Aug 29. PMID: 31467405.

West MA, Wallin RP, Matthews SP, Svensson HG, Zaru R, Ljunggren HG, Prescott AR, Watts C. Enhanced dendritic cell antigen capture via toll-like receptor-induced actin remodeling. *Science*. 2004 Aug 20;305(5687):1153-7. doi: 10.1126/science.1099153. PMID: 15326355.

Westrich JA, Warren CJ, Pyeon D. Evasion of host immune defenses by human papillomavirus. *Virus Res*. 2017 Mar 2;231:21-33. doi: 10.1016/j.virusres.2016.11.023. Epub 2016 Nov 24. PMID: 27890631; PMCID: PMC5325784.

Wong KK, Li WA, Mooney DJ, Dranoff G. Advances in Therapeutic Cancer Vaccines. *Adv Immunol*. 2016;130:191-249. doi: 10.1016/bs.ai.2015.12.001. Epub 2016 Jan 19. PMID: 26923002.

Yang A, Farmer E, Wu TC, Hung CF. Perspectives for therapeutic HPV vaccine development. *J Biomed Sci.* 2016 Nov 4;23(1):75. doi: 10.1186/s12929-016-0293-9. PMID: 27809842; PMCID: PMC5096309.

Yu JS, Liu G, Ying H, Yong WH, Black KL, Wheeler CJ. Vaccination with tumor lysate-pulsed dendritic cells elicits antigen-specific, cytotoxic T-cells in patients with malignant glioma. *Cancer Res.* 2004 Jul 15;64(14):4973-9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-03-3505. PMID: 15256471.

Zhou ZX, Li D, Guan SS, Zhao C, Li ZL, Zeng Y. Immunotherapeutic Effects of Dendritic Cells Pulsed with a Codon-optimized HPV 16 E6 and E7 Fusion Gene in Vivo and in Vitro. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16(9):3843-7. doi: 10.7314/apjcp.2015.16.9.3843. PMID: 25987047.

zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer.* 2002 May;2(5):342-50. doi: 10.1038/nrc798. PMID: 12044010.