

GABRIELA ÁVILA DE GRAZIA

**Caracterização de um peptídeo selecionado por *Phage Display* com
atividade anti-tumoral**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de

São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Oncologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Luisa Lina Villa

São Paulo

2022

GABRIELA ÁVILA DE GRAZIA

**Caracterização de um peptídeo selecionado por *Phage Display* com
atividade anti-tumoral**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de
São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências
Programa de Oncologia
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Luisa Lina Villa

São Paulo

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Grazia, Gabriela Avila de
Caracterização de um peptídeo selecionado por
Phage Display com atividade anti-tumoral / Gabriela
Avila de Grazia. -- São Paulo, 2022.
Tese (doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Oncologia.
Orientadora: Luisa Lina Villa.

Descritores: 1.Neoplasia 2.HPV 3.Biblioteca de
bacteriófagos 4.Peptídeos 5.Mimotopo 6.CD40 7.Phage
Display 8.Câncer do colo do útero

USP/FM/DBD-392/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Ao meu amor, Felipe, aos meus filhos de 4 patas e à minha família, que sempre estiveram
comigo

AGRADECIMENTOS

Nada se conquista sozinho. E nessa etapa importante de minha vida, sou intensamente grata a todos que sempre estiveram ao meu lado e colaboraram do seu jeito, para que eu chegasse até aqui.

Agradeço,

a Deus, que foi minha sustentação durante todo esse período.

ao Felipe, por todo amor, carinho, apoio e paciência. Você faz com que meus dias sejam sempre especiais e felizes! Obrigada por estar sempre ao meu lado, pela sua positividade, cuidado e por sempre me incentivar a encarar novos desafios. Tudo fica melhor ao seu lado!

aos meus pais, por tudo! Por estarem ao meu lado durante toda a jornada. Obrigada por todo o amor e carinho.

aos meus sogros, cunhada e cunhado. Obrigada por sempre estarem ali, e por todo o carinho.

à Dra Luisa Villa, pela oportunidade de desenvolver esse trabalho, orientação e por todo aprendizado ao longo de todo esse período.

à Dra Ana Paula Lepique por toda colaboração e discussões dos resultados obtidos.

À Dra Maria Cristina Rangel por ceder a linhagem celular T47D.

ao Dr Ricardo Giordano pelas contribuições e discussões científicas.

Ao Lanre por sempre estar disponível para tirar minhas dúvidas, pelas conversas e risadas.

à Rafa (Ellen), minha querida amiga e parceira de lab! Obrigada pelo apoio, conversas e por estar sempre comigo!

à Giana (Gianinha) obrigada por todo carinho, ajudas, conversas, risadas. Você é uma pessoa muito especial.

à Mayara (amorinha) que sempre esteve junto comigo! Obrigada pelos bons momentos, ajudas, conversas, risadas! Obrigada por tudo!

Ao Daniel e à Mércia que já chegaram tornando meus dias mais leves e divertidos! Obrigada a vocês pelas conversas, risadas, ajudas, colaborações e por estarem sempre ali. Obrigada por tudo!

à Vanesca por estar sempre ali para ajudar, pelas conversas, risadas, por ser essa pessoa tão querida! Muito obrigada!

à Heloíse e à Suellen pelas ajudas e pelas conversas.

à Camila e Tharcisio por toda a ajuda em citometria de fluxo.

à Raquel e Luciane pelo excelente trabalho que realizam na pós-graduação e por serem pessoas tão queridas.

às agências de fomento Capes e Cnpq por todo suporte financeiro

EPÍGRAFE

*“O que prevemos raramente ocorre; o que menos esperamos geralmente acontece.”-
Benjamin Disraeli*

*"Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana,
seja apenas outra alma humana."- Carl Jung*

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Essa tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana,

Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena.

3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e documentação, 2016.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

SUMÁRIO

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de símbolos, siglas e abreviaturas

Resumo

Abstract

1.	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	CÂNCER DO COLO UTERINO.....	17
1.1.1	Epidemiologia, fatores de risco	17
1.1.2	Associação entre HPV e câncer do colo do útero.....	18
1.2	PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV).....	20
1.2.1	Características e organização do genoma.....	20
1.2.2	Taxonomia e classificação.....	21
1.2.3	Ciclo de replicação do HPV	23
1.2.4	Potencial oncogênico e integração viral	26
1.3	HPV E RESPOSTA IMUNE	26
1.4	CD40 (CLUSTER OF DIFFERENTIATION 40).....	28
1.5	HPV E VACINAS.....	31
1.6	PHAGE DISPLAY, PEPTÍDEOS E CÂNCER	32
2.	BACKGROUND DO ESTUDO E OBJETIVOS.....	36
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1	Construção do fago recombinante	37
3.2	Cultura de E.coli K91	37
3.3	Amplificação, purificação e sequenciamento de fagos	37
3.4	Ensaio de overlay em membrana de nitrocelulose.....	37
3.4.1	Soros e plasmas humanos.....	37
3.4.2	Soro de camundongos imunizados	38
3.5	Análise por BLAST.....	38
3.6	Análise in silico do perfil de expressão de CD40 e CD40L.....	38
3.7	Imunohistoquímica.....	38
3.8	Imunocitoquímica.....	39
3.8.1	Ensaio de ligação.....	39
3.8.2	Ensaio de competição.....	39
3.9	Marcação fluorescente de partículas de fago.....	40
3.10	Citometria de fluxo.....	40
4.	RESULTADOS	41

4.1	Amplificação, purificação e sequenciamento de fagos	41
4.2	O fago recombinante PEP1 não distingue soros ou plasmas de mulheres com esfregaços cervicais positivos ou negativos para HPV	41
4.3	A sequência de PEP1 é encontrada no CD40 humano	42
4.4	Níveis maiores de CD40 circulante são encontrados em camundongos imunizados com ØPEP1	43
4.5	Câncer do colo do útero e perfil de expressão de CD40 e CD40L.....	44
4.6	O fago recombinante PEP1 e CD40 apresentam similaridade de marcação em tumores da cérvix uterina.....	46
4.7	O fago recombinante PEP1 não se liga especificamente às linhagens celulares de câncer do colo do útero positivas para HPV, mas se liga a fibroblastos que superexpressam o ligante de CD40 (CD40L) e a células de câncer de mama	57
4.8	O fago recombinante PEP1 liga-se especificamente a fibroblastos expressando CD40L.....	62
5.	DISCUSSÃO.....	65
6.	CONCLUSÃO.....	71
7.	REFERÊNCIAS	72
8.	ANEXOS.....	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do processo carcinogênico mediado por HPV e suas alterações celulares.....	19
Figura 2. Papilomavírus humano (HPV)	20
Figura 3. Organização do genoma do HPV e funções principais das proteínas virais	21
Figura 4. Classificação dos HPV.....	22
Figura 5. Ciclo de replicação do HPV.....	24
Figura 6. Via de sinalização do CD40.....	29
Figura 7. Representação esquemática da técnica de Phage Display	33
Figura 8. Bacteriófago M13	34
Figura 9. Eletroforese em gel de ágar da PCR amplificada de fagos de controle e recombinante, utilizando os primers FUSE 5 forward e reverse	41
Figura 10. ØPEP1 se liga a soros derivados de mulheres com esfregaços do colo uterino HPV positivos e negativos	41
Figura 11. ØPEP1 se liga a plasmas derivados de mulheres com esfregaços do colo uterino HPV positivos e negativos	42
Figura 12. Sequência de PEP1 é encontrada no CD40 humano.....	43
Figura 13. Camundongos imunizados com ØPEP1 possuem maiores níveis de CD40 circulante.....	44
Figura 14. Expressão de CD40 nos subtipos tumorais de cérvix uterina.....	45
Figura 15. Associação entre a expressão de CD40 e CD40L e sobrevivência em carcinomas escamosos do colo uterino.....	46
Figura 16. Imunocoloração de um carcinoma escamoso de cérvix uterina HPV16 positivo (nº registro: 60008254) incubado com ØPEP1, seguido do anticorpo anti-Fd.....	48
Figura 17. Imunocoloração de um carcinoma escamoso de cérvix uterina HPV16 positivo (nº registro: 60008254) incubado com o anticorpo anti-CD40.....	49
Figura 18. Imunocoloração de um carcinoma escamoso de cérvix uterina HPV16 positivo (nº registro: 60008254) incubado com ØM13, seguido do anticorpo anti-Fd	50
Figura 19. Imunocoloração de um adenocarcinoma de cérvix uterina HPV16 positivo (nº registro: 60008935) incubado com ØPEP1, seguido do anticorpo anti-Fd.....	51
Figura 20. Imunocoloração de um adenocarcinoma de cérvix uterina HPV16 positivo (nº registro: 60008935) incubado com o anticorpo anti-CD40.....	52
Figura 21. Imunocoloração de um adenocarcinoma de cérvix uterina HPV16 positivo (nº registro: 60008935) incubado com ØM13, seguido do anticorpo anti-Fd	53
Figura 22. Imunocoloração de um carcinoma escamoso de cérvix uterina HPV negativo (nº registro: 13876808) incubado com ØPEP1, seguido do anticorpo anti-Fd.....	54

Figura 23. Imunocoloração de um carcinoma escamoso de cérvix uterina HPV negativo (n° registro: 13876808) incubado com o anticorpo anti-CD40.....	55
Figura 24. Imunocoloração de um carcinoma escamoso de cérvix uterina HPV negativo (n° registro: 13876808) incubado com ØM13, seguido do anticorpo anti-Fd	56
Figura 25. ØPEP1 não apresenta especificidade de ligação a células de câncer de colo uterino positivas para HPV.....	58
Figura 26. ØPEP1 liga-se especificamente a fibroblastos que superexpressam CD40L e às células tumorais de mama	60
Figura 27. ØPEP1 não se liga diferencialmente à linhagem celular SiHa	61
Figura 28. ØPEP1 não se liga diferencialmente à linhagem celular HeLa	61
Figura 29. ØPEP1 liga-se a fibroblastos que superexpressam CD40L (NIH3T3CD40L) ..	62
Figura 30. ØPEP1 liga-se a à linhagem celular T47D	62
Figura 31. ØPEP1 parece ser um mimotopo de CD40.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Organização dos HPV de acordo com sua oncogenicidade e associação a doenças... 23

Tabela 2. Características clínico-patológicas dos pacientes do estudo *TCGA firehose legacy*... 44

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C Grau Celsius

> Maior que

< Menor que

µL Microlitro

mM Milimolar

APC Célula Apresentadora de Antígeno

BLAST *Basic Local Alignment Search Tool*

CD *Cluster of differentiation*

CTL Linfócitos Citotóxicos

DAB 3,3'-Diaminobenzidina

DC Célula Dendrítica

DMEM *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DNA Ácido Desoxirribonucleico

E Região Precoce

E1 Proteína Precoce 1

E2 Proteína Precoce 2

E5 Proteína Precoce 5

E6 Proteína Precoce 6

E6-AP Proteína associada a E6

E7 Proteína Precoce 7

EGF *Epidermal growth factor*

hTERT Transcriptase reversa telomerase humana

IFN Interferon

IL Interleucina

L1 Proteína Tardia 1

L2 Proteína Tardia 2

LB *Luria Bertani Medium*

LC Células de *Langerhans*

LCR Região Longa de Controle

ØM13 Fago Filamentoso selvagem

MEM *Minimum Essential Medium*

MFI Mediana de Intensidade de Fluorescência

MHC Complexo Principal de Histocompatibilidade

NaCl Cloreto de Sódio

NF-κB *Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B Cells*

NIC Neoplasias intra-epiteliais cervicais
NK *Natural Killer*
ORF *Open Reading frame*
PBS *Phosphate-buffered saline*
PEG Polietilenoglicol
ØPEP1 Fago Recombinante PEP1
pRB Proteína do Retinoblastoma
RNA Ácido Ribonucleico
rpm Rotações por Minuto
RPMI *Roswell Park Memorial Institute Medium*
SCC Carcinoma de células escamosas
SFB Soro Fetal Bovino
TB *Terrific Broth*
TBS *Tris-buffered Saline*
TNF Fator de Necrose Tumoral
TRAF Fatores associados ao Receptor de TNF
Treg Células T Regulatórias
TU Unidades de Transformação
VEGF *Vascular Endothelial Growth Factor*
 α Alfa
 β Beta
 γ Gama
 μ Mu
 ν Nu
 χ^2 Qui-quadrado

RESUMO

Grazia GA. *Caracterização de um peptídeo selecionado por Phage Display com atividade anti-tumoral [tese]*. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2022.

A relação entre infecção persistente de papilomavírus humano (HPV) de alto risco e o desenvolvimento de certos tipos de câncer está bem estabelecida. No entanto, alternativas terapêuticas para infecções e tumores causados por esses vírus são limitadas. Anteriormente, nosso grupo encontrou motivos peptídicos, a partir de um *immunescreening* de uma biblioteca de *Phage display* heptapeptídica circular baseada no fago M13, utilizando soros de participantes positivas para HPV provenientes de um estudo prospectivo de HPV e neoplasia cervical. Quatro peptídeos enriquecidos foram encontrados e, um deles, PEP1, foi selecionado para estudos posteriores. As imunizações de camundongos portadores de tumor HPV-16 positivo (linhagem celular TC-1) realizadas com o fago recombinante PEP1 (ØPEP1) resultou em redução do crescimento do tumor, onde essa redução foi associada a células T CD8 (SULAIMAN, 2017). Buscando caracterizar o mecanismo subjacente à atividade anti-tumoral observada, verificamos que ØPEP1 não se liga a linhagens celulares derivadas de tumores do colo uterino HPV positivas (SiHa e HeLa), mas possui a capacidade de se ligar a soros e plasmas derivados de mulheres com esfregaços de cérvix uterina HPV positivos e HPV negativos. A análise da sequência heptapeptídica de PEP1 mostrou que sua sequência é encontrada no CD40 humano, sugerindo que PEP1 poderia atuar como um mimotopo de CD40. Utilizando ferramentas de bioinformática, avaliamos o perfil de expressão de CD40 em tumores da cérvix uterina, onde verificamos que a expressão de CD40 é maior em carcinomas escamosos do colo do útero, quando comparado aos adenocarcinomas do colo uterino, carcinomas mucinosos e carcinomas endometrióides, estando associado a um melhor prognóstico. Em amostras de câncer da cérvix uterina, verificamos coincidência no padrão de marcação por imunohistoquímica entre ØPEP1 e CD40. A hipótese de que PEP1 poderia atuar como um mimotopo de CD40 foi testada em linhagens celulares que expressam o ligante de CD40 (CD40L), observando-se ligação específica do fago recombinante. A especificidade de ligação de ØPEP1 foi verificada por ensaios de competição com o anticorpo anti-CD40L. Em conjunto, esses dados sugerem que ØPEP1 pode atuar como mimotopo de CD40.

Descritores: Neoplasia; HPV; Biblioteca de bacteriófagos; Peptídeos; Mimotopo; CD40; Phage Display; Câncer do colo do útero.

ABSTRACT

Grazia GA. *Characterization of a phage-display selected peptide with antitumor activity [Thesis]*. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2022.

The relationship between persistent high-risk human papillomavirus (HPV) infection and the development of certain types of cancer is well established. However, therapeutic alternatives for infections and tumors caused by these viruses are limited. Previously, our group found peptide motifs from an immunoscreening of a M13 phage-based circular heptapeptide Phage display library using sera from HPV-positive participants from a prospective study of HPV and cervical neoplasia. Four enriched peptides were found and one of them, PEP1, was selected for further studies. Immunizations of mice bearing HPV-16 positive tumor (TC-1 cell line) performed with the recombinant phage PEP1 (ØPEP1) resulted in reduced tumor growth, where this reduction was associated with CD8 T cells (SULAIMAN, 2017). To characterize the mechanism underlying the observed anti-tumor activity, we verified that ØPEP1 does not bind to HPV positive cervical cancer cell lines (SiHa and HeLa), but has the ability to bind to sera and plasmas derived from women with HPV positive and HPV negative cervix smears. Analysis of the heptapeptide sequence of PEP1 showed that its sequence is found on human CD40, suggesting that PEP1 could act as a mimotope of CD40. Using bioinformatics tools, we evaluated the CD40 expression profile in uterine cervix tumors, where we found that CD40 expression is higher in cervical squamous cell carcinomas, when compared to cervical adenocarcinomas, mucinous carcinomas and to endometrioid carcinomas, being associated with a better prognosis. In cervical cancer samples, we found a coincidence in the immunohistochemical staining between ØPEP1 and CD40. The hypothesis that PEP1 could act as a mimotope of CD40 was tested in cell lines that express the CD40 ligand (CD40L), observing specific binding of the recombinant phage. The specificity of ØPEP1 was verified by competition assays using anti-CD40L antibody. Together, these data suggest that ØPEP1 could act as a mimotope of CD40.

Descriptors: Neoplasm; HPV; Bacteriophage library; Peptides; Mimotope; CD40; Phage Display; Cervical cancer.

1. INTRODUÇÃO

Sabe-se que o câncer é a principal causa de morte no mundo todo, tendo grande influência nas taxas de expectativa de vida (SUNG *et al.*, 2021). Por se tratar de uma doença complexa, muitas alterações são acumuladas ao longo de seu processo de progressão, onde os tumores apresentarão distintas subpopulações celulares, se tornando cada vez mais heterogêneos (DAGOGO-JACK & SHAW, 2018). Um ponto a se levar em consideração é a massa tumoral. É descrito que esta é constituída por diversas células infiltrantes não tumorais (que são dependentes da origem e tipo de tumor), como é o caso de fibroblastos, secretados do sistema imune, proteínas de matriz celular, entre outros (WAINSTEIN *et al.*, 2017).

Quando analisamos os tumores e seus microambientes, observamos que suas relações são muito importantes para que os processos de iniciação e progressão ocorram, como também, irão auxiliar no prognóstico e fornecer informações para desenvolvermos tratamentos com melhor taxa de resposta. Em relação aos tratamentos, alguns são desenvolvidos especificamente para determinados alvos, onde podemos encontrar tratamentos direcionados a receptores celulares, bloqueadores de *checkpoint*, etc (WAINSTEIN *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2017). Sabemos que o microambiente tumoral, por ser complexo e diverso, faz com que os diferentes tipos de câncer apresentem características variadas. Como consequência, haverá uma heterogeneidade nesse microambiente, em um mesmo indivíduo e em um mesmo tumor. Esse dado indica, por exemplo, o porquê podemos obter diferentes resultados nos tratamentos de imunoterapias (SCHREIBER *et al.*, 2011).

Além do microambiente, também devemos levar em consideração a atuação do sistema imune. Este exerce um papel polarizado no câncer, já que pode ajudar no controle do desenvolvimento da doença, onde consegue inibir o crescimento das células tumorais e eliminá-las, como também, pode promover a progressão do câncer, devido à instabilidade celular e o acúmulo de alterações (SCHREIBER *et al.*, 2011).

Diante disso, mesmo com muitos avanços conquistados na área de pesquisa sobre o câncer, muito ainda precisa ser compreendido, para que possamos obter novos marcadores e desenvolvermos novas opções terapêuticas.

1.1 CÂNCER DO COLO UTERINO

1.1.1 Epidemiologia, fatores de risco

O câncer do colo do útero é o quarto tipo de câncer que mais acomete mulheres em todo o mundo, com aproximadamente de 570.000 novos casos e 311.000 mortes, onde 85% dos casos estão em países em desenvolvimento. Este tipo tumoral é associado à infecção persistente por tipos de HPV (papilomavírus humano) de alto risco. Além disso, outros cânceres como cabeça e pescoço, vulva, vagina, ânus e pênis também estão associados à infecção por esse vírus (WHO,

2022; WOODMAN *et al.*, 2007). No Brasil, o câncer do colo do útero é o terceiro mais prevalente e o quarto tipo de câncer a causar morte entre mulheres, onde no ano de 2020, foram estimados 16.710 novos casos, o que representa um risco considerado de 15,38 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2021).

Para a saúde pública, o câncer do colo uterino é uma prioridade (BOSCH, 2013). Para que haja o desenvolvimento deste tipo de tumor, necessita-se da associação de diferentes fatores de risco como, por exemplo, a atividade sexual precoce, tabagismo, uso de contraceptivos orais, imunossupressão, infecção pelo HPV, entre outros. É descrito na literatura que a infecção por HPV é um fator determinante para o desenvolvimento da neoplasia da cérvix uterina (SCHIFFMAN *et al.*, 1997; FRANCO *et al.*, 1999; FRANCO *et al.*, 2001; IARC, 2007), sendo virtualmente associada aos tumores de colo uterino 100 % dos casos (PLUMMER *et al.*, 2016).

1.1.2 Associação entre HPV e câncer do colo do útero

Ao longo dos anos, a história natural do câncer do colo uterino foi bem estudada, sendo a infecção persistente por certos tipos de HPV relatada como um fator causal necessário para a sua ocorrência. Mesmo que a maior parte das infecções pelo HPV seja transiente e não possua DNA detectável após um período de 1 a 2 anos, existe um número pequeno de mulheres que apresenta infecção persistente, onde a presença de um mesmo tipo de HPV pode ser detectada por um determinado tempo. São essas mulheres que apresentarão maiores riscos de desenvolvimento de neoplasias cervicais, em comparação àquelas que conseguiram eliminar a infecção pelo HPV (SCHLECHT *et al.*, 2001; IARC, 2007; DE SANJOSÉ, *et al.*, 2018). Geralmente, a infecção por HPV ocorre em mulheres mais jovens, na faixa etária entre 18 e 30 anos (OKUNADE, 2020), com uma progressão lenta para o câncer do colo do útero em idade mais avançada (44 anos ou mais; ARBYN *et al.*, 2020).

O câncer do colo do útero se desenvolverá a partir da progressão contínua de lesões precursoras de caráter não invasivo (figura 1). Tanto a detecção, quanto a caracterização dessas lesões, podem ser realizadas a partir de exames citológicos e histopatológicos. Essas lesões precursoras, na ausência de tratamento, podem evoluir dando origem a neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC). As NIC podem ser classificadas em:

- NIC I – displasia leve
- NIC II – displasia moderada
- NIC III – carcinoma *in situ*, que se caracteriza uma displasia severa, onde pode haver evolução para um carcinoma invasivo derivado de células epidermóides / carcinoma escamoso invasivo (SCC).

- Atualmente as lesões NIC II e NIC III são classificadas como lesões de alto grau, em conjunto, pois a distinção histológica entre os dois graus de NIC é pouco reprodutível e ambos os graus, possuem um risco aumentado de progressão para o câncer.

Além disso, casos onde ocorrem alterações no epitélio glandular, diante da ação do HPV ou de outros fatores associados a esse tipo tumoral, estão relacionados ao desenvolvimento de um adenocarcinoma (ZUR HAUSEN, 2002; BRUNI *et al.*, 2021; BOON *et al.*, 2022; IARC, 2022).

Existe, também, outra classificação utilizada no exame citológico de esfregaços cervicais, o sistema *Bethesda*. Nele, emprega-se outra terminologia para as lesões precursoras, como células escamosas atípicas de significado indeterminado, conhecidas como ASCUS, lesões intraepiteliais escamosas, que consiste em baixo grau, lesão intraepitelial de baixo grau (LSIL), ou também, denominada como displasia leve e, o alto grau, HSIL (lesão intraepitelial escamosa de alto grau) ou displasia moderada, severa ou carcinoma *in situ* (SOLOMON *et al.*, 2002; NAYAR & WILBUR, 2017).

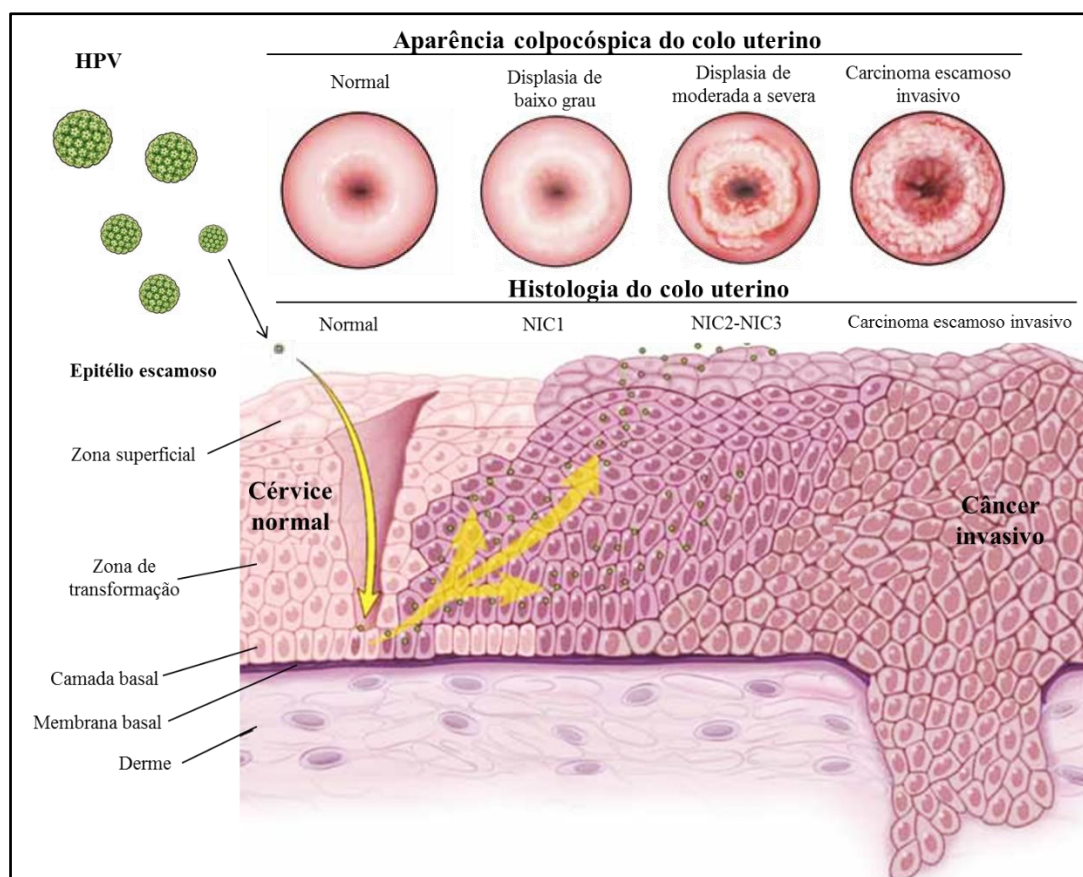


Figura 1. Representação esquemática do processo carcinogênico mediado por HPV e suas alterações celulares. Inicialmente ocorrerá a infecção do epitélio metaplásico, principalmente na zona de transformação do colo uterino, pelo HPV (por um ou mais tipos). Quando a infecção pelo vírus não é eliminada, haverá um quadro de persistência, com progressão clonal do epitélio infectado e com formação de lesões pré-cancerosas e processo de invasão. FONTE: Adaptado de JIN *et al.*, 2011.

Importante dizer que quanto mais conhecermos sobre os fatores relacionados à persistência da infecção causada pelo HPV, mais contribuiremos para a identificação de mulheres que possuem um risco aumentado em desenvolver uma neoplasia de caráter maligno da cérvice

uterina. Encontramos na literatura, diferentes trabalhos com enfoque na identificação de marcadores que apontem casos de infecção persistente e, também, daqueles que apresentam maiores chances de se desenvolver uma lesão precursora ou câncer de fato (HERRERO *et al.*, 2000; SCHLECHT *et al.*, 2001; ANDRALOJC *et al.*, 2021; TAVAKOLI *et al.*, 2021).

1.2 PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)

1.2.1 Características e organização do genoma

Os HPV são pequenos vírus não envelopados, de formato icosaédrico, com cerca de 55 nm e 360 cópias organizadas em 72 pentâmeros (figura 2; ICTV, 2011; VAN DOORSLAER *et al.*, 2018). São vírus espécie-específicos, apresentando tropismo por células cutâneas ou mucosas dos epitélios (LÖRINCZ *et al.*, 1992; ZUR HAUSEN 1996).

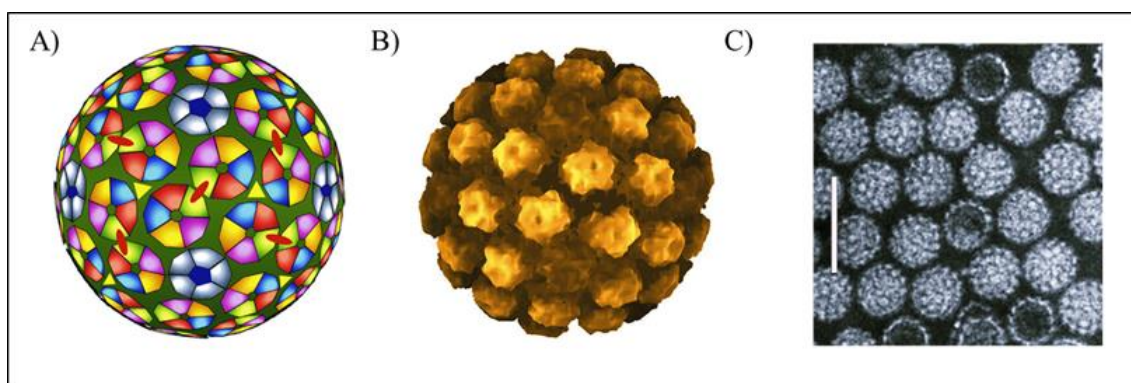


Figura 2. Papilomavírus humano (HPV). A) representação esquemática ilustrando os 72 capsômeros do HPV B) renderização atômica de um capsídeo proveniente da reconstrução de imagem obtida por criomicroscopia eletrônica do HPV16. A renderização é um processo de obtenção de imagens digitais resultantes de modelos tridimensionais a partir de *softwares* específicos (CHOUHAN *et al.*, 2022) C) imagem de micrografia eletrônica de contraste negativo do HPV - barra 100 nm. FONTE: Adaptado de *Papillomaviridae – dsDNA viruses*, *International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)*, 2011.

Os HPV são vírus que possuem dupla fita de DNA com um genoma de aproximadamente 8000 pares de base, o qual é dividido em três regiões distintas, precoce (*early*), tardia (*late*) e região não codificadora (LCR ou URR), conforme figura 3. A região precoce da maioria dos HPV possui genes (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) que são responsáveis pela codificação de proteínas importantes para o ciclo de replicação do vírus, controle de sua transcrição e pela transformação da célula. A região tardia é responsável por codificar as proteínas tardias L1 e L2 do capsídeo e a LCR possui elementos necessários para o controle de replicação e transcrição do DNA viral (FERREIRA *et al.*, 2020).

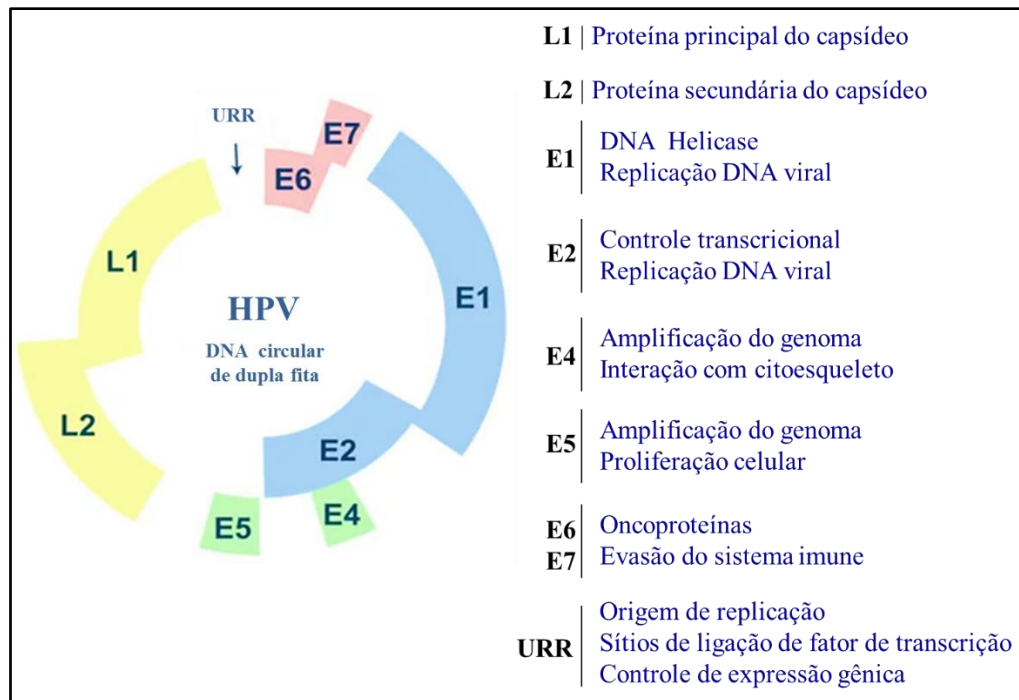


Figura 3. Organização do genoma do HPV e funções principais das proteínas virais. FONTE: Adaptado de FERREIRA *et al.*, 2020.

1.2.2 Taxonomia e classificação

Os HPV são pertencentes à família *Papillomaviridae*, onde são agrupados em 5 gêneros: alfa-papilomavírus (α -HPV), beta-papilomavírus (β - HPV), gamma-papilomavírus (γ -HPV), mu-papilomavírus (μ -HPV) e nu-papilomavírus (ν -HPV) como mostra a figura 4. Essa classificação é feita a partir das diferenças encontradas na sequência de DNA na porção do gene L1. Um novo tipo de HPV é considerado quando a sequência nucleotídica difere em 10 % comparado àqueles tipos de HPV previamente descritos (IARC, 2007; BERNARD *et al.*, 2010; DOORBAR *et al.*, 2015).

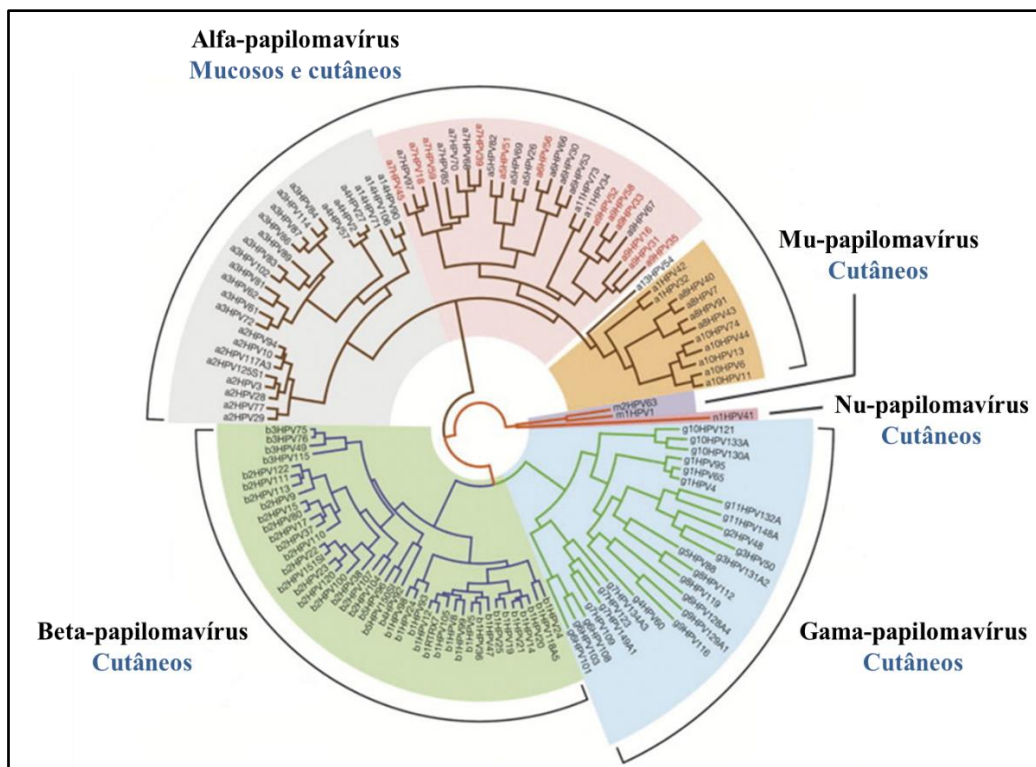


Figura 4. Classificação dos HPV. Os tipos de HPV encontrados são distribuídos em cinco gêneros diferentes: alfa-papilomavírus (α -HPV), beta-papilomavírus (β -HPV), gamma-papilomavírus (γ -HPV), mu-papilomavírus (μ -HPV) e nu-papilomavírus (ν -HPV). Os tipos contidos nos α -HPVs são classificados como cutâneos de baixo risco oncogênico (cinza), mucosos de baixo risco oncogênico (amarelo-alaranjado) e mucosos de alto risco oncogênico (rosa). FONTE: Adaptado de DOORBAR *et al.*, 2015.

Dados atuais mostram que mais de 200 genótipos de HPV já foram descritos (MIRABELLO *et al.*, 2018; PAPILOMAVIRUS EPISTEME, 2022), sendo que esses HPV, conforme já mencionado, são classificados conforme sua sequência de DNA. No que se refere aos HPV mucosos, estes podem ser divididos em baixo e alto risco (tabela 1), sendo os de baixo risco, relacionados a lesões benignas, como é o caso das verrugas e condilomas. Já os HPV de alto risco, estão associados a infecções com uma maior propensão a evoluir para lesões de alto grau e, em alguns casos, câncer (ZUR HAUSEN, 2002; DE SANJOSÉ, *et al.*, 2018). A tabela 1 abaixo mostra a classificação dos HPV por risco oncogênico e suas doenças relacionadas (DE SANJOSÉ, *et al.*, 2018).

Tabela 1. Organização dos HPV de acordo com sua oncogenicidade e associação a doenças

HPV	Genótipos	Doenças relacionadas
Baixo risco	HPV 6, 11	Verrugas genitais e papilomatose respiratória recorrente
Alto risco ou oncogênico	HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59	Lesões precursoras, câncer do colo uterino, anal, vaginal, vulvar, peniano e orofaríngeo
Provavelmente oncogênicos	HPV 68	Câncer do colo uterino
Possivelmente oncogênicos	HPV 5, 8	Carcinoma escamoso de pele em pacientes com epidermodisplasia verruciforme
Possivelmente oncogênicos	HPV 26, 30, 34, 53, 66, 67, 69, 70, 73, 82, 85 e 97	Incerto

FONTE: Adaptado de DE SANJOSÉ, *et al.*, 2018.

1.2.3 Ciclo de replicação do HPV

O início do processo infeccioso do HPV ocorre quando, a partir de microlesões, onde o vírus tem acesso à camada basal do epitélio da cérvix uterina. Pode haver, como consequência, uma infecção de caráter produtivo resultando na liberação de novas partículas virais (STANLEY, 2012; DE SANJOSÉ, *et al.*, 2018). Isso ocorre, pois após o processo de infecção das células da camada basal haverá amplificação do DNA viral de maneira independente do ciclo celular, além da expressão dos oncogenes E6 e E7 ser controlada de forma rigorosa (DOORBAR *et al.*, 2012). Haverá uma intensa replicação e expressão do genoma viral ao longo da migração dos queratinócitos infectados para o compartimento de diferenciação do epitélio, o que gerará milhares de cópias virais por célula. Finalmente, nas camadas mais superficiais do epitélio, ocorrerá a montagem e liberação das partículas virais (figura 5) (WOODMAN *et al.*, 2007; KHAN, 2009; DOORBAR *et al.*, 2012).

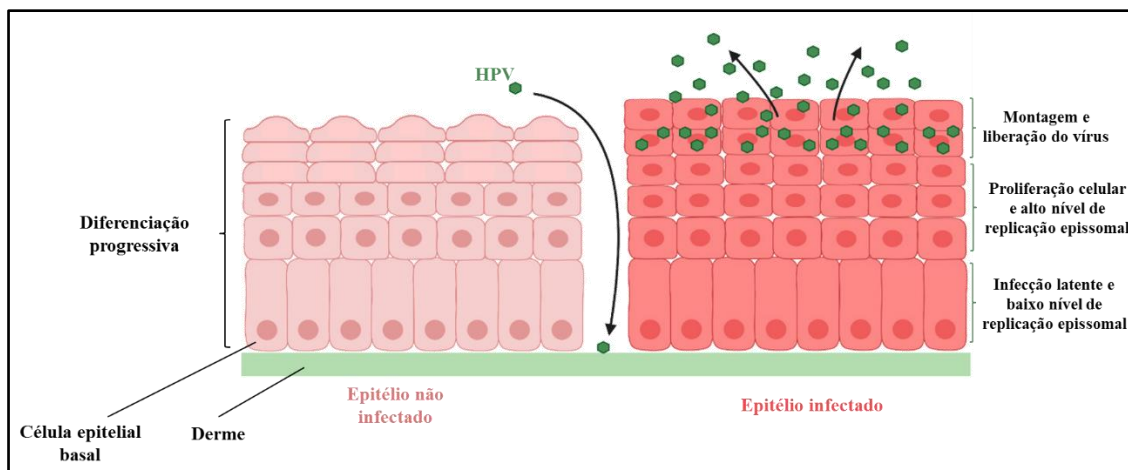


Figura 5. Ciclo de replicação do HPV. O ciclo do HPV inicia-se quando o vírus infecta as células basais do epitélio estratificado através de uma microlesão, onde o HPV se liga e entra nas células. A seguir, os genomas virais são estabelecidos no núcleo dessas células infectadas como episossomas, onde haverá expressão dos genes virais precoces (E1, E2, E6 e E7) e a rápida amplificação viral. Ao longo da diferenciação das células, ocorre a fase produtiva do ciclo de vida viral e as proteínas do capsídeo viral, L1 e L2, serão expressas nas camadas mais diferenciadas do epitélio, fazendo com que os vírions sejam formados e liberados. O processo infeccioso pode ter continuidade com a integração do DNA do HPV ao DNA do hospedeiro, elevando os níveis de E6 e E7. Isso faz com que haja uma proliferação indefinida dessas células, podendo resultar no desenvolvimento do câncer. FONTE: Adaptado de MAC & MOODY, 2020.

O que ocorre é que dentro do núcleo das células da camada basal, o ciclo entrará na fase de manutenção do genoma do vírus. Este será mantido no formato episossomal em um número baixo e estável de cópias e sua amplificação, associada à diferenciação celular (MOODY & LAIMINS, 2010). A seguir, a transcrição dos genes precoces E1 e E2 é necessária, para a utilização da maquinaria de replicação celular. Na camada basal do epitélio, a proteína E2 exercerá diferentes funções importantes na replicação e segregação genômica viral, além do controle de transcrição gênica precoce (STENLUND, 2003; DOORBAR, 2006).

Apesar das proteínas E1 e E2 do HPV serem muito importantes tanto na manutenção, quanto no processo de amplificação do episossomo, as oncoproteínas E6 e E7 potencializam o processo de replicação viral, havendo então, a proliferação e divisão celular da camada basal (DOORBAR *et al.*, 2012). No momento em que as células infectadas começam a se dividir e migrar para as camadas superiores do epitélio, a expressão de fatores necessários para a replicação do genoma viral é diminuída e, as proteínas E5, E6 e E7 irão manter a atividade replicativa do vírus por meio de diferentes interações com proteínas da célula do hospedeiro (JOHANSSON & SCHWARTS, 2013).

Essas interações incluem, a atuação da proteína E5. Essa proteína interage com *epidermal growth factor* (EGF), aumentando a atividade proliferativa das células, como também, por interagir com os receptores HLA (*Human leukocyte antigen*), promoverá o escape imunológico (CRUSIUS *et al.*, 2000). No caso da oncoproteína E6, podemos citar sua atividade anti-apoptótica, interagindo com a proteína supressora de tumor p53. Quando de alto risco, a

oncoproteína E6 promoverá a ubiquitinação e degradação de p53 eficientemente, efeito este não observado em E6 de baixo risco (DOORBAR, 2006). Existem, também, outros fatores que interagem com a proteína E6, como é o caso de E6AP (E6-associated protein), TNFR1 (*Tumor necrosis factor receptor 1*), caspase 8, IRF3 (*Interferon regulatory factor 3*), entre outros. Como consequência, a diferenciação e transcrição em queratinócitos será afetada, a telomerase será ativada e a apoptose inibida, atuando complementarmente às funções desempenhadas pela oncoproteína E7 (HOWIE *et al.*, 2009).

Em relação à oncoproteína E7 de alto risco, ela interage com as formas hipofosforiladas das proteínas p105, p107 e p130, membros da família do retinoblastoma (pRB), fazendo com que sejam degradadas. Tanto a proteína p105 quanto a proteína p107 são responsáveis pela entrada no ciclo celular, enquanto que a proteína p130 coordena a reentrada no ciclo celular nas camadas mais diferenciadas do epitélio. Em decorrência disso, haverá a liberação de fatores de transcrição da família E2F, além de E7 também estar envolvida na manutenção da atividade dos complexos ciclina E-Cdk2 e ciclina A-Cdk2 em células diferenciadas, devido à sua interação (MÜNGER *et al.*, 2004; MOODY & LAIMINS, 2010).

No caso da proteína E4, ela estará envolvida no processo de amplificação do genoma e formação de novos vírions, onde sua expressão aumentada ao longo da replicação viral, aponta funções extras na liberação, quanto na transmissão viral. Conforme mencionado anteriormente, o ciclo do HPV chega à sua conclusão nas camadas mais superficiais do epitélio, nas quais são produzidos os vírions maduros (DOORBAR, 2013). Dessa forma, precisa-se inibir a expressão das oncoproteínas E6 e E7, já que tanto a montagem, quanto a liberação das partículas virais são dependentes do processo de diferenciação celular. Devido ao acúmulo de E2, E6 e E7 serão inibidas e L1 e L2 expressas, gerando o empacotamento e montagem das partículas infecciosas (DOORBAR, 2006). Contudo, é importante ressaltar que durante a progressão do tumor, as oncoproteínas de HPV de alto risco E6 e E7 possuem uma função importante, já que a presença de uma infecção persistente ocasionará um maior acúmulo de mutações que levam ao desenvolvimento do câncer. Além disso, ao longo do processo de desenvolvimento das lesões precursoras até o câncer, o genoma viral integra-se ao da célula infectada, gerando perda ou interrupção do gene E2, com consequente desregulação e aumento da expressão de E6 e E7 (VON KNEBEL DOEBERITZ, 2002).

Em resumo, o ciclo do HPV acontece em um período de 2 a 3 semanas, tempo similar ao de estratificação do epitélio (STANLEY, 2010). Durante esse processo, o vírus consegue se adaptar ao hospedeiro causando, normalmente, infecções assintomáticas, onde a persistência viral, em sua maioria, costuma ser em torno um ano (período considerável para ocorrer transmissão para outros hospedeiros, mas não tão longo para causar neoplasias) (VINOKUROVA, 2008; CHOW *et al.*, 2013).

1.2.4 Potencial oncogênico e integração viral

Uma neoplasia gerada pelo HPV origina-se em indivíduos que não conseguem eliminar este vírus, sendo que esse processo engloba mudanças de caráter genético e epigenético. Como consequência, proto-oncogenes serão ativados e genes supressores de tumor, inativados (DOORBAR, 2006; BODILY & LAIMINS, 2011; GUPTA & MANIA-PRAMANIK, 2019). A persistência da infecção e o processo de evasão viral do sistema imune, também são de extrema importância na carcinogênese. Essa evasão do sistema imune possui complexidade e envolverá a modulação da sinalização, bem como o reconhecimento de citocinas (ZHANG *et al.*, 2003; DISBROW *et al.*, 2005; ASHRAFI, 2006; CROSBIE *et al.*, 2013; DE FREITAS *et al.*, 2017).

Por interagirem diretamente com importantes produtos de genes supressores de tumor, as proteínas E6 e E7 desempenharão funções importantes. Essa versatilidade de E6 e E7 chama a atenção, já que é resultante da relação bem adaptada entre o HPV e o hospedeiro. Além do que já se conhece sobre os papéis de E6 e E7 (degradação de p53 e proteínas do retinoblastoma, respectivamente), estudos indicam que mudanças em outras vias causadas por essas oncoproteínas são, também, significativas no processo oncogênico (MOODY & LAIMINS, 2010; MESRI, *et al.*, 2014; GUPTA & MANIA-PRAMANIK, 2019).

Diferentes trabalhos mostram a associação entre o processo de integração do genoma viral com o desenvolvimento das lesões precursoras. As lesões que são consideradas de baixo grau, apresentam o DNA HPV na forma episossomal (preferencialmente), ao passo que, nas lesões consideradas de alto grau, como NIC3, que incluem o carcinoma *in situ*, de maneira predominante, o DNA viral será encontrado integrado aos cromossomos do hospedeiro (PEITSARO *et al.*, 2002; YU *et al.*, 2005; IARC, 2007; GROVES & COLEMAN, 2015).

Ao longo do processo de integração, o DNA do vírus é quebrado para que possa se integrar ao genoma do hospedeiro, mudando de sua forma episossomal/circular para o formato integrado/linear. A ruptura do genoma do HPV se dá, geralmente, próximo ao gene E2, interferindo na expressão do gene viral e na do genoma celular (PETT *et al.*, 2004; MOODY & LAIMINS, 2010). Como consequência, os níveis de E6 e E7 e a atividade imortalizadora do vírus aumentam (PETT *et al.*, 2004; DOORBAR, 2006; CHAIWONGKOT *et al.*, 2012).

1.3 HPV E RESPOSTA IMUNE

Mesmo sabendo que as infecções virais podem ser altamente imunogênicas, no caso do HPV, por ele se replicar muito lentamente (quando comparado a outros vírus), possuirá mecanismos de evasão da resposta imune que vão favorecer o estabelecimento de uma infecção persistente, contribuindo para que o ciclo de replicação viral se complete (STEINBACH & RIEMER, 2018). O controle da infecção pelo HPV está associado aos sistemas imunes inato e adaptativo, a partir da atividade de quimiocinas e citocinas, células imunes inatas, células T e anticorpos. Mesmo que as infecções pelo HPV possam persistir por um período considerável

(média de 1,5 anos), em sua maioria, regridem de maneira espontânea. Porém, existe uma parcela menor das mulheres não elimina completamente as células infectadas pelo vírus, contribuindo, então, para que seja estabelecida uma infecção persistente pelo HPV de alto risco, constituindo um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de lesões malignas (SCHLECHT *et al.*, 2001; STANLEY, 2012).

A imunidade celular possui um papel muito importante, pois é a principal forma de combate às infecções intracelulares. Isso ocorre devido à interação entre diversos tipos de células imunocompetentes (células apresentadoras de antígenos (APC), linfócitos CD4 e CD8 e células *Natural Killer* (NK); ABBAS & LICHTMAN, 2010). Entre as APC, encontramos as células de *Langerhans* (LC), que são extremamente especializadas e possuem maior acesso ao epitélio, conseguindo identificar a produção das proteínas virais. No caso das células dendríticas (DC) e dos macrófagos (que se concentram na derme), possuem um acesso mais restrito ao vírus, uma vez que o ciclo de replicação é epitélio-dependente (SASAGAWA *et al.*, 2012).

Os queratinócitos são alvos da infecção pelo HPV e são classificados como células imunes não profissionais, uma vez que produzem diversas citocinas importantes. No entanto, certos mecanismos de evasão do HPV podem levar a uma diminuição da ativação da resposta imune pelas LC e da expressão de E-caderinas, culminando na redução de LC no epitélio (FAUSCH *et al.*, 2005; LEONG *et al.*, 2010; SASAGAWA *et al.*, 2012). Outro ponto importante é que as APC migram até os linfonodos proporcionando a apresentação dos antígenos virais através do MHC II, a diferenciação de linfócitos TCD4+ em linfócitos T *helper* (Th) e a ativação da resposta imune adaptativa. Conseqüentemente, os linfócitos Th ativados se diferenciarão em Th1 ou Th2 sendo associados à resposta imune celular ou humoral, respectivamente. Vai haver, também, a ativação das DC e macrófagos a partir da ligação de componentes virais (como DNA de fita simples, RNA ou motivos CpG) aos receptores TLR (*Toll like receptors*), o que estimulará expressão de genes e produção de citocinas inflamatórias como as interleucinas (IL1, IL6, IL12 e IL18) e o fator de necrose tumoral (TNF), que são essenciais para a resposta adaptativa (SASAGAWA *et al.*, 2012). Adicionalmente, os linfócitos TCD8+, ativados via MHC I, a partir das mesmas DC, diferenciam-se em linfócitos citotóxicos (CTL). Estes, na presença de IL2, IL12 e INF- γ se tornarão células T efetoras com capacidade de eliminar células expressando antígenos do HPV, inclusive tumorais (SASAGAWA *et al.*, 2012; BASHAW *et al.*, 2017).

Por sua vez, a resposta imune humoral direcionada contra o HPV engloba o estímulo de células B, interagindo com células Th2 via CD40 e com ação de citocinas. Essas células B vão se diferenciar em plasmócitos, produzindo anticorpos contra proteínas do HPV. Porém, após a infecção natural pelo HPV, são encontrados baixos níveis de anticorpos produzidos, não sendo detectáveis em todos os indivíduos (DELIGEOROGLOU *et al.*, 2013; GUTIERREZ-XICOTENCATL *et al.*, 2016). Dados publicados indicam que o HPV modula a produção de citocinas relacionadas a polarização Th1/Th2 da resposta imune. Ao que parece, existe um

predomínio da resposta Th2 no início das lesões relacionadas ao HPV, juntamente com a diminuição de respostas Th1 mediadas por IFN, que levará a um favorecimento do processo de persistência e de progressão da doença. Nas lesões consideradas de alto grau, ambas respostas são observadas, porém de maneira não ordenada (MOERMAN-HERZOG & NAKAGAWA, 2015).

Assim como em outros tipos tumorais, os cânceres associados ao HPV têm o microambiente constituído por células e citocinas com um fenótipo imunossupressor, como é o caso de células supressoras de origem mielóide (MDSC), macrófagos associados a tumor (TAM), células T regulatórias (Treg), como também, IL10 e TGF- β (*transforming growth factor beta*; LEPIQUE *et al.*, 2009; MANTOVANI *et al.*, 2009). Deve-se levar em consideração que o microambiente tumoral é bastante complexo e que a interação entre as células imunes, tumorais e outros componentes celulares e solúveis desse microambiente promoverá alterações constantes de caráter tanto fenotípico, quanto funcional. Sendo assim, o resultado da resposta imune pode ser pró ou anti-tumoral (GRETEN & GRIVENNIKOV, 2019).

1.4 CD40 (CLUSTER OF DIFFERENTIATION 40)

Pertencente à superfamília de receptores do TNF, o CD40 ou também conhecido como TNFR5 (*tumor necrosis factor receptor superfamily member 5*), é uma glicoproteína transmembrana do tipo I, de 45-50 kDa e composta por 277 aminoácidos. É expresso em diversas APC, incluindo DC, células B e T, monócitos e macrófagos, como também, em fibroblastos, células epiteliais, endoteliais, tumorais, entre outras (LI & WANG, 2020). Seu principal ligante, CD40L (ou CD154, TRAP, T-BAM), também é da família dos receptores do TNF, e assim como o CD40, é uma proteína de membrana, do tipo II, expresso em uma diversidade de células, como células B e T, células epiteliais, fibroblastos e outras (MA & CLARK, 2009). Além disso, tanto CD40, quanto CD40L possuem formas solúveis que são originadas por clivagem proteolítica ou por *splicing* alternativo (TANG *et al.*, 2021). Importante destacar que a expressão generalizada de CD40, juntamente com a identificação de dois outros ligantes, a HSP-70 (*heat shock protein 70*) e a C4b (*C4b-binding protein*), aponta que o CD40 pode desempenhar uma função muito maior na fisiologia e doença humanas (ELIOPOULOS & YOUNG, 2004).

A interação entre CD40 e seu ligante, leva a respostas específicas nas células onde essa interação ocorre, onde comumente apresenta-se a capacidade em ativar sinalização pró-inflamatória. Dessa forma, pode haver mudança de classe e maturação de afinidade de imunoglobulinas, secreção de citocinas, bem como a sobrevivência, proliferação e adesão de células B e o desenvolvimento da geração de células B de memória e centros germinativos (van KOOTEN & BANCHEREAU, 2000; LI & WANG, 2020). Além disso, a sinalização intracelular de CD40 pode levar à apoptose muitas células transformadas tanto *in vitro*, quanto *in vivo* (LI & WANG, 2020).

O CD40 possui uma sinalização intermediada, em grande parte, por moléculas adaptadoras que se localizam à jusante, ativando vias de transdução de sinal tais como a do NF- κ B, p38/MAPK (*p38 mitogen-activated protein kinases*), JNKs (*c-Jun N-terminal kinases*), JAKs (*Janus kinases*) / transdutores de sinal e ativadores de transcrição e PI3K (*Phosphoinositide 3-kinase*; DADGOSTAR *et al.*, 2002; VONDERHEIDE, 2007) (figura 6). Por sua vez, essas vias serão responsáveis pela regulação de alterações na expressão gênica. Além disso, o CD40 auxilia e, em alguns casos, requer outros sinais extracelulares que induzem vias à jusante sobrepostas ou integram outras vias (VONDERHEIDE, 2007).

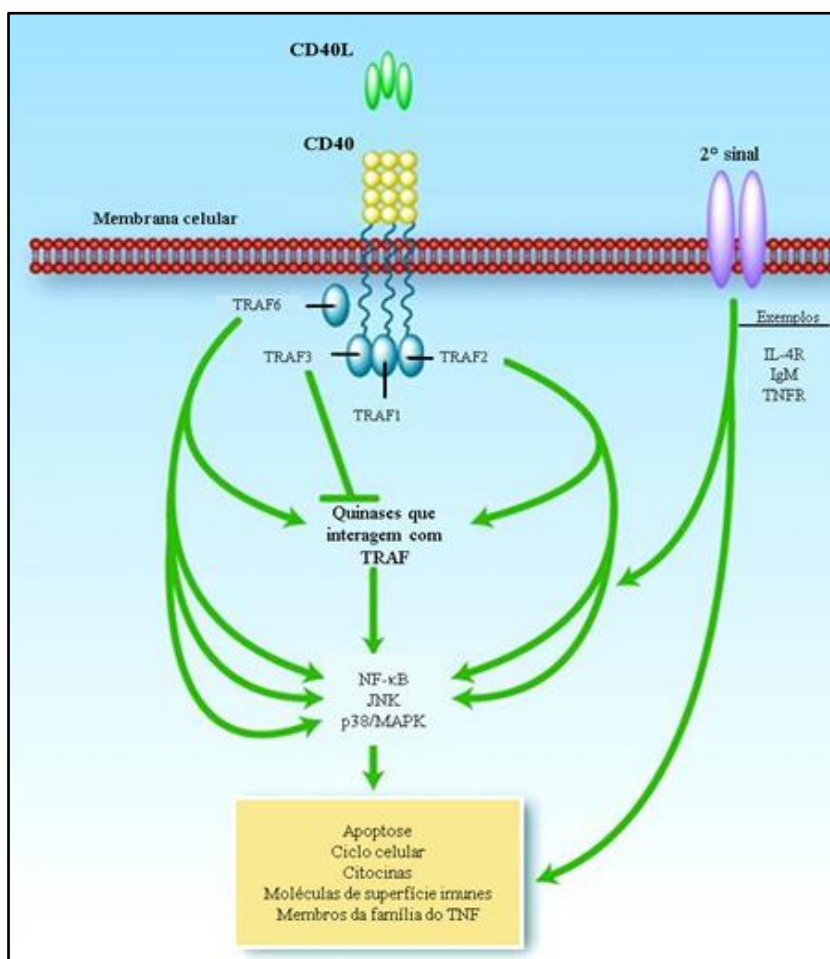


Figura 6. Via de sinalização do CD40. A ativação de CD40 desencadeia cascatas de sinalização a partir do recrutamento das TRAFs (Fatores associados ao TNFR) induzindo as vias como as de NF- κ B, p38/MAPK e JNK. Além disso, os segundos sinais extracelulares contribuem com a via de sinalização de CD40, estimulando respostas sobrepostas ou podendo desencadear outras. FONTE: Adaptado de VONDERHEIDE, 2007.

A associação entre câncer e a via de CD40/CD40L têm sido feita há anos (LEDBETTER *et al.*, 1987; STAMENKOVIC *et al.*, 1989; VONDERHEIDE, 2007; ZHANG *et al.*, 2013; LI & WANG, 2020; RICHARDS *et al.*, 2020). Encontra-se na literatura diversos exemplos dessa associação com neoplasias epiteliais, linfomas não *Hodgkin*, sarcomas, melanomas, carcinomas de células de transição da bexiga e outros (SCHÖNBECK & LIBBY, 2001; VONDERHEIDE,

2007; PIECHUTTA & BERGHOFF, 2019). As interações entre CD40 e seu ligante em células tumorais parecem ser pleiotrópicas e dependentes do contexto, uma vez que essas interações podem inibir o crescimento tumoral por mecanismos imunológicos e por indução de apoptose, mas também podem estimular o crescimento tumoral através de diversas citocinas e fatores de crescimento, como IL-6 e VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*; BEREZNAYA *et al.*, 2007).

O fato é que a via de CD40 é reconhecida por ser um componente muito significativo na resposta imune antitumoral, uma vez que a principal função da via CD40/CD40L é mediada pela ligação de CD40 em APC (principalmente em DC; LOSKOG & ELIOPOULOS, 2009; LI & WANG, 2020). Quando CD40L liga-se a CD40 ativa as DC, melhorando sua capacidade de apresentar antígenos, a partir da regulação positiva da expressão de outras moléculas co-estimuladoras (por exemplo MHC classe II e CD80/86) e regulação negativa da expressão de moléculas imunossupressoras, tais como PD-L1 (*Programmed death-ligand 1*). Há, também, o desenvolvimento de um sinal de pró-sobrevivência que aumenta a liberação de várias citocinas, como as IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, além do TNF- α e IFN- γ através das DC, gerando uma resposta citotóxica ainda maior, além de prevenir a indução de tolerância imunológica. Além disso, a ligação de CD40L ao CD40 leva à ativação de macrófagos promovendo a morte das células tumorais e secreção de citocinas que intermediam a resposta pró-inflamatória e que são fundamentais para a ativação de macrófagos e função citotóxica (LI & WANG, 2020).

Também encontramos na literatura que o papel e a expressão de CD40 podem diferir entre células normais e tumorais (CHATZIGEORGIOU *et al.*, 2009; LOSKOG & ELIOPOULOS, 2009). Por exemplo, o câncer do colo uterino é um dos tumores associados à via de CD40. Testes *in vitro* mostraram que a ativação dessa via, induzida pelo CD40L em células derivadas de carcinoma de cérvix uterina HPV positivas, influencia diretamente a susceptibilidade à morte mediada por CTL e com isso, essa via proporcionaria uma nova abordagem para a terapia do câncer do colo do útero (HILL *et al.*, 2005). Além disso, também observaram que a linhagem celular HeLa (HPV18 positiva) proveniente de um adenocarcinoma de cérvix uterina, dependendo da abordagem experimental utilizada, possui diferentes padrões de expressão. Observaram que em ensaios de *Western Blot*, HeLa expressa CD40, porém, pela abordagem de citometria de fluxo, HeLa não apresentava expressão para CD40. Além disso, também verificaram que E6 de HPV de alto risco pode induzir a desregulação de CD40, envolvendo a ação de p53, podendo gerar uma instabilidade no sistema imune ao longo do processo carcinogênico induzido por HPV (MANZO-MERINO *et al.*, 2018).

Já em análises por imunohistoquímica observa-se que a expressão de CD40 em tecidos de cérvix uterina se torna mais forte no câncer, quando comparada à expressão em tecidos normais ou em lesões de baixo grau. Há, também, dados indicando casos onde a expressão de CD40 nos tumores de colo do útero é fraca ou inexistente (HILL *et al.*, 2005; PONTEN *et al.*,

2009; HUANG *et al.*, 2011). Por outro lado, encontra-se informações sobre os carcinomas de colo do útero onde comentam da possibilidade da via de CD40-CD40L facilitar a angiogênese via VEGF, resultando em progressão e metástase desse tipo tumoral. Diante disso, observamos que, principalmente em um cenário *in vivo*, a situação é mais complexa, onde a ativação da via CD40-CD40L em células epiteliais infectadas pelo HPV pode ser tanto benéfica para a vigilância imunológica do hospedeiro quanto promover a carcinogênese do HPV (SHIMAUCHI *et al.*, 2014).

1.5 HPV E VACINAS

Atualmente, as vacinas disponíveis que agem contra o HPV, têm como objetivo reduzir o efeito de sua infecção, aumentando a imunidade contra ele. Os países que implementaram a vacinação contra o HPV para jovens adolescentes (9-14 anos), em seus calendários de imunização nacionais, vêm apresentando resultados muito positivos (BRUNI *et al.*, 2021). Entretanto, é importante destacar que a profilaxia não é tão eficaz no caso de mulheres adultas ou com mais idade, as quais, provavelmente já tiveram contato com HPV antes da oportunidade de serem imunizadas, gerando uma maior necessidade da triagem citológica periódica para melhorar as chances de detecção precoce (BHAREL *et al.*, 2015; ATHANASIOU *et al.*, 2020).

Existem três vacinas licenciadas contra o HPV disponíveis, que possuem partículas semelhantes a vírus (VLPs) do epítipo de L1 expressas em sistemas recombinantes como leveduras e células de inseto: I) CervarixTM (Glaxosmithkline) contém VLPs de HPV 16 e 18; II) GardasilTM (Merck & Co.) com VLPs de HPV 6, 11, 16 e 18; III) Gardasil9TM apresenta VLPs para HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58. As vacinas GardasilTM e Gardasil9TM possuem derivados de hidróxido de alumínio como adjuvante, ao passo que a CervarixTM contém AS04 (mistura de hidróxido de alumínio e monofosforil lipídeo A) (POUYANFARD & MULLER, 2017).

Foi demonstrado que as propriedades superiores das VLPs, na indução de anticorpos, são explicadas devido à sua estrutura multimérica e a capacidade de estimular células B (BACHMANN & JENNINGS, 2010). Além disso, as vacinas profiláticas contendo VLPs HPV-L1, são muito imunogênicas, podendo evitar lesões pré-malignas cervicais ocasionadas pelos HPV16 e 18, bem como verrugas genitais induzidas pelos HPV6 e 11 (VILLA, 2011). Além disso, em países que apresentam elevada cobertura vacinal, já se observa a redução de lesões de alto grau e de carcinoma invasiva da cérvix uterina (Lei *et al.*, 2020). Dados recentes mostram, também, que a vacinação contra o HPV demonstrou ser eficaz contra infecções orais e nas alterações celulares associadas ao HPV, incluindo lesões benignas e pré-neoplásicas (KAMOLRATANAKUL *et al.*, 2021; ZHOU *et al.*, 2021). Essas vacinas profiláticas contra o HPV também possuem como alvo, a própria infecção pelo HPV, mas não são eficazes em seu tratamento (SCHILLER *et al.*, 2012).

Importante destacar que para os casos de infecção ou de lesões precursoras causados pelo HPV, ainda é necessário o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. Mesmo nos casos do câncer do colo do útero e de outros cânceres relacionados ao HPV, procedimentos cirúrgicos continuam sendo o tipo de tratamento dominante. Assim sendo, muitos estudos estão explorando tecnologias recentes para o desenvolvimento de vacinas terapêuticas. Estas, podem ser desenvolvidas tanto como tratamento convencional, quanto como adjuvante à cirurgia para obtenção de melhores resultados do tratamento e prevenção de recorrência (MO *et al.*, 2022).

Há diferentes vacinas terapêuticas contra o HPV que devem produzir melhores efeitos imunológicos, como vacinas baseadas em vetores vivos, de proteínas, de ácido nucleico e de células inteiras. Grande parte dessas vacinas, o ponto de partida é focado nos alvos antigênicos E6 e E7, que são projetados para a ativação da imunidade celular sistêmica e eliminação das células infectadas por HPV, a partir da resposta de CTL. Porém, muitas das vacinas que apresentaram resultados pré-clínicos adequados, não funcionam bem na clínica, gerando a necessidade do desenvolvimento de novas vacinas (MO *et al.*, 2022).

1.6 PHAGE DISPLAY, PEPTÍDEOS E CÂNCER

Com o progresso da química de proteínas e da biologia molecular, oportunidades em se desenvolver pesquisas que envolvem peptídeos aumentaram, onde a tecnologia do *Phage Display* foi beneficiada em consequência deste avanço (AGHEBATI-MALEK *et al.*, 2016). Desenvolvido por George Smith em 1985, o *Phage Display* se baseia em expor polipeptídeos na superfície de bacteriófagos (também conhecidos como fagos). Essa técnica permite que os polipeptídeos se apresentem fusionados a uma das proteínas da superfície do bacteriófago, permitindo com que haja interação entre esse polipeptídeo e diferentes alvos, conforme figura 7 (RAMI *et al.*, 2017). Essa metodologia proporciona a produção de grandes quantidades de peptídeos, proteínas e anticorpos (HOFFMANN *et al.*, 2010). Além disso, é importante salientar que este método provou ser eficiente na identificação de ligantes peptídicos para anticorpos, que circulam em soros humanos, relacionados a tumor (ARAP, 2010; VIDAL *et al.*, 2004).

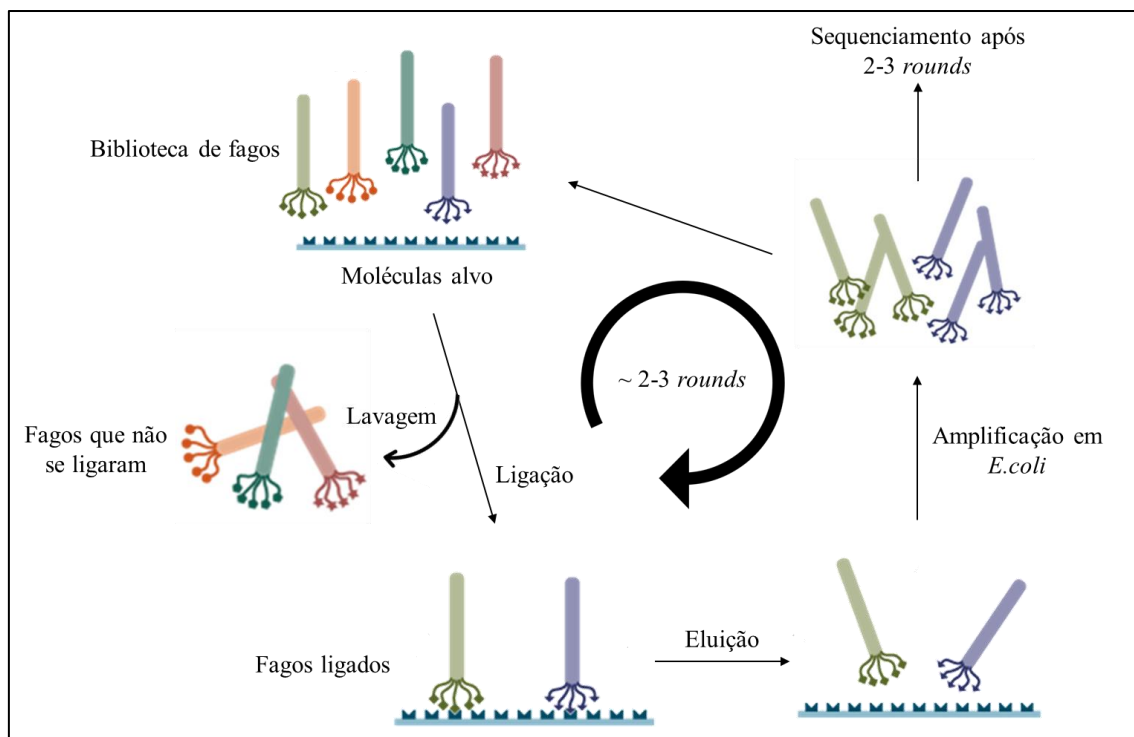


Figura 7. Representação esquemática da técnica de Phage Display. A técnica se dá a partir da incubação da biblioteca de fagos com moléculas alvo. Os fagos que não se ligam a essas moléculas são removidos a partir de lavagens e os que se ligam, são recuperados e amplificados em *E.coli* para serem submetidos a novos ciclos de seleção. FONTE: Adaptado de Ph.D.TM-12 Phage Display Peptide Library Kit - New England Biolabs[®] inc.

Os fagos filamentosos utilizados na técnica do *Phage Display* são pertencentes ao gênero *Inovirus* e infectam enterobactérias, como as *E.coli*. São fagos filamentosos da classe Ff, o fago M13 e o fd. Por possuírem habilidade replicativa e conseguirem acomodar grandes DNAs estranhos, um dos bacteriófagos filamentosos mais comumente utilizados é o fago M13 (figura 8). Este possui fita simples e circular de DNA e codifica três grupos de proteínas, conforme mostra a figura 8 B. Nesses grupos de proteínas, há aquele que engloba proteínas relacionadas à replicação, pII, pX e pV, um outro grupo que compreende proteínas morfogenéticas (pI e pIV) e um grupo composto por proteínas estruturais (pVIII, pIII, pVI, pVII e pIX; TIKUNOVA & MOROZOVA, 2009; RAMI *et al.*, 2017; LOH *et al.*, 2019).

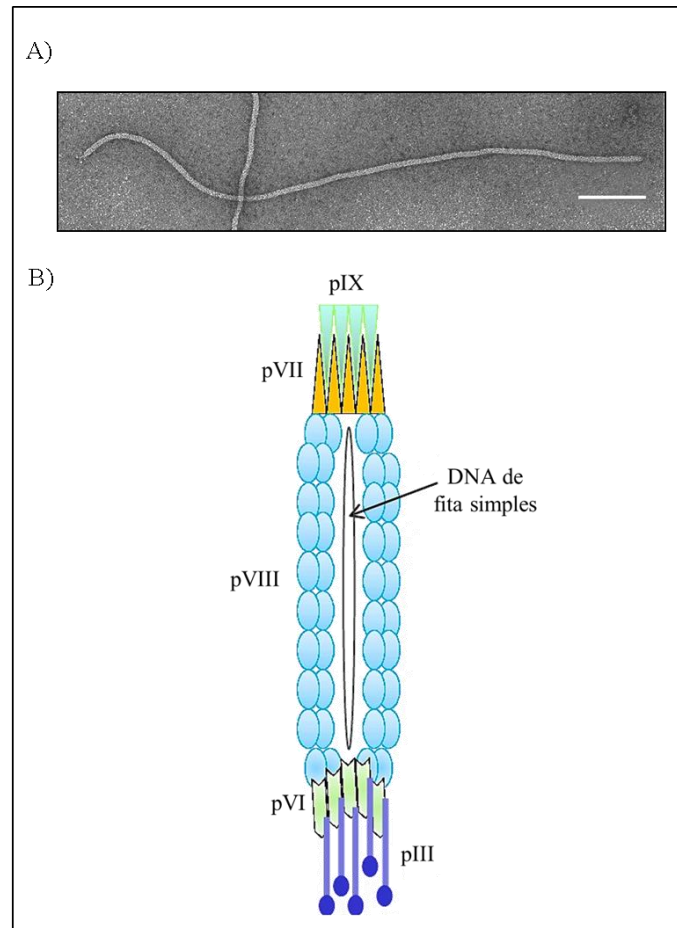


Figura 8. Bacteriófago M13. A) Microscopia eletrônica do fago filamentosso M13 e B) Representação esquemática do fago M13. O fago é composto por proteínas estruturais organizadas ao redor de uma DNA circular de fita simples, que codifica as proteínas do fago. FONTES: Adaptado de *ICTV 9th report – ssDNA viruses (2011) – Inoviridae figures* e de SIOUD, 2019, respectivamente.

O sucesso da seleção realizada por *Phage Display* vai depender da complexidade da biblioteca. Quanto maior a diversidade de clones da biblioteca, melhores as chances de se conter sequências que se ligarão a um determinado alvo com maior afinidade (NOREN & NOREN, 2001). No caso das bibliotecas de peptídeos, elas compreendem um número grande de peptídeos, entre 10^7 - 10^9 , onde suas sequências são geradas de maneira aleatória a partir de resíduos diversos de aminoácidos. Em forma linear ou circular, esses peptídeos expressos, possuem a capacidade de mimetizar tanto estruturas conformacionais, quanto epítomos (contínuos ou descontínuos; ROMANOV *et al.*, 2001; DYBWAD *et al.*, 2003; ZAMBRANO-MILA *et al.*, 2020). Na área de pesquisa sobre o câncer, o emprego desses peptídeos é interessante, pois possuem baixa toxicidade e alta especificidade em testes diagnósticos e terapêuticos, além da possibilidade da combinação com outras terapias convencionais para o tratamento do câncer, ajudando na redução de seus efeitos colaterais. Ademais, com os peptídeos há a possibilidade da criação de vacinas contra o câncer, onde os peptídeos terapêuticos são uma abordagem nova e promissora para o desenvolvimento de agentes anticâncer (CICERO *et al.*, 2017). Estes peptídeos terapêuticos podem atuar no ciclo celular, induzindo a morte da célula, as transduções de sinais, a estimulação

de elementos específicos do sistema imune, as proteínas supressoras de tumor ou a combinação destes mecanismos (MARQUIS *et al.*, 2017).

Sendo assim, a aplicação da técnica de *Phage Display* é atrativa, pois engloba áreas distintas de pesquisa médica, onde esta tecnologia proporciona a obtenção de agentes diagnósticos e terapêuticos para diferentes patologias, assim como o câncer, como também propicia o desenvolvimento de estratégias anti-angiogênicas. Esta abordagem oferece meios rápidos, eficientes e baratos para investigar interações proteína-proteína, identificar epítomos, mimotopos, etc. Desta forma, existe alta flexibilidade em explorar mecanismos relacionados às doenças e melhorar as formas de diagnósticos, além deste método estar envolvido na produção de vacinas (BAZAN *et al.*, 2012).

2 BACKGROUND DO ESTUDO E OBJETIVOS

Anteriormente nosso grupo realizou um estudo, no qual soros de mulheres HPV-positivas foram submetidos a um *immunescreening* com uma biblioteca de exibição de fagos M13 circular heptapeptídica. Esses soros derivam de um estudo prospectivo de HPV e neoplasia cervical (THE LUDWIG MCGILL COHORT; FRANCO *et al.*, 1999), do qual acompanharam mulheres assintomáticas para infecções por HPV prevalentes, incidentes e persistentes e lesões cervicais precursoras foram acompanhadas por um mínimo de 5 anos. Quatro peptídeos enriquecidos foram encontrados e um deles, PEP1, foi selecionado para estudos posteriores (VILLA, comunicação pessoal) A imunização de camundongos portadores de tumor HPV-16 positivo (linhagem celular TC-1) com este fago recombinante (ØPEP1) resultou na redução do crescimento tumoral, que foi associado a linfócitos citotóxicos T CD8 (SULAIMAN, 2017).

Diante disso, definimos como objetivo:

Caracterizar o mecanismo subjacente à atividade antitumoral observada do fago PEP1 recombinante (ØPEP1):

- através de ensaios de ligação de ØPEP1 a soros e plasmas derivados de mulheres com esfregaços de cérvix uterina HPV positivos e HPV negativos;
- através de ensaios de ligação de ØPEP1 a diferentes linhagens celulares e tecidos derivados de câncer de colo do útero;
- através da análise *in silico* da sequência heptapeptídica de PEP1 e da expressão de CD40 em câncer de colo do útero;
- através de ensaios de competição para verificar a especificidade de ØPEP1;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Construção do fago recombinante

O fago recombinante usado neste estudo é referido como ØPEP1 que foi selecionado a partir de uma biblioteca heptapeptídica de *Phage display* baseada no fago Fd-tet (Arap and Pasqualini Laboratory, MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas – USA, 2002). Em nosso estudo, como controle dos experimentos, foi utilizado o fago M13 (ØM13), que se refere ao fago Fd-tet sem qualquer inserção nucleotídica. As construções dos fagos Fd-tet e M13 são idênticas em sua estrutura, diferindo apenas em um resíduo de aminoácido. Eles são fagos filamentosos com um genoma de DNA circular de fita única.

3.2 Cultura de *E.coli* K91

Colônias únicas de *E. coli* K91 foram colhidas e semeadas em uma placa de LB ágar (*Luria Bertani agar*) contendo canamicina e incubadas a 37°C durante a noite, para formar um tapete bacteriano. Uma porção deste tapete é cultivada em meio líquido TB (*Terrific Broth*), que é então usado para propagar os bacteriófagos.

3.3 Amplificação, purificação e sequenciamento de fagos

Para gerar um volume suficiente dos fagos de controle (ØM13) e recombinante (ØPEP1), para diversos experimentos, os fagos selecionados foram amplificados em *E. coli* em meio LB (*Luria Bertani medium*) contendo canamicina e tetraciclina e incubados overnight a 37°C a 200 rpm. Em seguida, os bacteriófagos foram precipitados com PEG/NaCl e armazenados a 4°C após a determinação dos títulos de fagos expressos em unidades de transformação (TU).

3.4 Ensaios de *overlay* em membrana de nitrocelulose

3.4.1 Soros e plasmas humanos

Soros obtidos de mulheres cujos esfregaços cervicais foram positivos e negativos para HPV no estudo prospectivo para HPV Ludwig McGill (FRANCO *et al.*, 1999) e plasmas positivos e negativos para HPV obtido de pacientes do Hospital Universitário (Universidade de São Paulo - USP) e do Hospital das Clínicas (Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - FMUSP- provenientes do estudo desenvolvido por Stone SC *et al.*, 2019), foram selecionados para realizar ensaios de *overlay*. Tanto os soros, quanto os plasmas eram provenientes de mulheres assintomáticas ou que apresentavam lesões precursoras. Em membranas de nitrocelulose, 10 µL de soro ou plasma selecionados foram adicionados (não diluídos) e mantidos à temperatura ambiente por 2-3 horas. Em seguida, a membrana foi bloqueada com 5% de leite em pó em TBS-T (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05% Tween-20, pH 7,4) durante 1 hora à temperatura ambiente. As membranas foram incubadas com ØM13 ou ØPEP1 (3x10⁹ TU) em TBS à temperatura ambiente durante 1 hora, lavadas e incubadas overnight a 4° C com anticorpo anti-bacteriófago

Fd (anti Fd (α Fd) - *Sigma B7786*). Em seguida, as membranas foram lavadas, incubadas com anticorpo secundário de coelho conjugado com peroxidase, lavadas e reveladas por quimioluminescência utilizando o kit *ECLTM Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Life Sciences)* no equipamento *GE ImageQuant LAS 4000*.

3.4.2 Soro de camundongos imunizados

Os soros obtidos de camundongos C57/Black 6 imunizados com ØPEP1 ou ØM13 (SULAIMAN, 2017), foram selecionados para realizar ensaios de overlay. Em uma membrana de nitrocelulose, 7 μ L de soros selecionados foram incubados por 2-3 horas. Em seguida, a membrana foi bloqueada com 5% de leite em pó em TBS-T (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05% Tween-20, pH 7,4) durante 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo policlonal anti-CD40 (PA5-78980 - *Invitrogen*) na concentração 1:500 por 1 hora. Em seguida, as membranas foram lavadas, incubadas com anticorpo secundário de rato conjugado com peroxidase, lavadas e reveladas por quimioluminescência utilizando o kit *ECLTM Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Life Sciences)* no equipamento *GE ImageQuant LAS 4000*.

3.5 Análise por BLAST

Utilizando a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool (BLASTp)*, a sequência do peptídeo PEP1 foi analisada com o objetivo de pesquisar homologias de peptídeos.

3.6 Análise *in silico* do perfil de expressão de CD40 e CD40L

O perfil de expressão de CD40 e CD40L na população com câncer do colo do útero foi analisado utilizando-se a ferramenta *cBioPortal* ([http:// https://www.cbioportal.org/](http://https://www.cbioportal.org/)).

3.7 Imunohistoquímica

A análise de *tissue microarray* (TMA) composto por amostras de tumores de cérvix uterina foi realizada por imunohistoquímica. Essas amostras foram coletadas pelo departamento de Ginecologia do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) / Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) pela Dra. Maria Luiza Genta e foram avaliadas quanto à marcação para CD40 e para ØPEP1. Para isso, os cortes foram desparafinados em três banhos de xilol em temperatura ambiente, reidratados em banhos de etanol (100%, 95% e 70% respectivamente), seguidos de lavagem em água destilada. A recuperação antigênica foi realizada em solução de citrato de sódio 10 mM pH 6,0 por 10 min a 95°C e lavadas com PBS 1x pH 7,4. A seguir, utilizando o kit do Sistema de detecção de Polímero Novolink (*Leica Biosystems*), a peroxidase endógena foi bloqueada usando a solução *peroxidase block* por 5 minutos, seguido de incubação com a solução *protein block* por 5 minutos. As lâminas foram então incubadas ou com

anticorpo anti-CD40 humano (MAB 6322-SP - R&D) na concentração 1:100 ou com os fagos M13 ou PEP1 (contendo 3×10^9 TU), seguidos da incubação com o anticorpo anti-bacteriófago Fd (*Sigma* - B7786) na concentração de 1:2500 por 16 h a 4°C. A seguir, as lâminas foram lavadas com PBS 1x pH 7,4 e incubadas com a solução *post primary* por 30 minutos e em seguida com *Novolink polymer* do kit Sistema de detecção de Polímero Novolink (*Leica Biosystems*), por 30 minutos, lavadas com PBS 1x pH 7,4 e reveladas com cromógeno DAB.

3.8 Imunocitoquímica

3.8.1 Ensaio de ligação

As linhagens celulares derivadas de câncer de colo do útero SiHa (HPV16) e HeLa (HPV18), T47D (linhagem celular de câncer de mama) e NIH3T3CD40L (fibroblastos que superexpressam o ligante de CD40) foram cultivadas em *chamber slides* de 2 poços em meio MEM, RPMI e DMEM contendo 10% de soro fetal bovino (SFB), respectivamente. Quando as células atingiram 70% de confluência, o meio foi descartado e as células lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído (4% v / v) por 10 minutos em temperatura ambiente. Usando o kit do Sistema de detecção de Polímero Novolink (*Leica Biosystems*), a peroxidase endógena foi bloqueada usando a solução peroxidase block por 5 minutos, seguido de incubação com a solução *protein block* por 5 minutos. As células foram então incubadas com as soluções de fagos (ØM13 ou ØPEP1), contendo 3×10^9 TU, preparadas em PBS com 5% de SFB por 2 horas, seguido de lavagem com PBS 1x pH 7,4 e incubação com o anticorpo primário (anticorpo anti-bacteriófago Fd - *Sigma* - B7786) em PBS com 5% de SFB na concentração de 1: 2500, por uma hora em temperatura ambiente. Após a lavagem com PBS 1x pH 7,4, as células foram incubadas com a solução *post primary* por 30 minutos e em seguida com *Novolink polymer* do kit Sistema de detecção de Polímero Novolink (*Leica Biosystems*), por 30 minutos, lavadas com PBS 1x pH 7,4 e reveladas com cromógeno DAB.

3.8.2 Ensaio de competição

A linhagem celular NIH3T3CD40L foi cultivada *chamber slides* de 2 poços em meio DMEM contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) e quando atingiram 70% de confluência, o meio foi descartado e as células lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído (4% v/v) por 10 minutos em temperatura ambiente. Usando o kit do Sistema de detecção de Polímero Novolink (*Leica Biosystems*), a peroxidase endógena foi bloqueada usando a solução peroxidase block por 5 minutos, seguido de incubação com solução a *protein block* por 5 minutos. Para a competição, as células foram então incubadas com as soluções de fagos (ØM13 ou ØPEP1), contendo 3×10^9 TU, juntamente com o anticorpo anti-CD40L (*Invitrogen* - MA5-32619) na concentração 1:100, preparadas em PBS com 5% de SFB por 1 hora, seguido de lavagem e incubação com o anticorpo anti-bacteriófago Fd (*Sigma* - B7786) em PBS com 5% de SFB na concentração de 1: 2500, por

uma hora em temperatura ambiente. Após a lavagem, as células foram incubadas com a solução *post primary* por 30 minutos e em seguida com *Novolink polymer* do kit Sistema de detecção de Polímero Novolink (*Leica Biosystems*), por 30 minutos, lavadas e reveladas com cromógeno DAB.

Condições estabelecidas para controles de reação:

- NIH3T3CD40L apenas com anticorpo secundário (controle negativo de reação); - NIH3T3CD40L com o anticorpo anti-CD40L na concentração 1:200 (controle positivo);
- NIH3T3CD40L com os fagos M13 ou PEP1 (ambos 3×10^9 TU) seguidos de anti-Fd (1:2500); - NIH3T3CD40L incubada com o fago recombinante PEP1 (3×10^9 TU) e anticorpo irrelevante (anti-SOD2- na concentração 1:1500) e anti-Fd (1:2500);
- NIH3T3CD40L com o fago PEP1 (3×10^9 TU) e anti-CD40L (1:100);
- NIH3T3CD40L com o fago PEP1 (3×10^9 TU) e anti-CD40L (nas concentrações 1:500, 1:1000, 1:2000 e 1:5000) e anti-Fd (1:2500).

3.9 Marcação fluorescente de partículas de fago

Para realizar a análise de citometria de fluxo, os fagos M13 e PEP1 foram conjugados com FITC, conforme descrito por KASHIWAGI & SHIBA, 2008.

3.10 Citometria de fluxo

Para realizar ensaios de citometria de fluxo, as células NIH3T3CD40L, T47D, SiHa e HeLa foram cultivadas em meios DMEM, RPMI ou MEM contendo 10% de SFB, respectivamente. Quando as células atingiram 80% de confluência, o meio foi descartado e as células lavadas duas vezes com PBS e destacadas do frasco usando Gibco® *Cell Dissociation Buffer*. Em seguida, as células foram ressuspensas em meio DMEM, RPMI ou MEM contendo 10% de SFB e incubadas com fagos conjugados com FITC por 2h no *Eppendorf® Thermomixer* a 37°C e sob agitação a 300 rpm. Em seguida, as células foram centrifugadas, lavadas duas vezes com PBS, fixadas com paraformaldeído (2 % v/v) por 10 minutos em temperatura ambiente e, por fim, ressuspensas em PBS para realização do ensaio de citometria de fluxo no equipamento *Attune™ NxT Flow Cytometer (Thermo Fisher Scientific)*.

4 RESULTADOS

4.1 Amplificação, purificação e sequenciamento de fagos

Os fagos foram amplificados em bactérias e caracterizados. As inserções foram confirmadas por eletroforese em gel (figura 9) e sequenciamento.

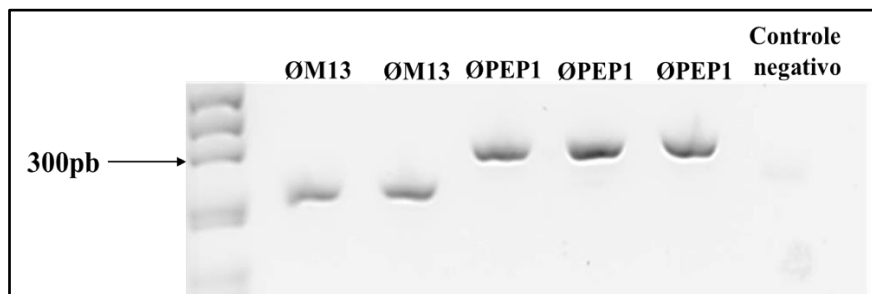


Figura 9. Eletroforese em gel de ágar da PCR amplificada de fagos de controle (ØM13) e recombinante (ØPEP1), utilizando os primers FUSE 5 forward e reverse. A banda de inserção pode ser vista em torno do marcador de 300 pb. Controle negativo: reação de PCR sem template.

4.2 O fago recombinante PEP1 não distingue soros ou plasmas de mulheres com esfregaços cervicais positivos ou negativos para HPV

Uma vez que o fago recombinante PEP1 foi selecionado por um *immunescreening* de uma biblioteca de *phage display*, verificamos se ØPEP1 poderia se ligar a soros e plasmas de mulheres expostas e não expostas ao HPV. Para isso, realizamos ensaios de *Dot blot*, onde soros não diluídos de mulheres HPV-negativas (2447-7, 0840-7, 4671-5) e HPV-positivas (5464-1) foram pipetados em membranas de nitrocelulose e incubados com os fagos M13 e PEP1, seguidos da incubação do anticorpo anti-fago (anti-Fd) (Figura 10). Não observamos ligação do fago controle, M13, às amostras de soros, mas observamos a ligação de ØPEP1, tanto nas amostras negativas, quanto positivas para HPV, indicando a possibilidade de ØPEP1 não ser HPV específico.

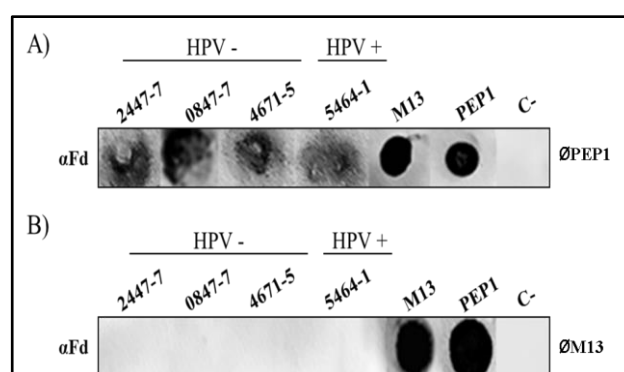


Figura 10. ØPEP1 se liga a soros derivados de mulheres com esfregaços do colo uterino HPV positivos e negativos. Soros negativos para HPV (2447-7, 0840-7, 4671-5) e positivos para HPV (5464-1) foram submetidos a ensaios de dot blot, os quais foram incubados com **A)** o fago recombinante PEP1, seguido pela incubação do anticorpo anti Fd e **B)** com o fago de controle M13, seguido pela incubação do anticorpo anti-Fd. **Controles positivos:** fagos M13 e PEP1 colocados diretamente na membrana e incubados com anti-Fd; **Controles negativos de reação:** fagos M13 e PEP1 colocados diretamente na membrana sem incubação de anti-Fd, recebendo apenas anticorpo secundário.

Diante do resultado obtido com as amostras de soro, decidimos avaliar, também, a ligação de ØPEP1 a plasmas de mulheres portadoras de lesões no colo uterino HPV positivas ou HPV negativas, por *Dot blot*. Assim como os soros, as amostras de plasma foram transferidas para membranas de nitrocelulose e incubadas com fagos e em seguida com anti-Fd. A Figura 11 mostra que ØPEP1 se liga a plasmas tanto derivados de pacientes com lesões na cérvix uterina HPV positivas ou HPV negativas. Entretanto, observa-se ligação aparentemente específica no caso dos plasmas identificados como 2 e 6.

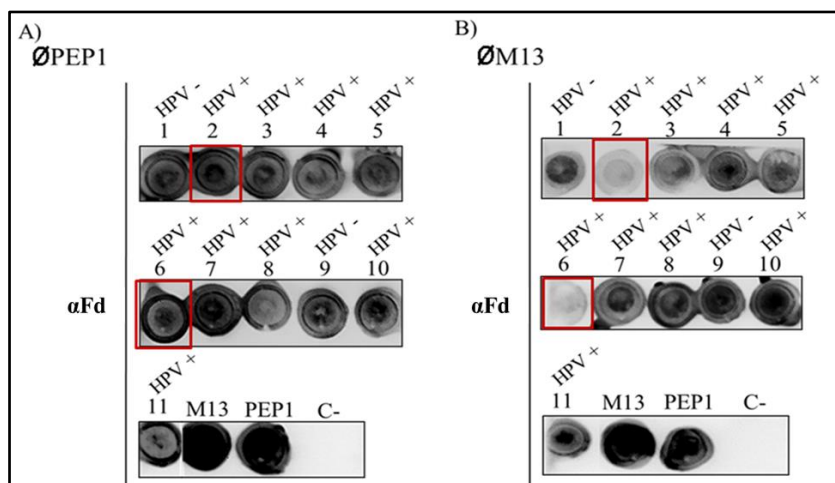


Figura 11. ØPEP1 se liga a plasmas derivados de mulheres com esfregaços do colo uterino HPV positivos e negativos. Plasmas HPV positivos (3,4,5,6,7,8,10,11) e negativos (1,9) foram submetidos a ensaios de *Dot blot*, os quais foram incubados com **A)** o fago recombinante, PEP1, seguido pela incubação do anticorpo anti -Fd. **Controles positivos:** fagos M13 e PEP1 colocados diretamente na membrana incubados com anti-Fd. **B)** com o fago de controle M13, seguido pela incubação do anticorpo anti-Fd. **Controles positivos:** fagos M13 e PEP1 colocados diretamente na membrana incubados com anti-Fd. **Controles negativos de reação (C-):** fagos M13 e PEP1 colocados diretamente na membrana sem incubação de anti-Fd, recebendo apenas anticorpo secundário.

Esse resultado, juntamente com o resultado do teste de ligação em que se utilizaram soros, mostra que a ligação de ØPEP1 pode ocorrer independentemente da presença de HPV em esfregaços ou tecidos cervicais, nos baseando nessa série diminuta de casos.

4.3 A sequência de PEP1 é encontrada no CD40 humano

Buscando compreender melhor como ØPEP1 atua, fizemos uma busca por homologias de peptídeos, a qual nos mostrou que a sequência de PEP1 é encontrada em CD40 humano (figura 12).

CD40 antigen isoform 2 precursor variant, partial [Homo sapiens]						
Sequence ID: BAD92897.1 Length: 261 Number of Matches: 1						
Range 1: 1 to 261 GenPept Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match						
Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	
514 bits(1325)	0.0	Compositional matrix adjust.	261/261(100%)	261/261(100%)	0/261(0%)	
Query 1		GRSPLRTRDRVLTNWEDGLTVAYGAVKLIQSLSLQPVGWQQNINGLSSPPTMLLPSRAQSP				60
Sbjct 1		GRSPLRTRDRVLTNWEDGLTVAYGAVKLIQSLSLQPVGWQQNINGLSSPPTMLLPSRAQSP				60
Query 61		TELPLAPLAEPTNGCSSLSSHSTRGELHLWALGLG				120
Sbjct 61		TELPLAPLAEPTNGCSSLSSHSTRGELHLWALGLG				120
Query 121		WCGQOGAGGTRGISTDPPSGKGGRAWGRDPLPREGLLRGTAAPAAGGDLTPCLSRPPTPS				180
Sbjct 121		WCGQOGAGGTRGISTDPPSGKGGRAWGRDPLPREGLLRGTAAPAAGGDLTPCLSRPPTPS				180
Query 181		RNPRRSIFPTIFLAPTLLLQCRRLYMDANRSPRRMAKRVASQCRRDSEAAPTQECGHVKG				240
Sbjct 181		RNPRRSIFPTIFLAPTLLLQCRRLYMDANRSPRRMAKRVASQCRRDSEAAPTQECGHVKG				240
Query 241		QAVGQRAWCCCCGVRVRGWH	261			
Sbjct 241		QAVGQRAWCCCCGVRVRGWH	261			

Figura 12. Sequência de PEP1 é encontrada em CD40 humano. A análise BLASTp mostrou que a sequência do peptídeo PEP1 é encontrada na variante precursora da isoforma 2 do CD40 humano. A sequência PEP1 está destacada no quadro vermelho.

Alinhando as sequências da variante precursora da isoforma 2 de CD40 (figura 12) e com a de CD40, ambas humanas, verificamos diferenças, em maior parte, no domínio intracelular e que a sequência PEP1 está localizada na porção extracelular. É importante ressaltar que, de acordo com a literatura, a ligação entre o CD40 e o ligante CD40 (CD40L) ocorre na segunda e terceira sub-regiões da porção extracelular do CD40 (Chatzigeorgiou *et al.*, 2009). A seguir, também fizemos uma análise comparando o CD40 humano e o CD40 de camundongo. Nossa pesquisa indicou que o CD40 humano e o de camundongo compartilham 62% da homologia, mas a sequência PEP1 é apenas encontrada no CD40 humano. Além disso, para complementar nossa análise, verificamos que o CD40L humano e de camundongo, compartilham a mesma sequência, diferindo apenas em um aminoácido. Com base em nossas análises, é possível que a sequência PEP1 possa estar localizada na região de interação com o CD40L. Esse dado nos indicou que PEP1 pode ser um mimotopo de CD40.

4.4 Níveis maiores de CD40 circulante são encontrados em camundongos imunizados com ØPEP1

Sabendo que CD40 é uma molécula que pode ser encontrada, também, na forma solúvel (VAN KOOTEN *et al.*, 1994; TANG *et al.*, 2021), nos perguntamos se poderíamos encontrar CD40 circulante no soro dos camundongos imunizados previamente com os fagos M13 e PEP1 (SULAIMAN, 2017). Para isso, realizamos ensaios de *Dot blot*, onde utilizamos amostras de soros de camundongos imunizados com o fago controle M13 ou com o fago recombinante PEP1 e, também, utilizamos soro de camundongos não imunizados como controle. As amostras de soros foram transferidas para membranas de nitrocelulose e incubadas com anticorpo anti-CD40.

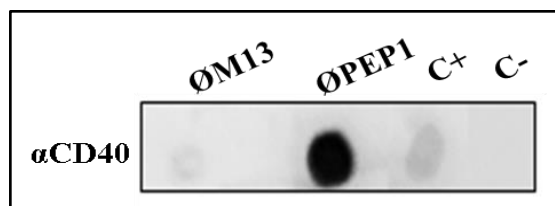


Figura 13. Camundongos imunizados com ØPEP1 possuem maiores níveis de CD40 circulante. Os soros de camundongos C57/Black 6 imunizados com os fagos PEP1 e M13 foram submetidos a ensaios de Dot Blot, os quais foram incubados com anticorpo anti-CD40. Controle positivo (C +): soros de camundongos não imunizados; Controle negativo de reação (C-): soros de camundongos não imunizados sem incubação com anti-CD40, recebendo apenas anticorpo secundário.

Nossos testes mostraram que os camundongos imunizados com ØPEP1 apresentavam maior quantidade de CD40 circulante, quando comparados aos camundongos controle (não imunizados) ou aos camundongos imunizados ØM13 (figura 13).

4.5 Câncer do colo do útero e perfil de expressão de CD40 e CD40L

Em seguida, procuramos compreender a como é a relação entre CD40 com o câncer de colo do útero. Decidimos avaliar, *in silico*, o perfil de expressão de CD40 e CD40L e seu envolvimento na população com câncer de colo do útero em níveis transcricionais, acessando dados clínico-patológicos de pacientes com câncer do colo do útero por meio da ferramenta online *cBioPortal* (CERAMI *et al.*, 2012; GAO *et al.*, 2013). O *cBioPortal* contém diferentes bancos de dados de *microarrays* e RNAseq, incluindo o projeto *TCGA Firehose Legacy*. Amostras sem quantificação de CD40 e CD40L foram excluídas do nosso estudo. Em nossa primeira análise, verificamos diferenças significativas entre o perfil de expressão de CD40, idade do paciente, tipo de câncer e estadiamento. Nenhuma diferença foi encontrada em CD40L, conforme a tabela de contingência abaixo (tabela 2).

Tabela 2. Características clínico-patológicas dos pacientes do estudo *TCGA firehose legacy*

Parâmetros	CD40				p	CD40LG				p	
	Baixa		Alta			Baixa		Alta			
	n	%	n	%		n	%	n	%		
Idade	≤50	105	55.9	83	44.1	0.011*	100	53.8	86	46.2	0.111
	>50	47	40.9	68	59.1		50	44.2	63	55.8	
Tipo de Câncer	SCC	113	44.8	139	55.2	<0.0001*	124	49.8	125	50.2	0.818
	Adeno	22	84.6	4	15.4		12	48	13	52	
	Outros	17	68	8	32		14	56	11	44	
Estadio	I/II	105	46.1	123	53.9	0.013*	111	49.3	114	50.7	0.757
	III/IV	43	63.2	25	36.8		35	51.5	33	48.5	
Grau histológico	1	10	52.6	9	47.4	0.851	11	57.9	8	42.1	0.651
	2	65	48.9	68	51.1		63	48.1	68	51.9	
	3	62	52.5	56	47.5		61	52.1	56	47.9	
	4	0	0	1	100		0	0	1	100	
Status menopausal	Pre	72	57.1	54	42.9	0.075	66	53.2	58	46.8	0.291
	Peri	14	56	11	44		15	60	10	40	
	Pos	33	41.3	47	58.8		35	44.3	44	55.7	

SCC: Carcinoma escamoso do colo uterino. Adeno: Adenocarcinoma do colo uterino. Outros: Carcinoma mucinoso e carcinoma endometrióide. Os pacientes foram estratificados em categoria alta ou baixa definida pela mediana de CD40 e CD40L. Aplicou-se o teste de χ^2 ou Exato de Fisher. *p significativo.

Em seguida, avaliamos os subtipos tumorais. A figura 14 A mostra que os carcinomas escamosos do colo uterino apresentam maior expressão de CD40 quando comparados aos outros subtipos, enquanto a figura 14 B mostra que não há diferença entre os subtipos tumorais em relação a expressão de CD40L. Além disso, foi observada uma correlação positiva entre os níveis de transcrição de CD40 e CD40L em carcinomas escamosos de cérvix uterina (figura 14 C).

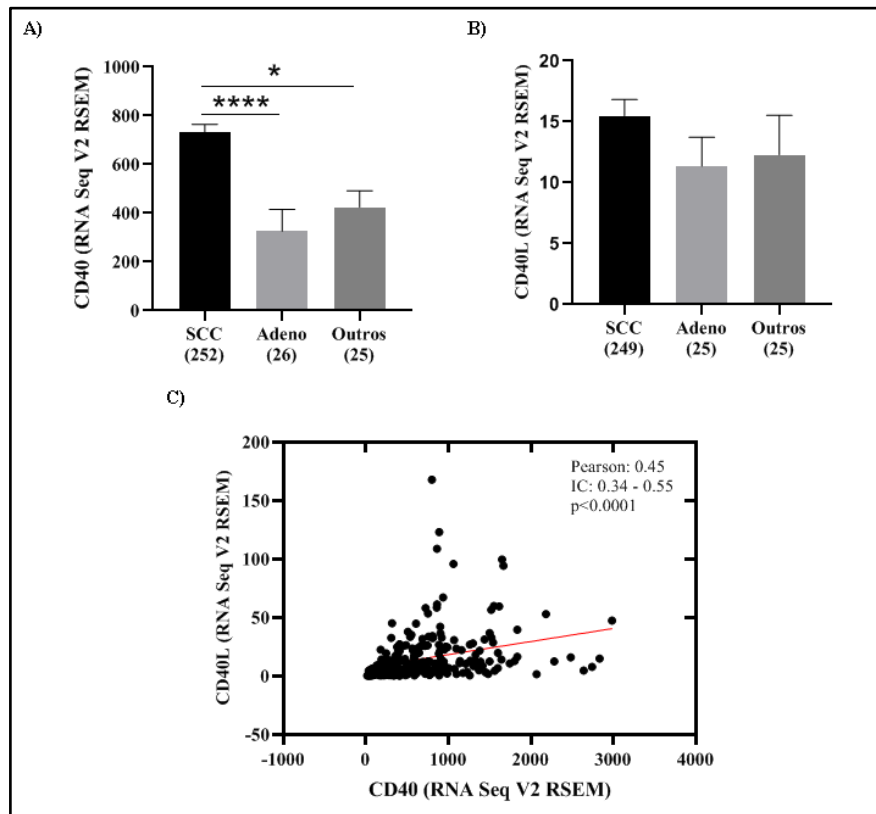


Figura 14. Expressão de CD40 nos subtipos tumorais de cérvix uterina **A)** Expressão de mRNA de CD40 em carcinomas escamosos de cérvix uterina (SCC), adenocarcinomas (adeno) e outros subtipos **B)** Expressão de mRNA de CD40L em carcinomas escamosos de cérvix uterina (SCC), adenocarcinomas (adeno) e outros subtipos **C)** Correlação entre os níveis de transcrição de CD40 e CD40L.

Por último, procuramos analisar se CD40 e CD40L poderiam ter um papel prognóstico em carcinomas escamosos de cérvix uterina a partir de uma análise *KMPlotter* (LANCZKY & GYORFFY, 2021), na mesma população do projeto *TCGA Firehose Legacy*, conforme a figura 15 abaixo.

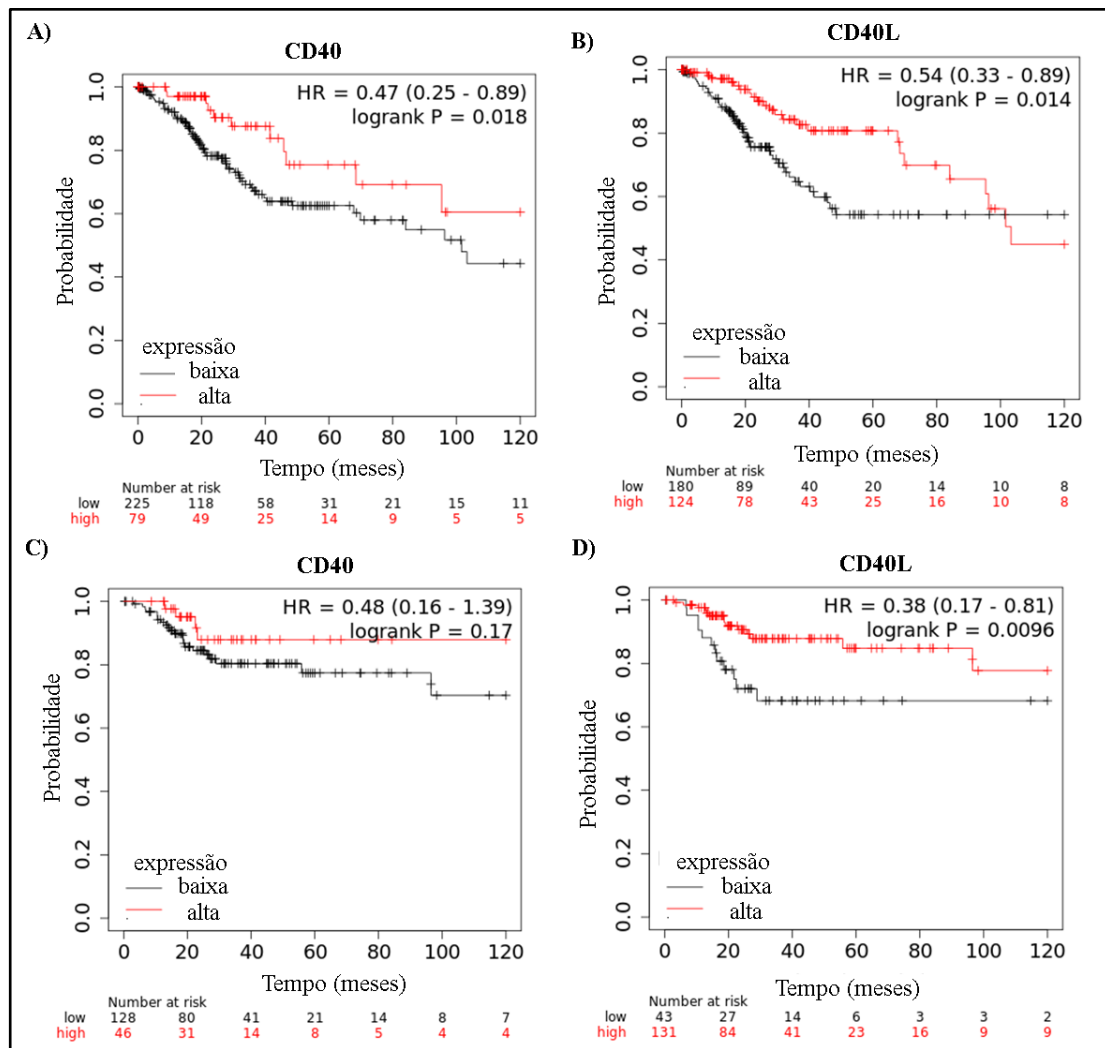


Figura 15. Associação entre a expressão de CD40 e CD40L e sobrevivência em carcinomas escamosos do colo uterino. A) Sobrevida global (SG) de pacientes com carcinoma escamoso de colo uterino de acordo com a expressão de CD40 B) Sobrevida global de pacientes com carcinoma escamoso cervical de acordo com a expressão de CD40. C) Sobrevida livre de recidiva (SLR) de pacientes com carcinoma escamoso cervical de acordo com a expressão de CD40 D) Sobrevida livre de recidiva (SLR) de pacientes com carcinoma escamoso cervical de acordo com a expressão de CD40L.

Nossa análise mostrou que os pacientes com baixa expressão tanto de CD40, quanto de CD40L, apresentam pior sobrevida global (SG) em 120 meses (figura 15 A e 15 B), enquanto a sobrevida livre de recidiva (SLR), apenas CD40L foi associada ao prognóstico do paciente (figura 15 D). Juntos, esses dados mostram que altas expressões de CD40 e CD40L indicam um melhor prognóstico em carcinomas escamosos de colo uterino.

4.6 O fago recombinante PEP1 e CD40 apresentam similaridade de marcação em tumores de cérvix uterina.

A partir da hipótese de que a sequência contida em ØPEP1 possa indicar que este seja mimotopo de CD40, realizamos reações de imunohistoquímica em amostras provenientes de um TMA contendo tumores de colo uterino HPV positivos e HPV negativos, com a finalidade de

comparar qualitativamente a marcação entre ØPEP1 (figuras 16, 19 e 22) e CD40 (figuras 17, 20 e 23). O fago M13 foi utilizado como controle (figuras 18, 21 e 24), para verificarmos se a marcação de ØPEP1 era, de fato, específica.

Exemplos representativos abaixo, mostram que ØPEP1 possui marcação citoplasmática similar à de CD40 (figuras 16 e 17; figuras 19 e 20 e figuras 22 e 23). A amostra representada nas figuras 16, 17 e 18, é originada de uma paciente de 43 anos, composta por um carcinoma escamoso de cérvix uterina HPV16 positivo, com estágio IIB e, também, grau histológico 2. Essa paciente não apresentou recidiva e não foi à óbito. Já a amostra das figuras 19, 20 e 21, proveniente de uma paciente de 40 anos, representa um adenocarcinoma de colo uterino HPV16 positivo, com estágio IVB e grau histológico 3. Essa paciente passou por um tratamento por braquiterapia por 42 dias, não apresentou recidiva e não foi à óbito. Por último, a amostra das figuras 22, 23 e 24, é um carcinoma escamoso de cérvix uterina HPV negativo, advindo de uma paciente de 39 anos, com estágio IA e grau histológico 1. A paciente não apresentou recidiva e não foi à óbito.

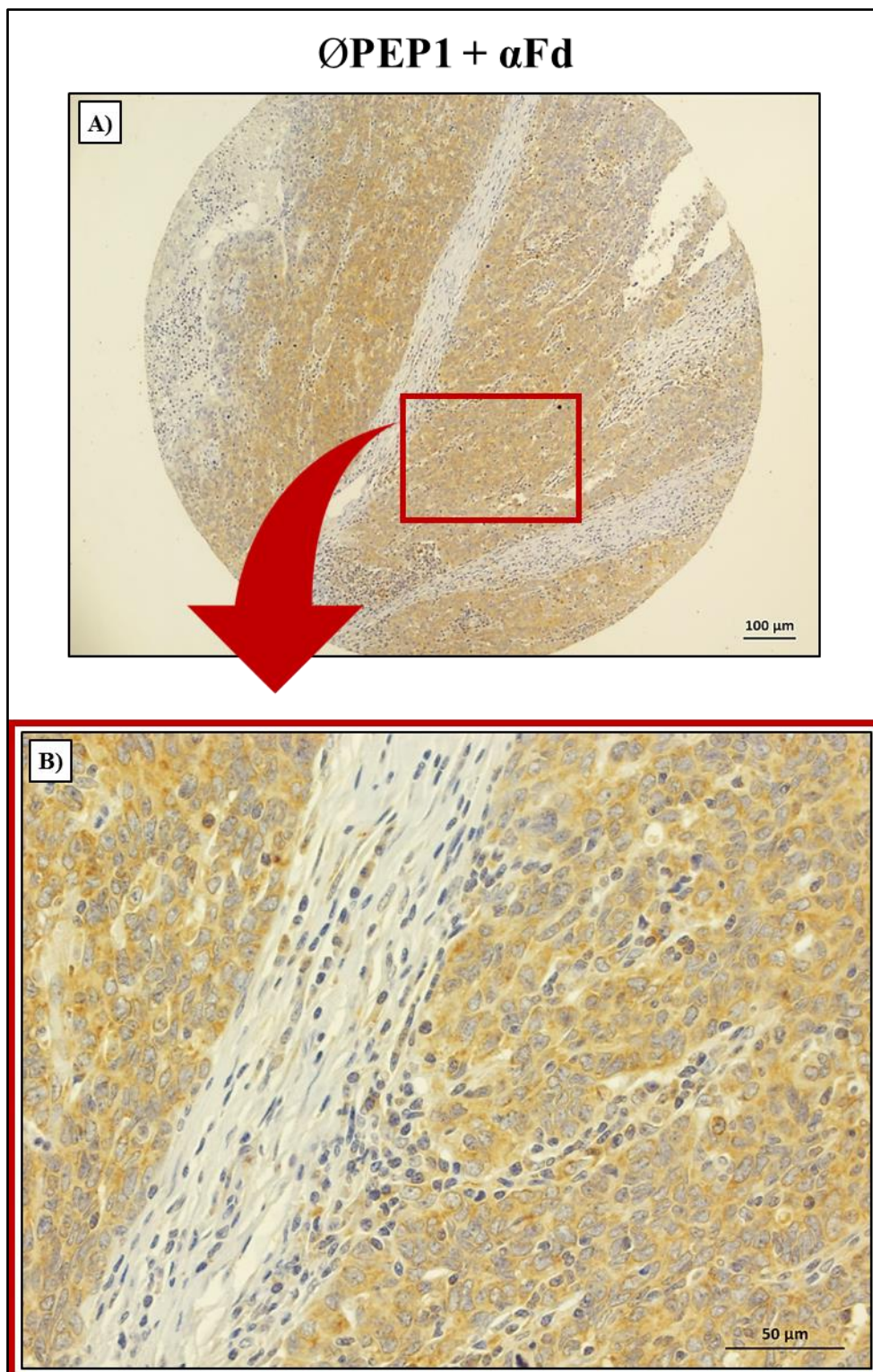


Figura 16. Imunocoloração de um carcinoma escamoso de cérvix uterina HPV16 positivo (nº registro: 60008254) incubado com ØPEP1, seguido do anticorpo anti-Fd. Imagens obtidas em microscópio óptico no **A)** aumento de 100X **B)** aumento de 400X.

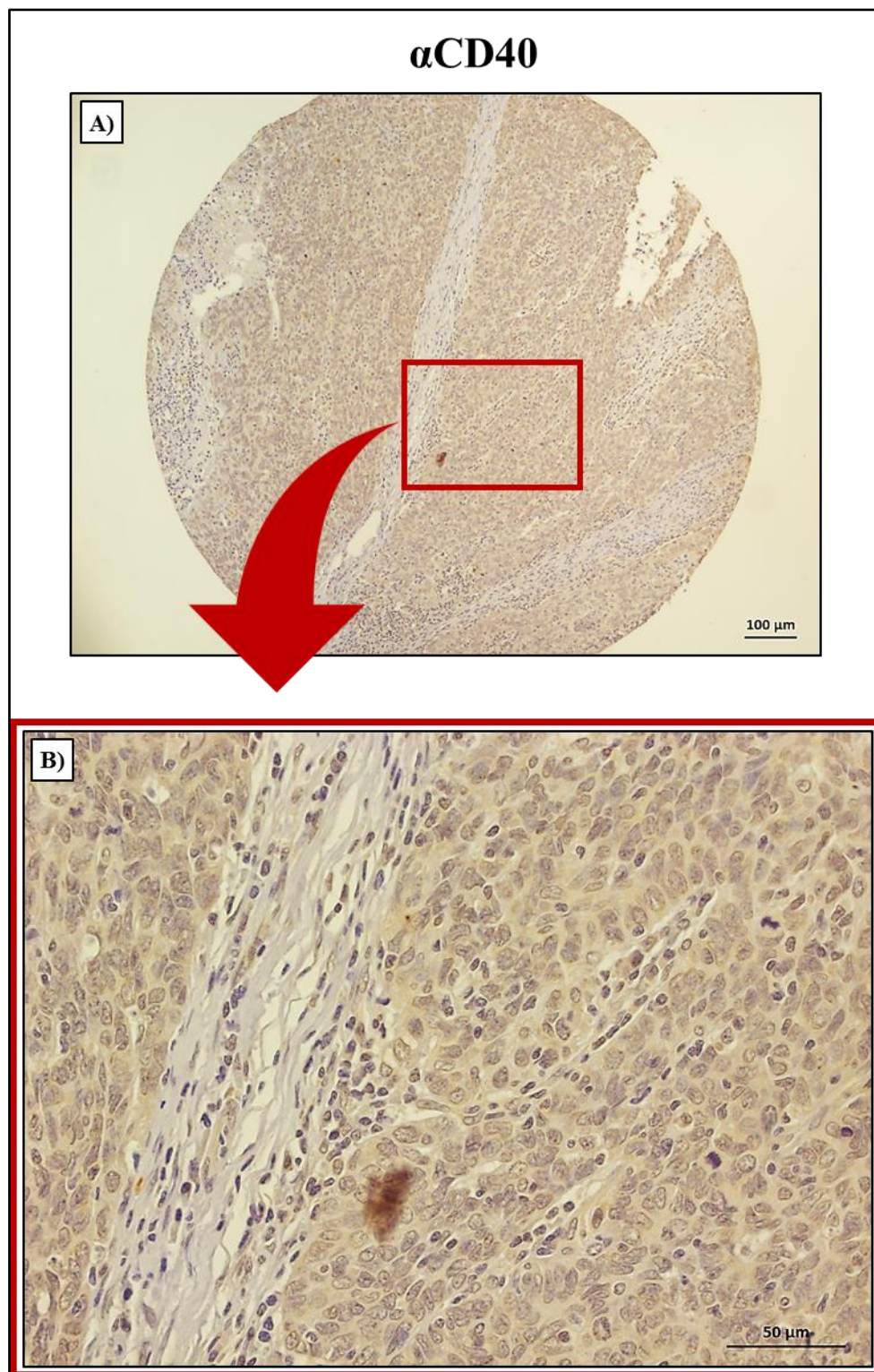


Figura 17. Imunocoloração de um carcinoma escamoso de cérvix uterina HPV16 positivo (n° registro: 60008254) incubado com o anticorpo anti-CD40. Imagens obtidas no microscópio óptico em A) aumento de 100X B) aumento de 400X.

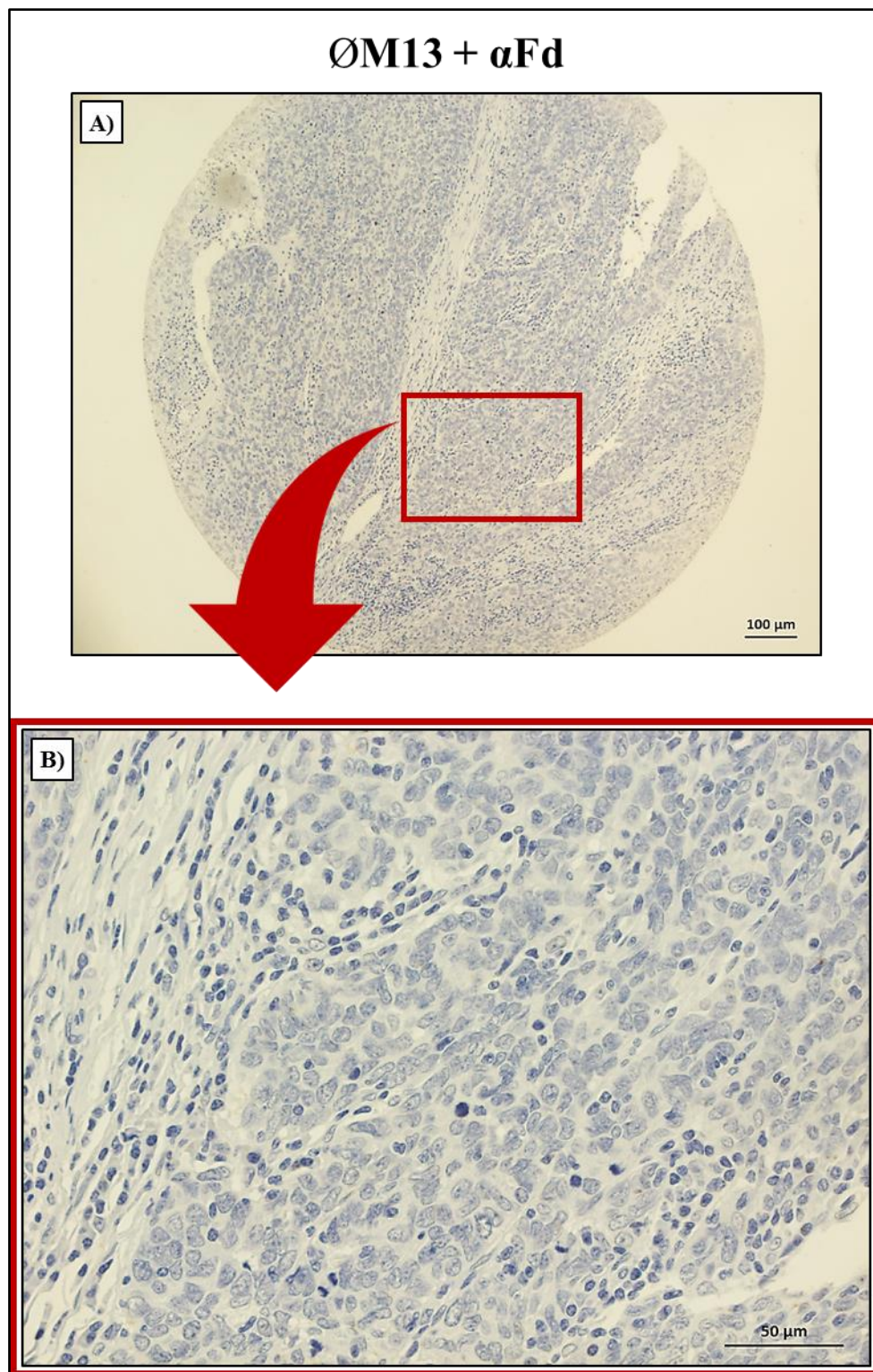


Figura 18. Imunocoloração de um carcinoma escamoso de cérvix uterina HPV16 positivo (nº registro: 60008254) incubado com ØM13, seguido do anticorpo anti-Fd. Imagens obtidas em microscópio óptico no A) aumento de 100X B) aumento de 400X.

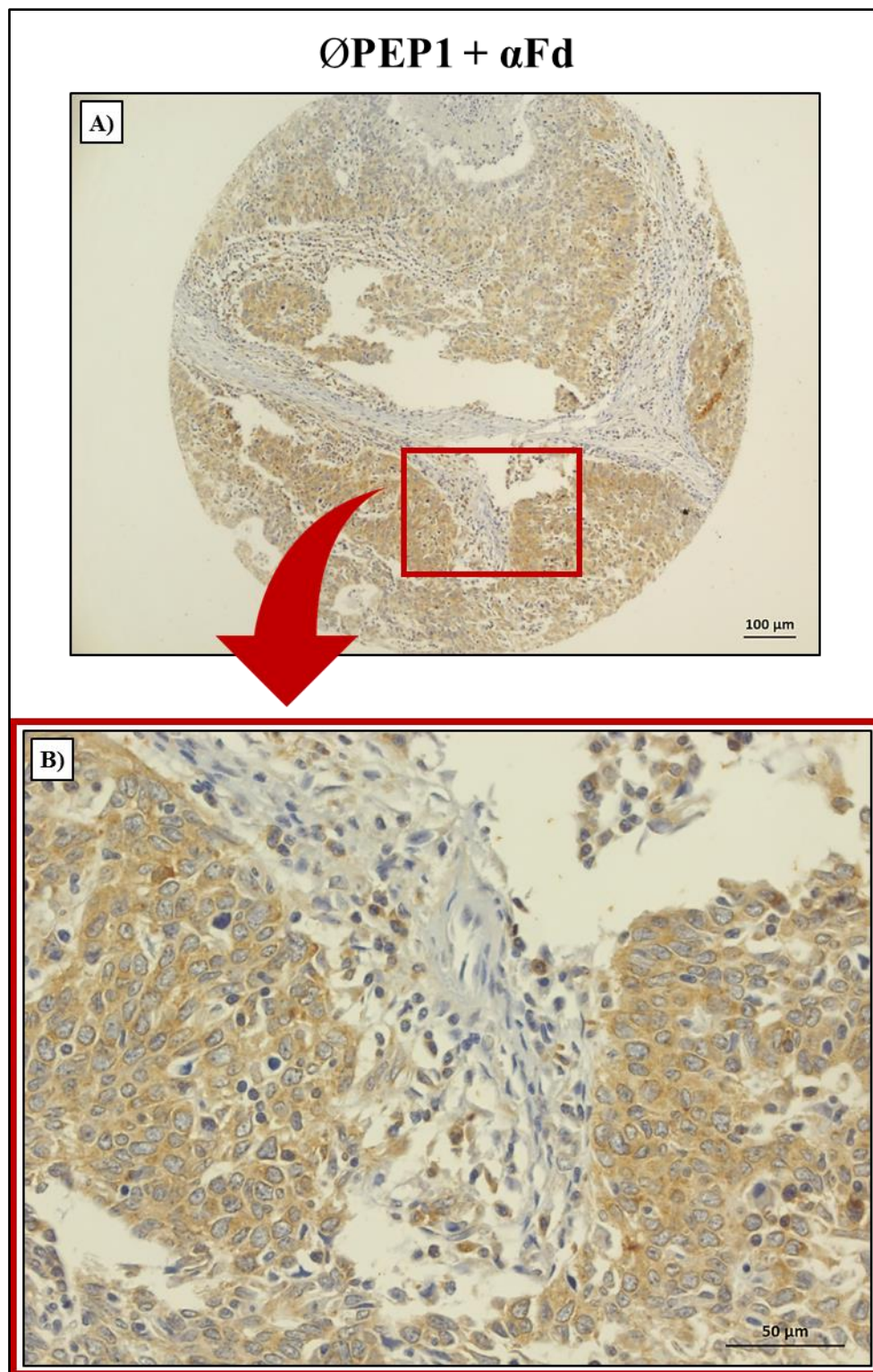


Figura 19. Imunocoloração de um adenocarcinoma de cérvix uterina HPV16 positivo (nº registro: 60008935) incubado com ØPEP1, seguido do anticorpo anti-Fd. Imagens obtidas em microscópio óptico no A) aumento de 100X B) aumento de 400X.

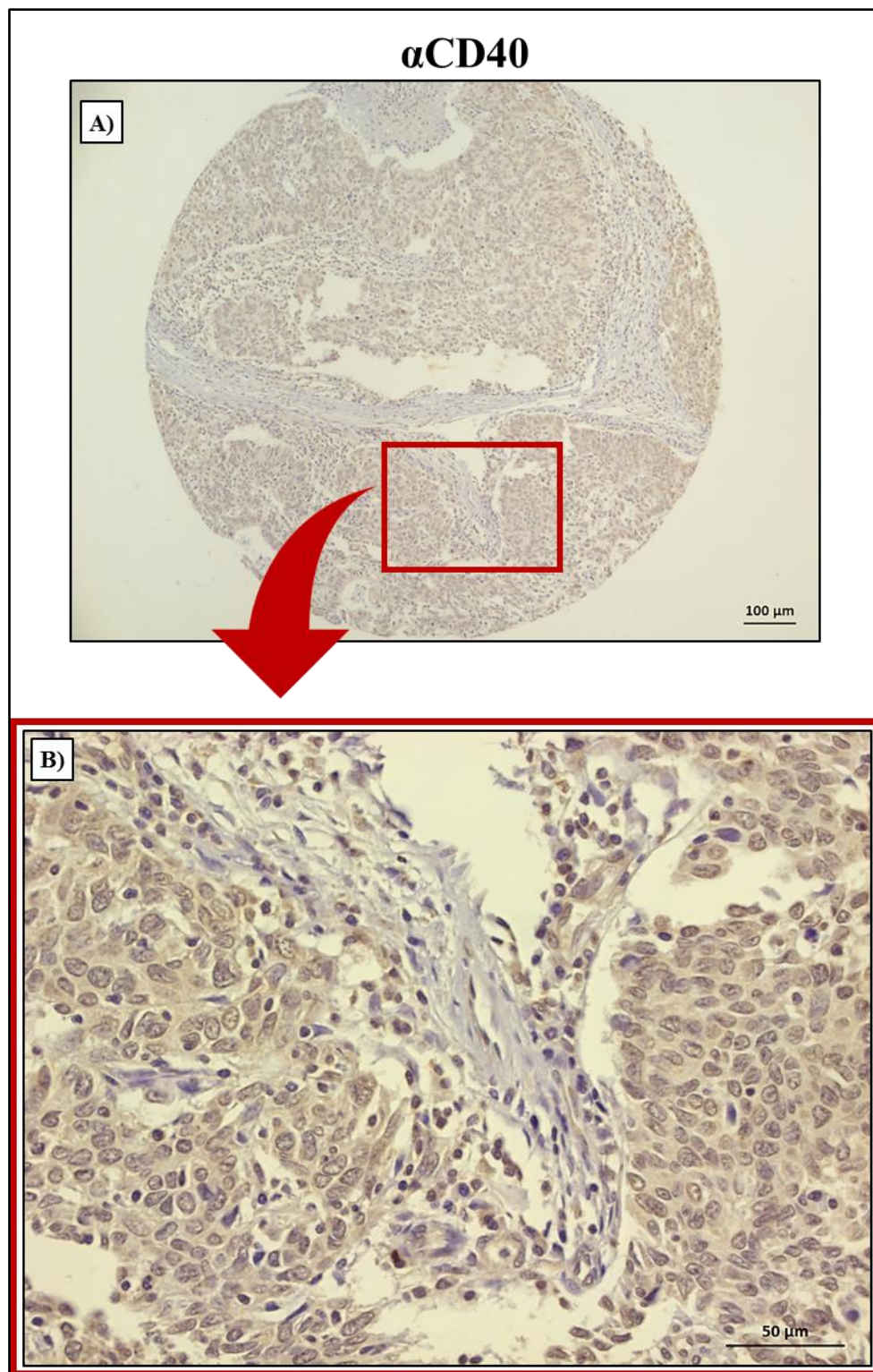


Figura 20. Imunocoloração de um adenocarcinoma de cérvix uterina HPV16 positivo (nº registro: 60008935) incubado com o anticorpo anti-CD40. Imagens obtidas em microscópio óptico no A) aumento de 100X B) aumento de 400X.

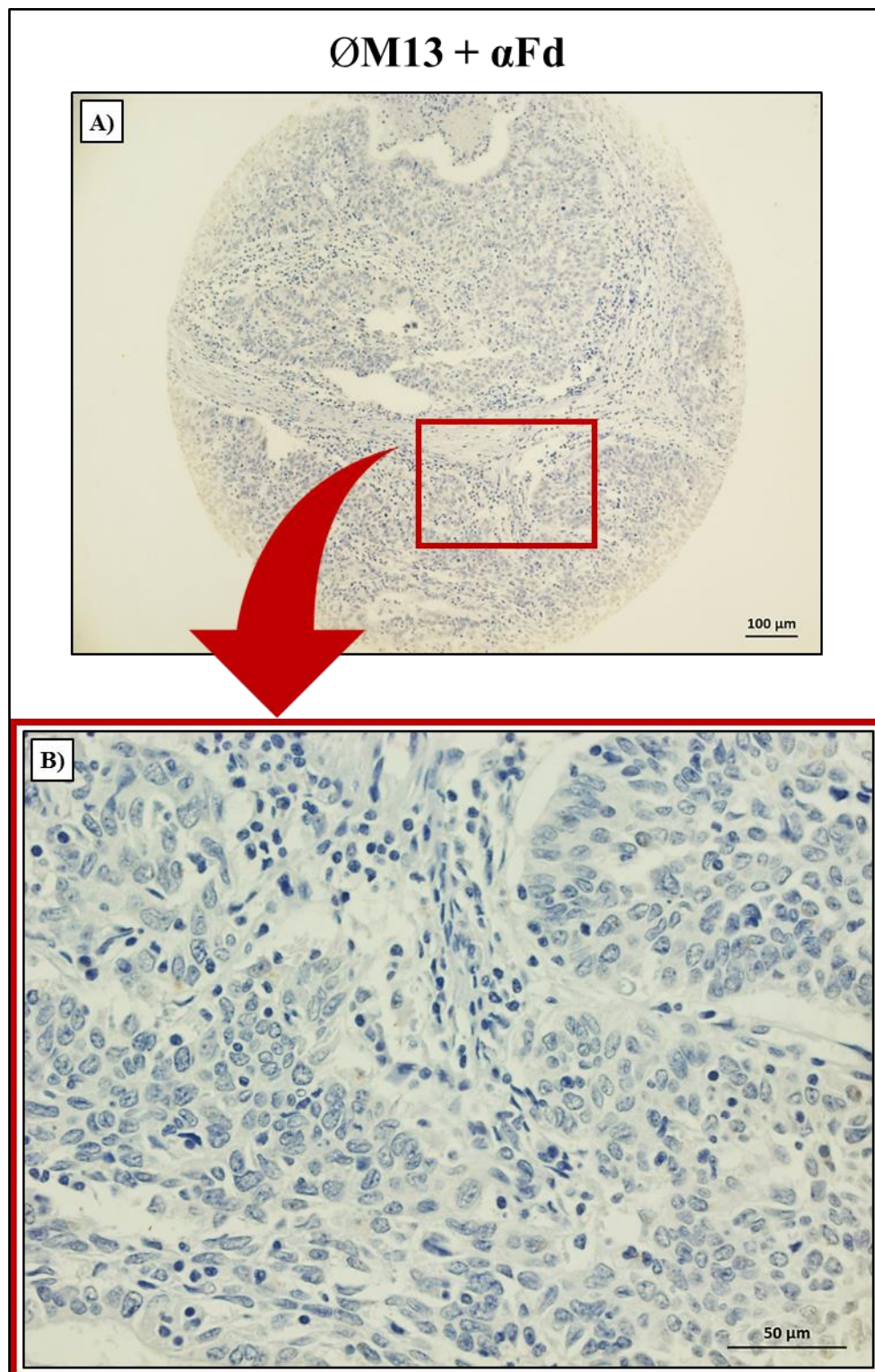


Figura 21. Imunocoloração de um adenocarcinoma de cérvix uterina HPV16 positivo (nº registro: 60008935) incubado com ØM13, seguido do anticorpo anti-Fd. Imagens obtidas em microscópio óptico no A) aumento de 100X B) aumento de 400X.

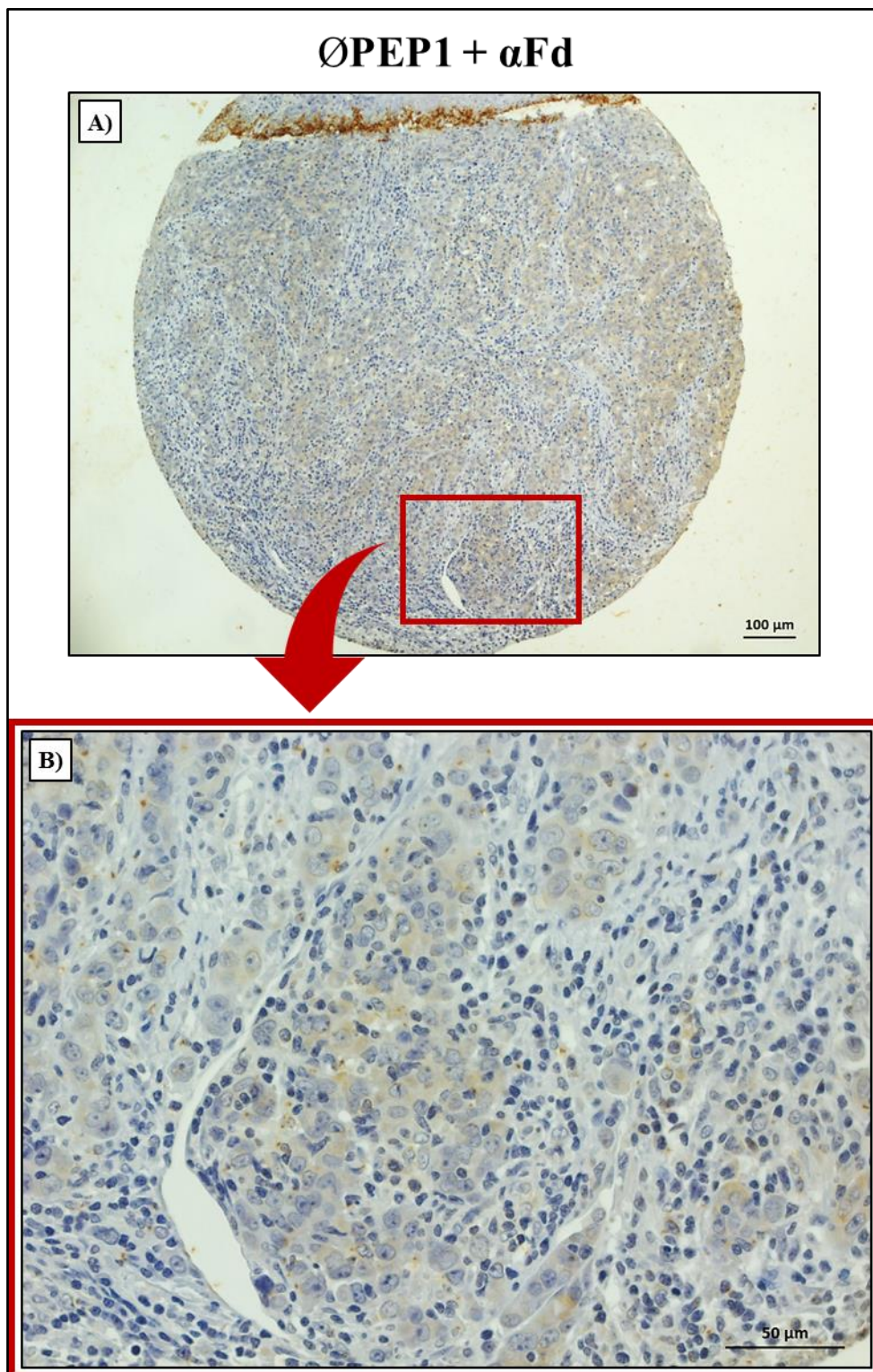


Figura 22. Imunocoloração de um carcinoma escamoso de cérvix uterina HPV negativo (n^o registro: 13876808) incubado com ØPEP1, seguido do anticorpo anti-Fd. Imagens obtidas em microscópio óptico no A) aumento de 100X B) aumento de 400X.

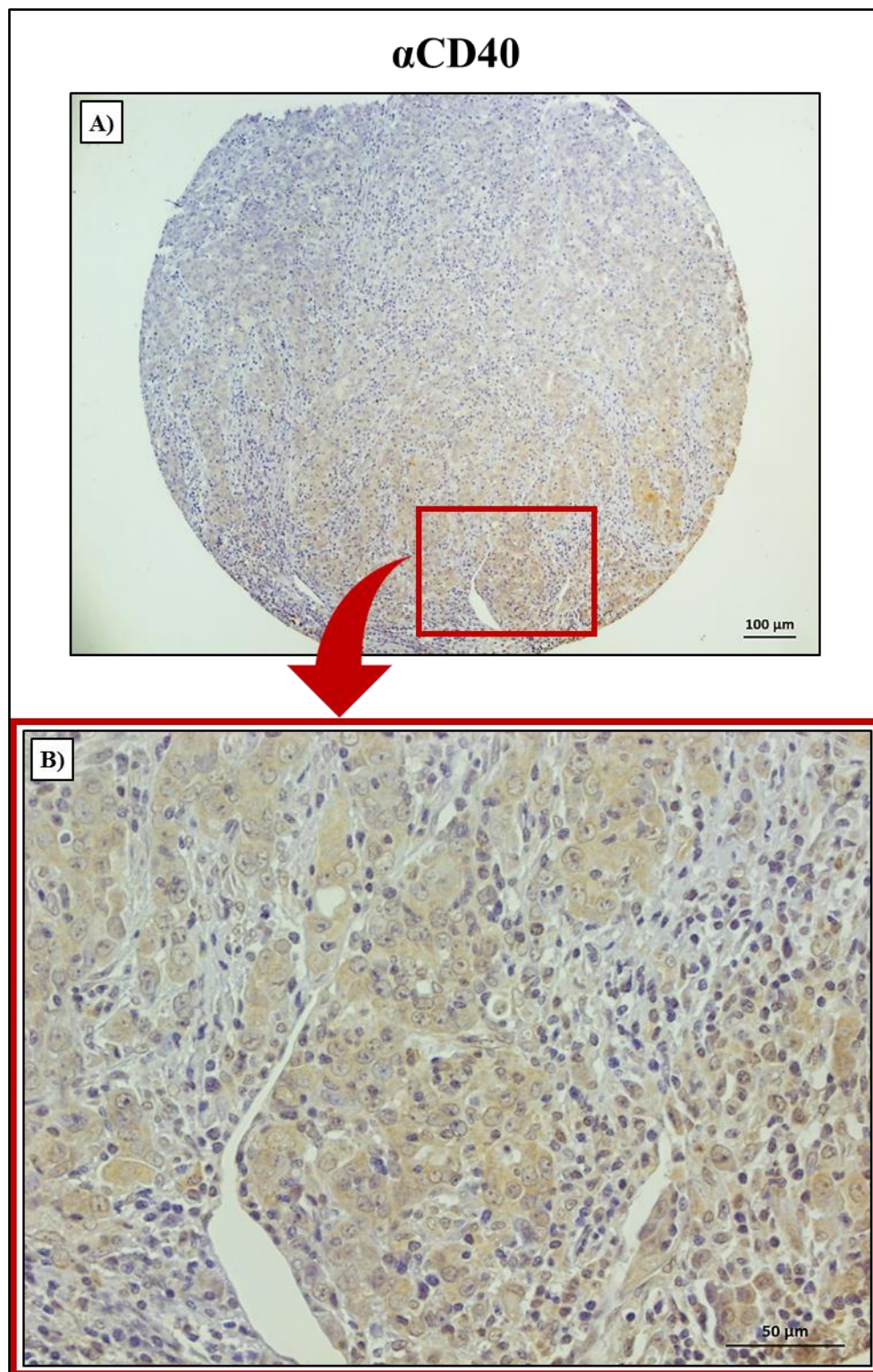


Figura 23. Imunocoloração de um carcinoma escamoso de cérvix uterina HPV negativo (n° registro: 13876808) incubado com o anticorpo anti-CD40. Imagens obtidas em microscópio óptico no A) aumento de 100X B) aumento de 400X.

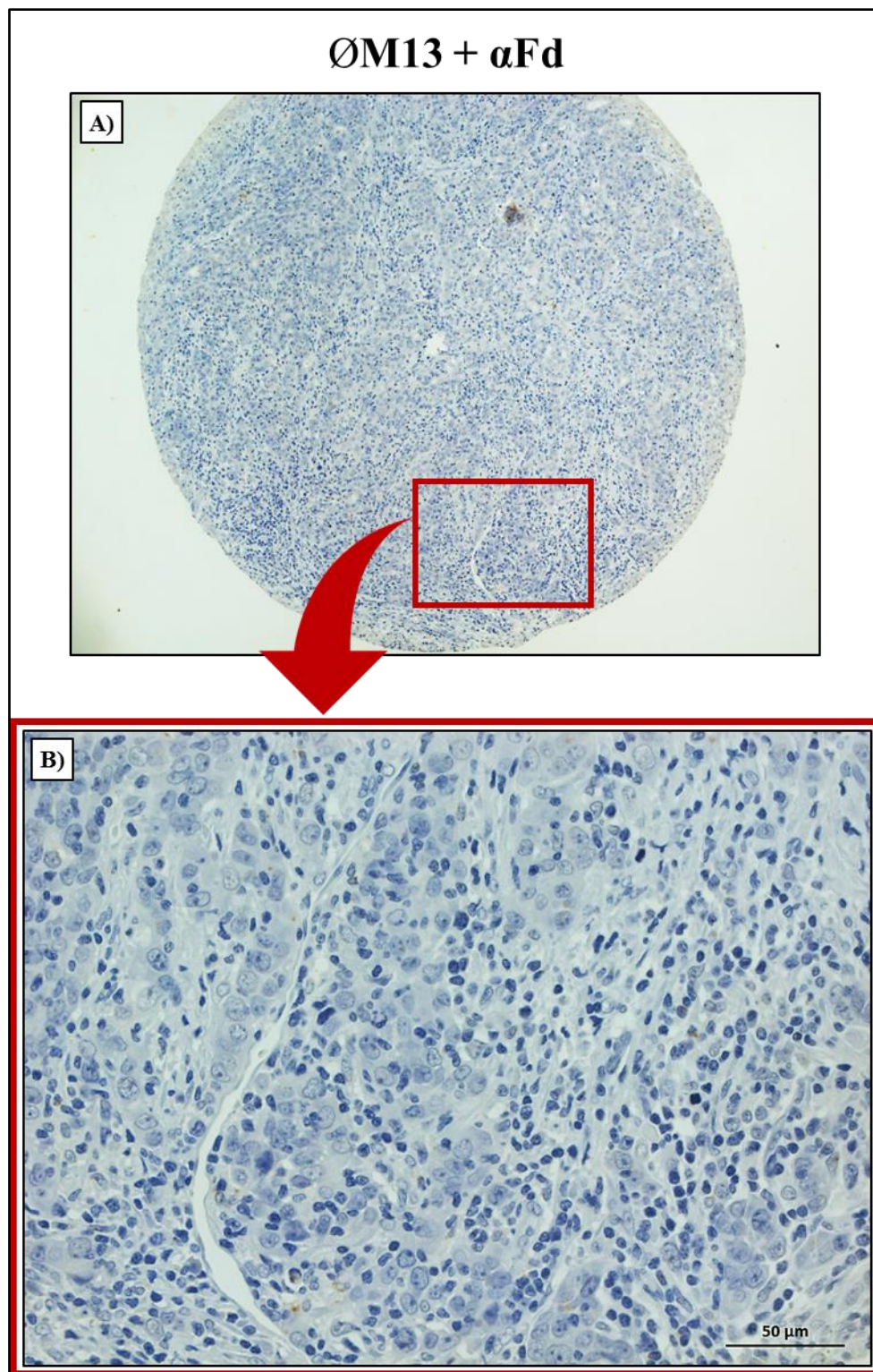


Figura 24. Imunocoloração de um carcinoma escamoso de cérvix uterina HPV negativo (n^o registro: 13876808) incubado com ØM13, seguido do anticorpo anti-Fd. Imagens obtidas em microscópio óptico no A) aumento de 100X B) aumento de 400X.

4.7 O fago recombinante PEP1 não se liga especificamente às linhagens celulares de câncer do colo do útero positivas para HPV, mas se liga a fibroblastos que superexpressam o ligante de CD40 (CD40L) e a células de câncer de mama

Também exploramos a ligação de ØPEP1, *in vitro*, utilizando diferentes linhagens celulares, normais e tumorais. Iniciamos com as linhagens celulares derivadas de câncer do colo do útero. Para isso, ensaios de imunocitoquímica foram realizados, onde SiHa (HPV16) e HeLa (HPV18) foram incubadas com os fagos M13 ou PEP1, recebendo apenas o anticorpo secundário (controles negativos da reação) ou incubados com os fagos e o anticorpo primário anti-Fd. A Figura 25 mostra que não há diferenças entre o ØPEP1 e o ØM13 em sua ligação.

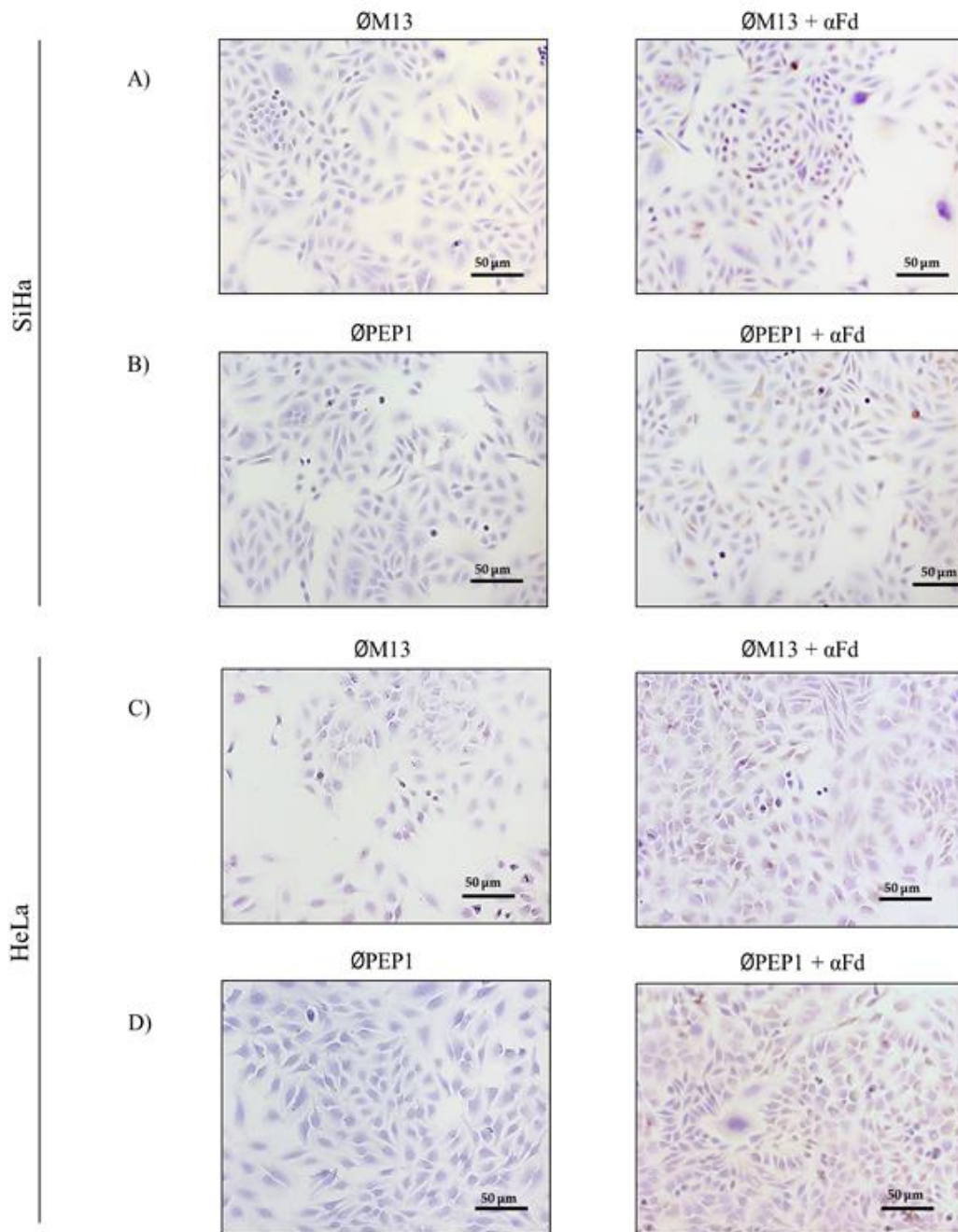


Figura 25. ØPEP1 não apresenta especificidade de ligação a células de câncer de colo uterino positivas para HPV. Imunocoloração de **A)** SiHa com o fago de controle, M13 sem anti-Fd (controle negativo de reação - recebendo apenas anticorpo secundário) e com anti-Fd ; **B)** SiHa com o fago PEP1 recombinante sem anti-Fd (controle negativo de reação - recebendo apenas anticorpo secundário) e com anti-Fd; **C)** HeLa com o fago de controle, M13 sem anti-Fd (controle negativo de reação - recebendo apenas anticorpo secundário) e com anti-Fd; **D)** HeLa com o fago PEP1 recombinante sem anti-Fd (controle negativo de reação - recebendo apenas anticorpo secundário) e com anti-Fd.

Diante deste resultado, fizemos uma busca na literatura para verificar se essas linhagens HPV positivas expressavam o ligante de CD40 (CD40L), para que pudesse complementar evidências de que nosso fago recombinante poderia ser ou não mimotopo de CD40. É possível encontrar algumas informações no *Human protein atlas*

(<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000102245-CD40LG/cell+line>) e em determinados trabalhos, onde utilizam essas linhagens de cérvix uterina transfectadas com vetores expressando CD40L, como por exemplo os trabalhos publicados por NAKAMURA *et al.*, 2006 e VARDOLI *et al.*, 2009. Portanto, essas pesquisas nos indicaram que essas células não expressam naturalmente CD40L.

Diante disso, procuramos na literatura modelos celulares que poderiam expressar CD40L para verificarmos a ligação de ØPEP1. Selecionamos, então, para os testes de ligação, fibroblastos que superexpressam o ligante de CD40 (NIH3T3CD40L) e a células de câncer de mama T47D, que expressam naturalmente CD40L (VOORZANGER-ROUSSELOT & BLAY, 2004), por meio de reações imunocitoquímicas, como mostrado na figura 26.

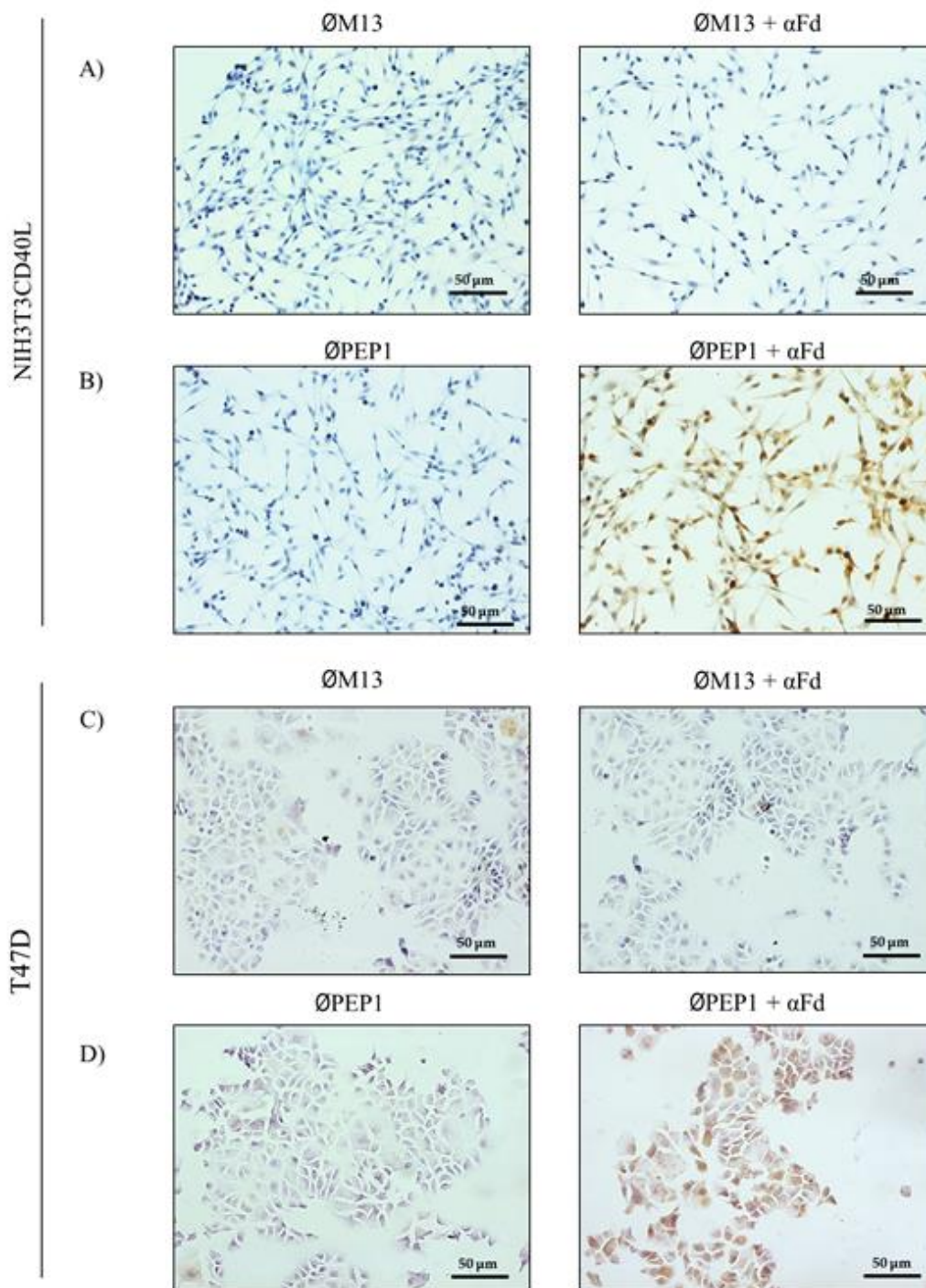


Figura 26. ØPEP1 liga-se especificamente a fibroblastos que superexpressam CD40L e às células tumorais de mama. Imunocoloração de **A)** NIH3T3CD40L com o fago de controle, M13 sem anti-Fd (controle negativo de reação - recebendo apenas anticorpo secundário) e com anti-Fd; **B)** NIH3T3CD40L com o fago PEP1 recombinante sem anti-Fd (controle negativo de reação - recebendo apenas anticorpo secundário) e com anti-Fd; **C)** T47D com o fago de controle, M13 sem anti-Fd (controle negativo de reação - recebendo apenas anticorpo secundário) e com anti-Fd e **D)** T47D com o fago PEP1 sem anti-Fd (controle negativo de reação - recebendo apenas anticorpo secundário) e com anti-Fd.

Observamos ligação específica de ØPEP1 aos fibroblastos que superexpressam o ligante de CD40 (NIH3T3CD40L) e às células da linhagem de câncer de mama, T47D, embasando nossa hipótese de que ØPEP1 poderia atuar como mimotopo de CD40. Para confirmar a ligação de

ØPEP1 às linhagens celulares utilizadas nos ensaios de imunocitoquímica, decidimos realizar, também, ensaios de ligação por citometria de fluxo utilizando os fagos M13 e PEP1 conjugados com FITC.

Analisamos, então, as linhagens celulares SiHa, HeLa NIH3T3CD40L e T47D. As linhagens SiHa e HeLa (linhagens celulares derivadas de câncer de colo uterino), conforme citado, são células que não expressam CD40L. Os dados obtidos para SiHa (figura 27) e HeLa (figura 28) confirmam os ensaios de imunocitoquímica, indicando que não há ligação diferencial entre ØPEP1 e ØM13, tanto na porcentagem de fagos conjugados com FITC que se ligaram às linhagens celulares, quanto na mediana de intensidade de fluorescência (MFI).

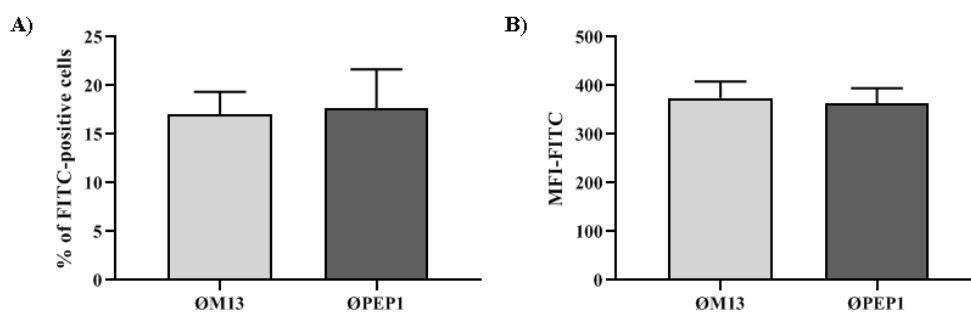


Figura 27. ØPEP1 não se liga diferencialmente à linhagem celular SiHa. A) Porcentagem de células FITC-positivas, com $p > 0,05$ e B) MFI emitida pela ligação dos fagos conjugados a células, com $p > 0,05$.

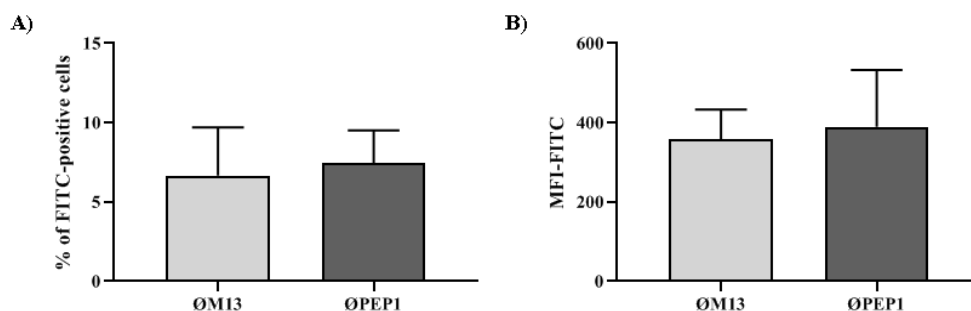


Figura 28. ØPEP1 não se liga diferencialmente à linhagem celular HeLa. A) Porcentagem de células FITC-positivas, com $p > 0,05$ e B) MFI emitida pela ligação dos fagos conjugados a células, com $p > 0,05$.

Já para a linhagem de fibroblastos (NIH3T3CD40L), onde temos uma superexpressão de CD40L, a figura 29 A mostra a porcentagem de fagos conjugados com FITC que foram capazes de se ligar às células, onde é possível observar que ØPEP1 se ligou à linhagem celular NIH3T3CD40L 2,5 vezes mais do que ØM13 (fago controle). Na Figura 29 B, temos a mediana de intensidade de fluorescência (MFI), a qual está diretamente relacionada ao quanto de fluorescência foi emitida ao ocorrer a ligação dos fagos às células. Observou-se que ØPEP1 apresenta uma MFI 4,5 vezes maior do que a MFI de ØM13. Este dado corrobora o que foi visto nos ensaios de imunocitoquímica.

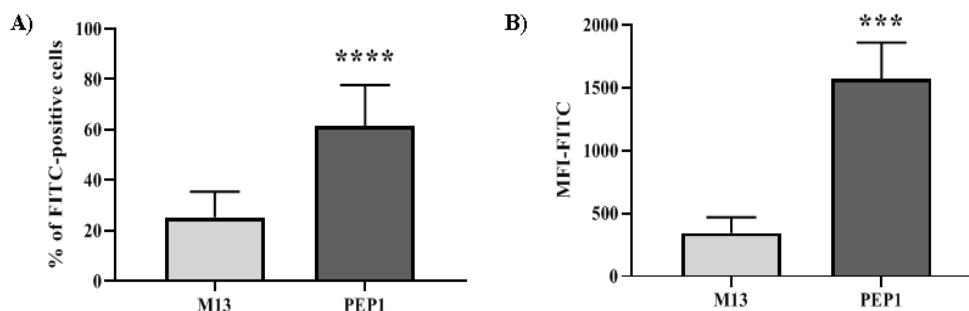


Figura 29. ØPEP1 liga-se a fibroblastos que superexpressam CD40L (NIH3T3CD40L) A) Porcentagem de células FITC-positivas, com $p < 0,0001$ e **B)** MFI emitida pela ligação dos fagos conjugados às células, com $p < 0,0005$.

Por fim, a linhagem celular de câncer de mama, T47D, que expressa naturalmente CD40L, também foi testada para observar a ligação de ØPEP1. Na figura 30 A, observa-se a porcentagem de fagos conjugados com FITC que foram capazes de se ligar às células, onde ØPEP1 foi capaz de se ligar à linhagem celular T47D 1,3 vezes mais que ØM13. Já na figura 30 B, observa-se a mediana de intensidade de fluorescência emitida quando ocorre a ligação dos fagos às células. Assim como na linhagem NIH3T3CD40L, ØPEP1 apresenta uma MFI maior que a MFI de ØM13 (1,7 vezes maior). Este dado, também, confirma o que foi constatado por imunocitoquímica.

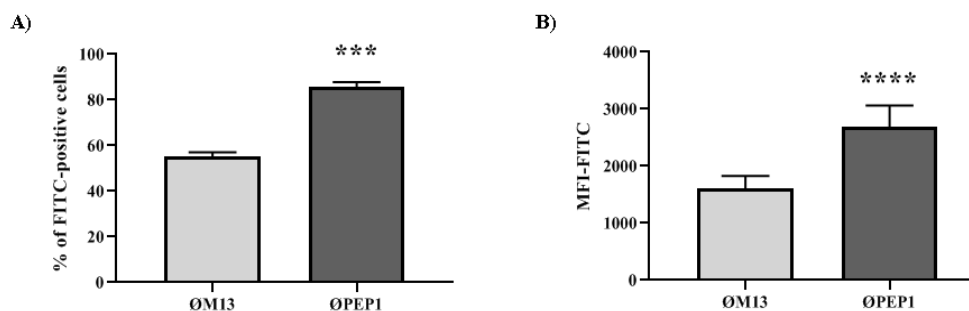
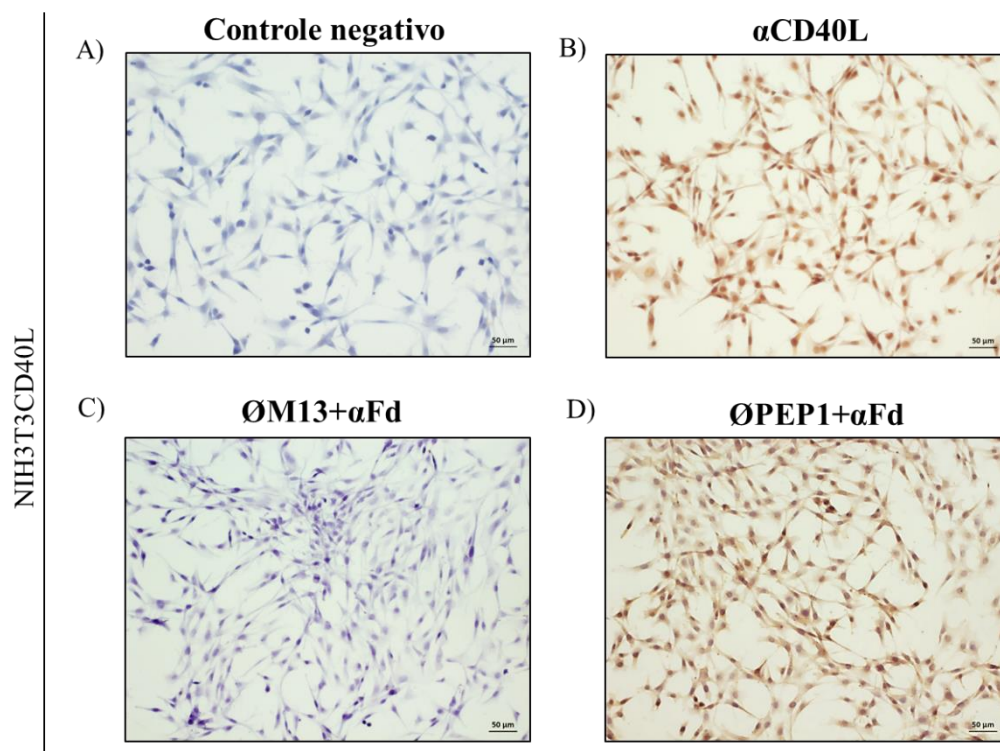


Figura 30. ØPEP1 liga-se a à linhagem celular T47D. A) Porcentagem de células FITC-positivas, com $p < 0,001$ e **B)** MFI emitida pela ligação de fagos conjugados a células, com $p < 0,0001$.

4.8 O fago recombinante PEP1 liga-se especificamente a fibroblastos expressando CD40L

Para verificar a especificidade de ligação de ØPEP1, ensaios de competição por imunocitoquímica foram realizados, onde se utilizou a linhagem de fibroblastos que superexpressam CD40L (NIH3T3CD40L) e o anticorpo anti-CD40L, conforme mostra a figura 31. Para esse ensaio, estabelecemos as seguintes condições: na figura 31 A, a linhagem celular NIH3T3CD40L recebeu apenas anticorpo secundário (controle negativo de reação), ou foi incubada com o anticorpo anti-CD40L (figura 31 B). Fizemos, também, as condições do ensaio de ligação com o fago M13 e com o fago PEP1, seguida da incubação do anticorpo anti-Fd (figura 31 C e figura 31 D, respectivamente). Outros controles foram realizados também, onde os fibroblastos foram incubados com o fago PEP1, um anticorpo irrelevante (no caso, anti-SOD2) e anti-Fd (figura 31 E) ou apenas incubados com ØPEP1 e o anticorpo anti-CD40L, como mostra

a figura 31 F. A especificidade de ØPEP1 é mostrada na figura 31 H (destaque em vermelho), quando incubamos ØPEP1 com o anticorpo anti-CD40L seguido do anticorpo anti-Fd, houve redução de marcação. Esta pode ser uma evidência de que ØPEP1 estaria se ligando no mesmo sítio de ligação de anti-CD40L, o que indicaria ser um mimotopo de CD40. Além disso, fizemos testes com diferentes concentrações do anticorpo anti-CD40L para verificar em quais parâmetros a competição ainda acontecia. As figuras 31 I e 31 J mostram os testes de gradientes de concentração que foram realizados, sendo que na figura 31 I se utilizou a concentração de 1:500 e na 31 J, a concentração de 1:100 para o anticorpo anti-CD40L, nas quais ainda observamos a competição com o fago recombinante PEP1. Nas figuras 31 K e 31 L, se utilizou o anticorpo anti-CD40L nas concentrações 1:2000 e 1:5000, respectivamente, onde percebemos que a competição entre ØPEP1 e anti-CD40L começa a diminuir e o nosso fago recombinante volta a se ligar aos fibroblastos, de maneira específica.



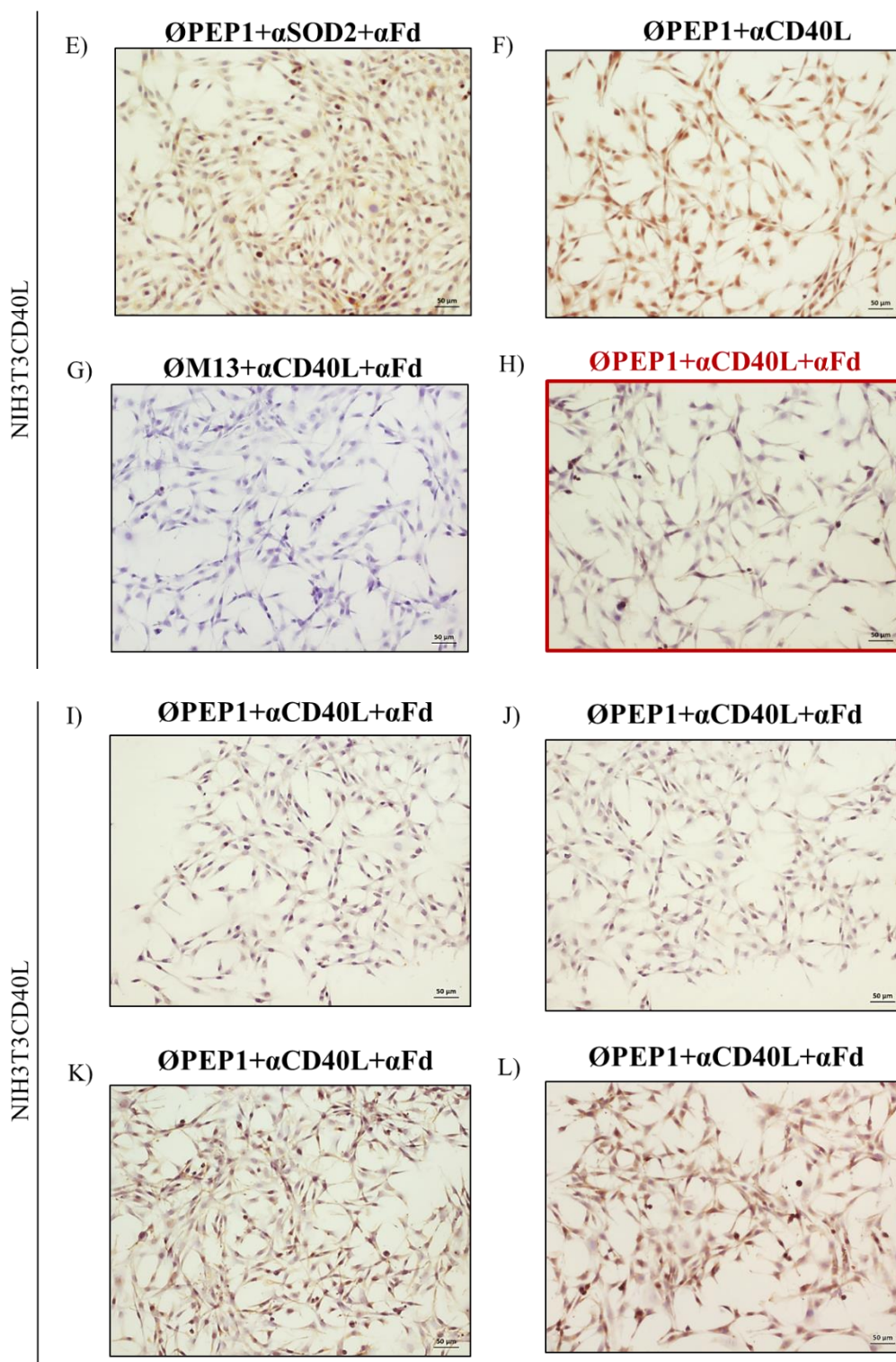


Figura 31. ØPEP1 parece ser um mimotopo de CD40. Reações de imunocitoquímica de **A)** NIH3T3CD40L apenas com anticorpo secundário (controle negativo de reação) **B)** NIH3T3CD40L com o anticorpo anti-CD40L **C)** NIH3T3CD40L com o fago controle, M13 e com anti-Fd; **D)** NIH3T3CD40L com o fago recombinante PEP1 com anti-Fd **E)** NIH3T3CD40L com o fago PEP1, anticorpo irrelevante (anti-SOD2) e anti-Fd **F)** NIH3T3CD40L com o fago recombinante PEP1 e anti-CD40L **G)** NIH3T3CD40L com fago M13, anti-CD40L e anti-Fd **H) competição:** NIH3T3CD40L com fago recombinante PEP1, anti-CD40L (1:100) e anti-Fd **I)** NIH3T3CD40L com fago recombinante PEP1, anti-CD40L (1:500) e anti-Fd **J)** NIH3T3CD40L com fago recombinante PEP1, anti-CD40L (1:1000) e anti-Fd **K)** NIH3T3CD40L com fago recombinante PEP1, anti-CD40L (1:2000) e anti-Fd **L)** NIH3T3CD40L com fago recombinante PEP1, anti-CD40L (1:5000) e anti-Fd.

5 DISCUSSÃO

Ao longo dos anos, aprimoramos nosso conhecimento sobre a história natural da infecção pelo HPV e seu envolvimento no desenvolvimento do câncer de colo uterino, como também, no dos cânceres anogenitais e de cabeça e pescoço (STANLEY *et al.*, 2003; STERN *et al.*, 2012). Além disso, sabemos que tanto os programas de vacinação, como os de rastreio, possuem um impacto muito positivo na prevenção desses tumores. Entretanto, são abordagens que não estão acessíveis/disponíveis para todos, aumentando o risco de desenvolvimento desses cânceres. De maneira geral, tanto aqueles acometidos das infecções, como os que desenvolvem lesões crônicas/neoplásicas requerem algum tipo de tratamento (STERN *et al.*, 2012).

Atualmente, as opções para o tratamento câncer do colo do útero, em estágio inicial e localmente invasivo, incluem a histerectomia radical ou traquelectomia radical com linfadenectomia pélvica e quimioterapia e radioterapia concomitantes. No caso do câncer de cérvix uterina metastático distante, o tratamento é focado em terapias sistêmicas (FERRAL *et al.*, 2021). Entretanto, com a falta de tratamento para as infecções e lesões precursoras e as baixas taxas de cura para a doença avançada, juntamente com os efeitos colaterais das terapias atuais, novas abordagens terapêuticas são necessárias.

Por exemplo, as vacinas terapêuticas em desenvolvimento que se concentram na eliminação da infecção persistente por HPV são poucas, embora haja um ensaio clínico de fase II em andamento para o controle da infecção persistente por HPV16 (NCT03911076). O desenvolvimento de um tratamento para a infecção persistente pelo HPV, limitaria a progressão dessa infecção para lesões de alto grau e para o câncer da cérvix uterina de fato (FERRAL *et al.*, 2021). Em nosso estudo, a abordagem escolhida para desenvolvimento de uma nova alternativa terapêutica foi a tecnologia do *phage display*, uma técnica muito versátil, robusta e precisa, que nos proporcionar prospectar epítomos, como também, selecionar biomoléculas com finalidades diversas, tais como motivos de ligação de receptores bioquímicos, inibidores enzimáticos, aplicações nas áreas de genômica e proteômica, vacinas e outros (SIDHU & KOIDE, 2007; WANG & YU, 2009; LI & CHO, 2010; FINLAY *et al.*, 2017).

Peptídeos exibidos por fagos, por exemplo, podem ser utilizados como candidatos a vacinas, com vantagens significativas. Os bacteriófagos que possuem determinantes antigênicos e imunogênicos possuem a habilidade de serem reconhecidos por células fagocitárias, onde são processados de maneira efetiva e apresentados pelos MHC I e II para as células T (MANOUTCHARIAN *et al.*, 1999; GAUBIN *et al.*, 2003; HESS & JEWELL, 2019). Mais especificamente, um antígeno apresentado no MHC I pode ser reconhecido por células T CD8+ específicas e, estas células, podem se diferenciar em linfócitos T citotóxicos, que são capazes de eliminar, de maneira direta, células tumorais ou células hospedeiras infectadas (HESS & JEWELL, 2019). Além disso, existe uma maior facilidade e menor custo em se amplificar peptídeos expressos nas partículas fágicas, quando comparamos com uma síntese química

convencional, ou até mesmo, com expressão de proteínas recombinantes (MANOUTCHARIAN *et al.*, 1999; GAUBIN *et al.*, 2003). Importante destacar, também, que o produto final é composto por uma gama de cópias virais, aumentando o nível de exposição do mimotopo ao sistema imune do hospedeiro e, que os bacteriófagos não são patogênicos ao ser humano, conseguindo replicar-se no interior de células fagocitárias (GU *et al.*, 2008; ADHYA *et al.*, 2014).

Outro ponto importante é que a utilização de peptídeos fágicos como candidatos a vacinas é atrativa devido ao seu efeito imunestimulatório dos motivos CpGs não metilados presentes no genoma do fago, que podem ajudar na ativação do sistema imune de mamíferos a partir dos TLR (MASON *et al.*, 2005; HASHIGUCHI *et al.*, 2010; COELHO *et al.*, 2015). Os TLR quando ativados, a sinalização à jusante estimula a produção de sinais inflamatórios (citocinas). Esses sinais irão atrair células imunes para os locais de infecção ou tecidos imunes, como linfonodos, promovendo uma resposta imune adaptativa (HESS & JEWELL, 2019). Esses bacteriófagos portadores de peptídeos são vantajosos, pois reduzem e podem até eliminar a utilização de adjuvantes, que normalmente são administrados em conjunto com peptídeos sintéticos e proteínas recombinantes tanto para ativar, quanto melhorar a resposta imunológicas de potenciais vacinas (MASON *et al.*, 2005; HASHIGUCHI *et al.*, 2010; COELHO *et al.*, 2015).

Encontramos diversos trabalhos na literatura envolvendo a técnica do *Phage display*. Staquicini *et al.*, mostra que a aplicação dessa tecnologia proporcionou isolar peptídeos que se dirigem ao microambiente celular imunossupressor de tumores de mama triplo negativos, para serem utilizados como estratégia na descoberta de alvos não malignos. Nesse trabalho, identificaram um peptídeo cíclico com ligação específica a um receptor de vitamina D, a proteína PDIA3 (dissulfeto-isomerase A3), a qual é expressa na superfície de macrófagos associados a tumores (TAM) e tem como alvo o câncer de mama triplo negativo (STAQUICINI, *et al.*, 2021).

No estudo realizado por Mintz *et al.*, avaliaram o perfil de autoanticorpos de um paciente de câncer de próstata ao longo de 7 anos, no qual o câncer progrediu de doença localizada para doença metastática de baixa carga e, por fim, câncer difusamente metastático. Identificaram um epítipo de anticorpo, que apresentava ligação crescente aos anticorpos séricos do paciente, concomitantemente à progressão da doença. Observaram que esse peptídeo identificado mimetiza a fetuína-A, onde sugeriram que a reatividade sérica à fetuína-A mostra utilidade como um indicador sensível e específico de doença metastática (MINTZ, *et al.*, 2015).

Um trabalho realizado por Vidal *et al.*, mostra a seleção de um motivo peptídico cíclico, o qual é reconhecido tanto pelo conjunto de anticorpos purificados por ascite, quanto pelo repertório de anticorpos circulantes em uma paciente índice com câncer de ovário. Observaram que esse motivo peptídico mimetizava a HSP90 (*Heat shock protein 90*), a qual é encontrada expressa em tumores de ovário, independentemente do estágio da doença. Além disso, realizaram testes avaliando a expressão de HSP90 e a presença de anticorpos contra o peptídeo mimetizador de HSP90 em um grande painel de pacientes com câncer e ovário e análises de microarrays de

tecido, observando uma expressão onipresente de HSP90. Em relação à resposta imune humoral correspondente contra HSP90 se restringe a um subconjunto de pacientes com doença mais avançada (estágio IV). Com isso, mostraram que o rastreamento da resposta humoral pode identificar antígenos tumorais que podem servir como alvos moleculares no câncer de ovário e que o reconhecimento dessas proteínas relevantes, podem levar ao desenvolvimento de terapias (VIDAL *et al.*, 2004).

Mais ainda, encontra-se trabalhos utilizando a técnica do *Phage display* envolvendo o desenvolvimento de estratégias de imunização eficazes para um problema bem atual, a COVID-19. Nesse caso, as partículas de fago foram projetadas para exibir um epítipo decapeptídico cíclico altamente imunogênico da proteína SARS-CoV-2 S fundido com um motivo direcionado ao pulmão, facilitando a absorção e distribuição após a entrega direcionada de aerossol (STAQUICINI *et al.*, 2021; STAQUICINI *et al.*, 2021).

Este trabalho teve como foco caracterizar o mecanismo subjacente à atividade antitumoral observada do fago PEP1 recombinante. Nossas análises indicaram que ØPEP1 não possui especificidade para HPV, se ligando a soros e plasmas de mulheres que possuíam esfregaços da cérvix uterina HPV positivos e negativos (figuras 10 e 11). Com base nisso, decidimos avaliar a sequência de peptídica de PEP1, a qual nos mostrou a similaridade com o CD40 humano. Esse dado nos fez levantar a hipótese de que o fago recombinante PEP1 poderia ser mimotopo de CD40. Mimotopos, nada mais são, que peptídeos curtos similares a epítipos de um antígeno, podendo ser utilizados em imunoterapias. Eles podem induzir anticorpos específicos de epítipos, quando acoplados a um carreador imunogênico, sendo importantes para diversos tratamentos na neutralização de patógenos. Ao longo dos anos, houve um aumento no número de estudos envolvendo terapia baseada em mimotopos em diferentes doenças, como alergias, câncer, entre outras (LEUNG *et al.*, 2017).

Diversos trabalhos envolvendo a identificação e diferentes utilizações de mimotopos são encontrados. Um estudo publicado por Zhou *et al.*, por exemplo, identificou mimotopos para a Zearalenona, uma micotoxina que contamina cereais. Observaram que esses mimotopos forneciam informações que esclareciam questões tanto sobre a prevenção, quanto sobre o controle imunológico da Zearalenona (ZHOU *et al.*, 2021). Temos, também, o estudo desenvolvido por Tungtrakanpoung *et al.*, no qual identificaram mimotopos de anticorpos monoclonais específicos para *Leptospira spp.*, e de soros de pacientes com leptospirose. Esse trabalho mostrou que esses mimotopos possuem um papel potencial para atuar como agente diagnóstico e imunogênico para a leptospirose (TUNGTRAKANPOUNG *et al.*, 2006).

O trabalho conduzido por Villa-Mancera *et al.*, mostrou que mimotopos de catepsinas L1 induziam significativa resposta imune humoral (mais de 79 %) contra a *Fasciola hepatica* em caprinos (VILLA-MANCERA *et al.*, 2014). Esse estudo teve continuidade, onde verificaram que as ovelhas vacinadas com esses mimotopos apresentavam menor carga de vermes pós-infecção,

quando comparadas às que não foram imunizadas. Além disso, observaram que essa imunização induziu uma resposta imune mista (Th1/Th2) e que, especificamente o mimotopo SGTFFLS da catepsina L1 possuía alta imunogenicidade nas ovelhas infectadas pela *F.hepatica* (VILLAMANCERA *et al.*, 2021).

Com a hipótese de PEP1 ser mimotopo de CD40 e, sabendo que CD40 também é encontrado na forma solúvel (VAN KOOTEN *et al.*, 1994; TANG *et al.*, 2021), verificamos que em soros dos camundongos imunizados com ØPEP1 (SULAIMAN, 2017), havia maior quantidade de CD40 circulante (figura 13). A partir de análises *in silico* observamos uma maior expressão de CD40 e de seu ligante (CD40L) em carcinomas escamosos do colo do útero e que devido a isso, estes apresentam melhor prognóstico. Além disso, por imunohistoquímica, verificamos em amostras de tumores de colo do útero HPV positivos e HPV negativos oriundos de TMA, uma coincidência no padrão de marcação entre CD40 e ØPEP1, onde a marcação, neste TMA, era distribuída em mais ou menos 50 % dos casos. Futuramente, pode-se explorar por imunohistoquímica uma maior população de tumores de cérvix uterina, para verificar a relação da expressão de CD40 com os dados que obtivemos em nossa análise *in silico* (maior expressão de CD40 → melhor prognóstico em câncer escamoso de cérvix uterina). Encontramos na literatura informações que corroboram essa análise, onde avaliaram tumores de colo uterino a partir de ensaios de imunohistoquímica, como por exemplo, Altenburg e colaboradores que mostram que CD40 é fortemente expresso em carcinomas escamosos do colo do útero (ALTENBURG, *et al.*, 1999).

Além disso, amostras provenientes de lesões HPV positivas e amostras pré-neoplásicas e malignas também expressam níveis mais elevados de CD40, quando comparadas ao epitélio normal de cérvix, sugerindo-se o potencial papel de CD40 como alvo terapêutico para o câncer do colo do útero (HILL *et al.*, 2005). Uma outra publicação, também avaliou por imunohistoquímica a expressão de CD40 em amostras que incluíam desde tecido normal do colo uterino, casos de cervicite, lesões de baixo e alto grau e câncer. Assim como os trabalhos anteriores, observaram maior expressão em NIC II, NIC III e principalmente os carcinomas escamosos e que essa expressão de CD40, principalmente nos carcinomas escamosos, estava relacionada a amostras HPV positivas (HUANG *et al.*, 2011). Uma análise similar à que fizemos por bioinformática, porém, realizada em tumores de mama, mostra que alta expressão de CD40 e CD40L também é associada a melhor prognóstico em câncer de mama (ÜNVER *et al.*, 2020). Outro trabalho, relacionado a melanoma, mostra que a alta expressão de CD40 se correlacionou com respostas imunes antitumorais, melhor prognóstico, bem como a respostas positivas à terapia de bloqueio de *checkpoint* imunológico ou terapia direcionada (YAN *et al.*, 2021).

Ensaio por PCR em tempo real e *Western Blot*, mostraram que as linhagens celulares derivadas de câncer de colo de útero SiHa e HeLa não expressam CD40L (Ávila de Grazia, manuscrito em preparação). Juntamente a isso, nós observamos que ØPEP1 se liga, de maneira

específica, às linhagens celulares que expressam CD40L (figura 26), além de verificarmos a competição específica entre a ligação de ØPEP1 e anti-CD40L (figura 31). Diante de todos esses dados, é possível que ØPEP1 atue como mimotopo de CD40.

Em conjunto com os dados anteriormente obtidos pelo grupo, onde havia associação da diminuição do volume tumoral dos camundongos imunizados com ØPEP1 e maior relação de células TCD8+ (SULAIMAN, 2017), exploramos a hipótese de que o fago recombinante PEP1, devido à sua homologia com CD40 seria capaz de interagir com CD40L estimulando uma resposta de células T citotóxicas. Existem na literatura uma infinidade de relatos sugerindo a importância da interação de CD40 com CD40L nas respostas imunológicas, principalmente no desenvolvimento de linfócitos CD8+ citotóxicos.

Há dois modelos relacionados à sinalização de CD40 em respostas de células T citotóxicas (ARA *et al.*, 2018). Um deles, sugere que os estímulos de CD40L de células T CD4+ *helper* (Th) para DC que expressam o CD40 seriam fundamentais para a maturação das DC que, por sua vez, poderiam desencadear respostas T citotóxicas eficientes. O outro modelo sugerido é que as células T CD4+ que expressam CD40L ativam as células que expressam CD40L ativam as células T CD8+ que expressam diretamente CD40, prevendo que as respostas de células T citotóxicas a todos os antígenos requerem sinalização de CD40 em células T CD8+. De maneira geral, os papéis importantes para a interação de CD40 com CD40L originam muitos eventos imunológicos, os quais são significantes para a defesa do hospedeiro contra patógenos e câncer (ARA *et al.*, 2018).

Dados clínicos e experimentais indicam que o processamento de células tumorais via CD40 pode ter efeitos antiproliferativos diretos significativos em certas malignidades, podendo também, contribuir para o controle tumoral em determinados casos, a partir de mecanismos indiretos dependentes da imunogenicidade melhorada da célula tumoral. Outro ponto importante é que a estimulação terapêutica de CD40 pode exercer funções imunológicas regulatórias importantes via estimulação de células normais (COSTELLO *et al.*, 1999). Com a ativação de CD40 podemos ter o aumento de sobrevivência, como também, a secreção de citocinas e apresentação exógena de antígenos das DC (COSTELLO *et al.*, 1999; DASTE *et al.*, 2017; PIECHUTTA & BERGHOFF; LI & WANG, 2020). Além disso, a sinalização de CD40 pode substituir células T CD4+ na iniciação de respostas citolíticas dependentes de auxiliares e com a ativação de CD40L, podemos ter o aumento das funções citolíticas de células NK (COSTELLO *et al.*, 1999).

Nos dias atuais, as estratégias para a terapêutica do câncer englobam cirurgia, quimioterapia, radioterapia, terapias-alvo e imunoterapia, que vem sendo mais explorada, devido à progressão do campo da imuno-oncologia (SALOMON & DAHAN, 2022). Basicamente, a imunoterapia consiste em estimular o sistema imune do indivíduo para eliminar as células tumorais. Dentre os métodos de tratamento utilizados na imunoterapia, temos as vacinas contra o câncer, terapias celulares adotivas, citocinas e anticorpos monoclonais. Os anticorpos

monoclonais direcionados ao *checkpoint* imunológico (mAbs) são os mais comumente utilizados na prática clínica (KIMIZ-GEBOLOGLU *et al.*, 2018).

Muitas abordagens foram elaboradas para o CD40 em pacientes com câncer. Em alguns modelos tumorais, a entrega de um mAb de CD40 agonista sozinho pode levar à ativação de células T e regressão do tumor de maneira dependente de células T (VONDERHEIDE, 2020). A utilização dos primeiros agonistas terapêuticos de CD40, iniciou-se há 20 anos e, eram baseados em versões multiméricas do CD40L, sendo administrados de maneira subcutânea. O primeiro estudo, realizado em humanos tratados com o CD40L trimérico recombinante, mostrou respostas clínicas objetivas, incluindo uma resposta completa durável em um paciente com carcinoma escamoso de cabeça e pescoço (VONDERHEIDE, *et al.*, 2001; VONDERHEIDE, 2020).

Com passar dos anos, as abordagens de tratamento foram baseadas em mAbs de CD40 agonistas, podendo ser administrados por via intravenosa, subcutânea e intratumoral. De maneira geral, os mAbs de CD40 agonistas possuem viabilidade clínica. Porém, ainda é improvável que esses mAbs de CD40 agonistas possuam uma atividade antitumoral considerável atuando como agente único no tratamento de pacientes. Diante disso, dados sugerem que a terapia com os mAbs de CD40 seja realizada em combinação com outras terapias, como quimioterapia, radioterapia ou terapia imunológica. Essas combinações, em modelos murinos, têm se mostrado promissora, quando administrados na dosagem e sequência adequadas (VONDERHEIDE, 2020). Entretanto, os ensaios clínicos vêm relatando determinados eventos adversos associados aos mAbs de CD40 agonistas, como liberação de tempestades de citocinas, hepatotoxicidade e eventos tromboembólicos, o que impacta na decisão em como continuar o desenvolvimento clínico desses anticorpos (LI & WANG, 2020; VONDERHEIDE, 2020; SALOMON & DAHAN, 2022).

Sabendo desses eventos adversos dos anticorpos monoclonais, o uso de fagos se torna interessante, pois apresenta baixa toxicidade e boa imunogenicidade, podendo ser integrado à outras estratégias terapêuticas e atuar tanto na prevenção, quanto na terapia do câncer (BAO *et al.*, 2019; GORACCI *et al.*, 2020). Nesse caso, os peptídeos selecionados pela técnica do *phage display* podem ser incluídos em um regime terapêutico como mimotopos (vacinas profiláticas e/ou terapêuticas) ou empregados como efetores de pequenas moléculas, (ativadores/inibidores de células imunes, efetores de moléculas de *checkpoint* imunológico) (GORACCI *et al.*, 2020). No caso de nosso fago recombinante PEP1, é possível que ele possa se tornar uma potencial ferramenta empregada em imunoterapias contra o câncer, atuando em conjunto com outras terapias. Mas, para isso, estudos posteriores *in vivo*, explorando esse potencial papel de ØPEP1 como mimotopo de CD40 são necessários.

6 CONCLUSÃO

A técnica de *Phage display*, mesmo sendo relativamente nova, é uma ferramenta muito útil para selecionarmos peptídeos e proteínas (incluindo anticorpos), com grande afinidade e especificidade para utilizarmos como alternativas terapêuticas. Nosso grupo isolou um motivo peptídico (PEP1) a partir de soros de mulheres HPV positivas que se mostrou imunogênico em modelo de tumor animal induzido por HPV. Este trabalho buscou caracterizar o mecanismo subjacente à atividade anti-tumoral observada.

Verificamos que nosso fago recombinante PEP1 (ØPEP1) não depende da presença de HPV para se ligar a soros e plasmas derivados de mulheres com esfregaços do colo uterino HPV positivos e HPV negativos. Além disso, análises realizadas com ferramentas de bioinformática, nos forneceram informações de que a sequência heptapeptídica de PEP1 é encontrada no CD40 humano, sugerindo que PEP1 poderia ser um mimotopo de CD40. Adicionalmente, observamos que a maior expressão de CD40 e de seu ligante, CD40L, são encontradas nos carcinomas escamosos do colo do útero e estão relacionadas a melhor prognóstico nessa população de carcinomas escamosos de cérvix uterina. Análises imunohistoquímicas qualitativas, de amostras derivadas de tumores do colo uterino, mostraram que ØPEP1 possui marcação citoplasmática semelhante à de CD40.

Complementarmente, verificamos que os soros de camundongos imunizados com o ØPEP1 apresentaram níveis mais elevados de CD40 circulante, em comparação com os camundongos que foram imunizados com ØM13 (fago controle). Observamos, também, que ØPEP1 se liga especificamente a fibroblastos que superexpressam CD40L (NIH3T3CD40L) e à linhagem tumoral de mama, T47D (que expressa naturalmente CD40L), enquanto que não se liga às linhagens celulares derivadas de tumores de cérvix uterina, SiHa e HeLa. Essa ligação de ØPEP1 parece ser específica, como revelaram os ensaios de competição realizados em fibroblastos que superexpressam CD40L.

7 REFERÊNCIAS

Abbas A, Lichtman A, Pillai S. Cellular and molecular immunology. Vol. 8a ed., Elsevier. 2010. 565 p.

Adhya S, Merrill CR, Biswas B. Therapeutic and prophylactic applications of bacteriophage components in modern medicine. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014; 4(1):a012518.

Aghebati-Maleki L, Bakhshinejad B, Baradaran B, Motallebnezhad M, Aghebati-Maleki A, Nickho H, et al. Phage display as a promising approach for vaccine development. *J Biomed Sci.* 2016; 29; 23(1):66.

Aksoy P, Gottschalk EY, Meneses PI. HPV entry into cells. *Mutat Res Rev Mutat Res.* 2017;772:13-22.

Andralojc KM, Molina MA, Qiu M, Spruijtenburg B, Rasing M, Pater B, et al. Novel high-resolution targeted sequencing of the cervicovaginal microbiome. *BMC Biol.* 2021; 19(1):267.

Ara A, Ahmed KA, Xiang J. Multiple effects of CD40-CD40L axis in immunity against infection and cancer. *Immunotargets Ther.* 2018; 7:55-61.

Arbyn M, Weiderpass E, Bruni L, de Sanjosé S, Saraiya M, Ferlay J, et al. Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: a worldwide analysis. *Lancet Glob Health.* 2020; 8(2):e191-e203.

Ashrafi GH, Haghshenas M, Marchetti B, Campo MS. E5 protein of human papillomavirus 16 downregulates HLA class I and interacts with the heavy chain via its first hydrophobic domain. *Int J Cancer.* 2006; 119(9):2105–12.

Athanasίου A, Bowden S, Paraskevaidi M, Fotopoulou C, Martin-Hirsch P, Paraskevaidis E, et al. HPV vaccination and cancer prevention. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2020; 65:109-124.

Bachmann MF, Jennings GT. Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nat Rev Immunol.* 2010; 10:787-96.

Bao Q, Li X, Han G, Zhu Y, Mao C, Yang M. Phage-based vaccines. *Adv Drug Deliv Rev.* 2019; 145:40-56.

Bashaw AA, Leggett GR, Chandra J, Tuong ZK, Frazer IH. Modulation of antigen presenting

cell functions during chronic HPV infection. *Papillomavirus Res.* 2017; 4:58-65.

Bazan J, Calkosiński I, Gamian A. Phage display--a powerful technique for immunotherapy: 1. Introduction and potential of therapeutic applications. *Hum Vaccin Immunother.* 2012 Dec 1;8(12):1817-28.

Bereznaya NM, Chekhun VF. Expression of CD40 and CD40L on tumor cells: the role of their interaction and new approach to immunotherapy. *Exp Oncol* 2007; 29: 2–12.

Bharel M, Santiago ER, Forgione SN, León CK, Weinreb L. Eliminating health disparities: innovative methods to improve cervical cancer screening in a medically underserved population. *Am J Public Health.* 2015; 105:S438-S442.

Bodily J, Laimins LA. Persistence of human papillomavirus infection: Keys to malignant progression. *Trends in Microbiology.* 2011; 19:33–9.

Boon SS, Luk HY, Xiao C, Chen Z, Chan PKS. Review of the Standard and Advanced Screening, Staging Systems and Treatment Modalities for Cervical Cancer. *Cancers (Basel).* 2022; 14(12):2913.

Bosch FX. The path to eliminate cervical cancer in the world and the challenges of professional education. *Vaccine.* 2013; 31(S5):11–2.

Bruni L, Saura-Lázaro A, Montoliu A, Brotons M, Alemany L, Diallo MS, et al. HPV vaccination introduction worldwide and WHO and UNICEF estimates of national HPV immunization coverage 2010-2019. *Prev Med.* 2021; 144:106399.

Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov.* 2012; 2(5):401-4.

Chaiwongkot A, Vinokurova S, Pientong C, Ekalaksananan T, Kongyingyoes B, Kleebkaow P, et al. Differential methylation of E2 binding sites in episomal and integrated HPV 16 genomes in preinvasive and invasive cervical lesions. *Int J Cancer.* 2013;132(9):2087–94.

Chatzigeorgiou A, Lyberi M, Chatzilymperis G, Nezos A, Kamper E. CD40/CD40L signaling and its implication in health and disease. *Biofactors.* 2009;35(6):474-483.

Chouhan RS, Rajawat AS, Goyal SB, Bedi P. AI-Enabled Augmented Reality-Based Shared Collaborative Experience. "In": Kautish S, Dhiman G. AI-Enabled Multiple-Criteria Decision-

Making Approaches for Healthcare Management. 2022. p. 85-96.

Chow LT, Broker TR. Human papillomavirus infections: Warts or cancer? *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(7).

Coelho EA, Chávez-Fumagalli MA, Costa LE, Tavares CA, Soto M, Goulart LR. Theranostic applications of phage display to control leishmaniasis: selection of biomarkers for serodiagnostics, vaccination, and immunotherapy. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2015; 48(4):370-9.

Costello RT, Gastaut JA, Olive D. What is the real role of CD40 in cancer immunotherapy? *Immunol Today.* 1999; 20(11):488-93.

Crosbie EJ, Einstein MH, Franceschi S, Kitchener HC. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet.* 2013;382 (9895):889–99.

Crusius K, Rodriguez I, Alonso A. The human papillomavirus type 16 E5 protein modulates ERK1/2 and p38 MAP kinase activation by an EGFR-independent process in stressed human keratinocytes. *Virus Genes.* 2000; 20:61-5.

Dadgostar H, Zarnegar B, Hoffmann A, Qin XF, Truong U, Rao G, et al. Cooperation of multiple signaling pathways in CD40-regulated gene expression in B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:1497–502.

Dagogo-Jack I, Shaw AT. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nat Rev Clin Oncol.* 2018.

Daste A, Domblides C, Gross-Goupil M, Chakiba C, Quivy A, Cochin V, et al. Immune checkpoint inhibitors and elderly people: A review. *Eur J Cancer.* 2017;82:155-166.

de Freitas AC, de Oliveira THA, Barros MR Jr, Venuti A. hrHPV E5 oncoprotein: immune evasion and related immunotherapies. *J Exp Clin Cancer Res.* 2017;36(1):71. Published 2017 May 25. doi:10.1186/s13046-017-0541-1

Deligeoroglou E, Giannouli A, Athanasopoulos N, Karountzos V, Vatopoulou A, Dimopoulos K, et al. HPV infection: immunological aspects and their utility in future therapy. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2013; 2013:540850.

de Sanjosé S, Brotons M, Pavón MA. The natural history of human papillomavirus infection. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2018; 47:2-13.

Disbrow GL, Hanover JA, Schlegel R. Endoplasmic reticulum-localized human papillomavirus type 16 E5 protein alters endosomal pH but not trans-Golgi pH. *J Virol*. 2005; 79: 5839–5846.

Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)*. 2006; 110(5):525–41.

Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*. 2012; 30 Suppl 5:F55-70.

Doorbar J. The E4 protein; structure, function and patterns of expression. *Virology*. 2013; 445(1-2):80-98.

Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, Murakami I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Reviews in Medical Virology*. 2015. 25:2–23.

Dybwad A, Lambin P, Sioud M, Zouali M. Probing the specificity of human myeloma proteins with a random peptide phage library. *Scand J Immunol*. 2003; 57(6):583-90.

Elmetwali T, Young LS, Palmer DH. CD40 Ligand-Induced Carcinoma Cell Death: A Balance between Activation of TNFR-Associated Factor (TRAF) 3-Dependent Death Signals and Suppression of TRAF6-Dependent Survival Signals. *J. Immunol*. 2010; 184:1111–1120.

Eliopoulos AG, Young LS. The role of the CD40 pathway in the pathogenesis and treatment of cancer. *Curr Opin Pharmacol*. 2004; 4(4):360-7.

Fausch SC, Fahey LM, Da Silva DM, Kast WM. Human papillomavirus can escape immune recognition through Langerhans cell phosphoinositide 3-kinase activation. *J Immunol*. 2005; 174(11):7172-8.

Ferreira, AR; Ramalho, AC; Marques, M; Ribeiro, D. The Interplay between Antiviral Signalling and Carcinogenesis in Human Papillomavirus Infections. *Cancers (Basel)*. 2020; 12(3):646.

Finlay WJ, Bloom L, Grant J, Franklin E, Shúilleabháin DN, Cunningham O. Phage Display: A Powerful Technology for the Generation of High-Specificity Affinity Reagents from Alternative Immune Sources. *Methods Mol Biol*. 2017; 1485:85-99.

Franco EL, Rohan TE, Villa LL. Epidemiologic evidence and human papillomavirus infection as a necessary cause of cervical cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 1999; 91:506–11.

Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, et al. Integrative analysis of

- complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal*. 2013; 6(269):p11.
- Garrido F, Perea F, Bernal M, Sánchez-Palencia A, Aptsiauri N, Ruiz-Cabello F. The Escape of Cancer from T Cell-Mediated Immune Surveillance: HLA Class I Loss and Tumor Tissue Architecture. *Vaccines (Basel)*. 2017;5(1):7.
- Gaubin M, Fanutti C, Mishal Z, Durrbach A, de Berardinis P, Sartorius R, et al. Processing of filamentous bacteriophage virions in antigen-presenting cells targets both HLA class I and class II peptide loading compartments. *DNA Cell Biol*. 2003; 22:11-18.
- Goracci M, Pignochino Y, Marchiò S. Phage Display-Based Nanotechnology Applications in Cancer Immunotherapy. *Molecules*. 2020; 25(4):843.
- Greten FR, Grivennikov SI. Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. *Immunity*. 2019; 51(1):27-41.
- Groves IJ, Coleman N. Pathogenesis of human papillomavirus-associated mucosal disease. *J Pathol*. 2015; 235(4):527–38.
- Gu Y, Li J, Zhu X, Yang J, Li Q, Liu Z, et al. *Trichinella spiralis*: characterization of phage-displayed specific epitopes and their protective immunity in BALB/c mice. *Exp Parasitol* 2008; 118:66-74.
- Gutierrez-Xicotencatl L, Salazar-Piña DA, Pedroza-Saavedra A, Chihu-Ampan L, Rodriguez-Ocampo AN, Maldonado-Gama M, et al. Humoral Immune Response Against Human Papillomavirus as Source of Biomarkers for the Prediction and Detection of Cervical Cancer. *Viral Immunol*. 2016; (2):83-94.
- Hashiguchi S, Yamaguchi Y, Takeuchi O, Akira S, Sugimura K. Immunological basis of M13 phage vaccine: regulation under MyD88 and TLR9 signaling. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010; 402:19-22.
- Herrero A, Barja G. Localization of the site of oxygen radical generation inside the complex I of heart and nonsynaptic brain mammalian mitochondria. *J Bioenerg Biomembr*. 2000; 32(6):609–15.
- Hess KL, Jewell CM. Phage display as a tool for vaccine and immunotherapy development. *Bioeng Transl Med*. 2019; 5(1):e10142.
- Hill SC, Youde SJ, Man S, Teale GR, Baxendale AJ, Hislop A, et al. Activation of CD40 in

cervical carcinoma cells facilitates CTL responses and augments chemotherapy-induced apoptosis. *J Immunol.* 2005; 174(1):41-50.

Howie HL, Katzenellenbogen RA, Galloway DA. Papillomavirus E6 proteins. *Virology.* 2009; 384(2):324-334.

Huang Q, Qu QX, Xie F, Zhang T, Hu JM, Chen YG, et al. CD40 is overexpressed by HPV16/18-E6 positive cervical carcinoma and correlated with clinical parameters and vascular density. *Cancer Epidemiol.* 2011;35:388–392.

IARC. Colposcopy and treatment of cervical intraepithelial neoplasia: a beginners' manual. Disponível em <https://screening.iarc.fr/colpochap.php?chap=2> . Acesso em 03 de março de 2022.

IARC Working Group. Human papillomaviruses. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum, vol. 90, 2007.

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Papillomaviridae* – dsDNA viruses, 2011. Disponível em https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsdna-viruses-2011/w/dsdna_viruses/122/papillomaviridae-figures. Acesso em 22 de março de 2022.

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Inoviridae* - ssDNA Viruses, 2011. Disponível em https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/ssdna-viruses-2011/w/ssdna_viruses/146/inoviridae-figures. Acesso em 27 de maio de 2022.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Estimativa 2020: incidência do Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2019. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/controlado-cancer-do-colo-do-utero/conceito-e-magnitude>. Acesso em: 15 de dezembro de 2021.

Johansson C, Schwartz S. Regulation of human papillomavirus gene expression by splicing and polyadenylation. *Nature Reviews Microbiology.* 2013; 11:239–51.

Kamolratanakul S, Pitisuttithum P. Human Papillomavirus Vaccine Efficacy and Effectiveness against Cancer. *Vaccines (Basel).* 2021; 9(12):1413.

Kashiwagi K, Shiba K. Filamentous Phage-Based Extra Cellular Matrix. *International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science.* 2008; 392-395.

Kimiz-Gebologlu I, Gulce-Iz S, Biray-Avci C. Monoclonal antibodies in cancer immunotherapy. *Mol Biol Rep.* 2018; 45(6):2935-2940.

Lanczky A, Gyorffy B: Web-Based Survival Analysis Tool Tailored for Medical Research (KMplot): Development and Implementation. *J Med Internet Res.* 2021; 23(7):e27633.

Ledbetter JA, Shu G, Gallagher M and Clark EA. Augmentation of normal and malignant B cell proliferation by monoclonal antibody to the B cell-specific antigen BP50 (CDW40). *J. Immunol.* 1987; 138:788– 794.

Lei J, Ploner A, Elfström KM, Wang J, Roth A, Fang F, et al. HPV Vaccination and the Risk of Invasive Cervical Cancer. *N Engl J Med.* 2020; 383(14):1340-1348.

Lepique AP, Daghananli KR, Cuccovia IM, Villa LL. HPV16 tumor associated macrophages suppress antitumor T cell responses. *Clin Cancer Res.* 2009; 15(13):4391-400.

Leung NY, Wai CY, Ho MH, Liu R, Lam KS, Wang JJ, et al. Screening and identification of mimotopes of the major shrimp allergen tropomyosin using one-bead-one-compound peptide libraries. *Cell Mol Immunol.* 2017; 14(3):308-318.

Li DK, Wang W. Characteristics and clinical trial results of agonistic anti-CD40 antibodies in the treatment of malignancies. *Oncol Lett.* 2020; 20(5):176.

Li ZJ, Cho CH. Development of peptides as potential drugs for cancer therapy. *Curr Pharm Des.* 2010; 16(10):1180-9.

Loh B, Kuhn A, Leptihn S. The fascinating biology behind phage display: filamentous phage assembly. *Mol Microbiol.* 2019; 111(5):1132-1138.

Loskog AS, Eliopoulos AG. The Janus faces of CD40 in cancer. *Semin Immunol.* 2009; 21(5):301-7.

Ma DY, Clark EA. The role of CD40 and CD154/CD40L in dendritic cells. *Semin Immunol.* 2009; 21:265–272.

Mac M, Moody CA. Epigenetic Regulation of the Human Papillomavirus Life Cycle. *Pathogens.* 2020; Jun 18;9(6):483

Mason KA, Ariga H, Neal R, Valdecanas D, Hunter N, Krieg AM, et al. Targeting toll-like receptor 9 with CPG oligodeoxynucleotides enhances tumor response to fractionated radiotherapy targeting toll-like receptor 9 with CPG oligodeoxynucleotides enhances tumor response to fractionated radiotherapy. *Clin Cancer Res.* 2005; 11:361-369.

Mantovani A, Sica A, Allavena P, Garlanda C, Locati M. Tumor-associated macrophages and the related myeloid-derived suppressor cells as a paradigm of the diversity of macrophage activation. *Hum Immunol.* 2009; 70(5):325-30.

Manzo-Merino J, Lagunas-Martínez A, Contreras-Ochoa CO, Lizano M, Castro-Muñoz LJ, Calderón-Corona C, et al. The Human Papillomavirus (HPV) E6 Oncoprotein Regulates CD40 Expression via the AT-Hook Transcription Factor AKNA. *Cancers (Basel).* 2018; 10(12):521.

Manoutcharian K, Terrazas LI, Gevorkian G, Acero G, Petrossian P, Rodrigues M, et al. Phage-displayed T-cell epitope grafted into immunoglobulin heavy-chain complementarity-determining regions: an effective vaccine design tested in murine cysticercosis. *Infect Immun.* 1999; 67:4764-4770.

Mesri EA, Feitelson MA, Munger K. Human viral oncogenesis: A cancer hallmarks analysis. *Cell Host and Microbe.* 2014. 15:266–82.

Mintz PJ, Rietz AC, Cardó-Vila M, Ozawa MG, Dondossola E, Do KA, et al. Discovery and horizontal follow-up of an autoantibody signature in human prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015; 112(8):2515-20.

Mirabello L, Clarke M, Nelson C, Dean M, Wentzensen N, Yeager M, et al. The Intersection of HPV Epidemiology, Genomics and Mechanistic Studies of HPV-Mediated Carcinogenesis. *Viruses.* 2018; 10(2):80.

Mo Y, Ma J, Zhang H, Shen J, Chen J, Hong J, et al. Prophylactic and Therapeutic HPV Vaccines: Current Scenario and Perspectives. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022; 12:909223.

Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: Pathways to transformation. *Nature Reviews Cancer.* 2010; 10: 550–60.

Nayar R, Wilbur D, C: The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology: A Historical Perspective. *Acta Cytologica.* 2017; 61:359-372.

Noren KA, Noren CJ. Construction of high-complexity combinatorial phage display peptide libraries. *Methods.* 2001; 2:169-78.

Okunade KS. Human papillomavirus and cervical cancer. *J Obstet Gynaecol.* 2020; 40(5):602-608.

Papillomavirus Episteme (PaVE): the papillomavirus knowledge source. Disponible em:

<https://pave.niaid.nih.gov/>. Acesso em: 15/09/2022.

Peitsaro P, Johansson B, Syrjänen S. Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(3):886–91.

Pett MR, Alazawi WO, Roberts I, Downen S, Smith DI, Stanley MA, et al. Acquisition of high-level chromosomal instability is associated with integration of human papillomavirus type 16 in cervical keratinocytes. *Cancer Res.* 2004; 64(4):1359-68.

Piechutta M, Berghoff AS. New emerging targets in cancer immunotherapy: the role of Cluster of Differentiation 40 (CD40/TNFR5). *ESMO Open.* 2019; 4(Suppl 3):e000510.

Plummer M, de Martel C, Vignat J, Ferlay J, Bray F, Franceschi S. Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *Lancet Glob Health.* 2016; 4(9):e609-16.

Ponten F., Gry M., Fagerberg L., Lundberg E., Asplund A., Berglund L., et al. A global view of protein expression in human cells, tissues, and organs. *Mol. Syst. Biol.* 2009; 5:337.

Pouyanfard S, Müller M. Human papillomavirus first and second generation vaccines-current status and future directions. *Biol Chem.* 2017; 398:871-889.

Rami A, Behdani M, Yardehnavi N, Habibi-Anbouhi M, Kazemi-Lomedasht F. An overview on application of phage display technique in immunological studies. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.* 2017; 7(7):599-602.

Richards DM, Sefrin JP, Gieffers C, Hill O, Merz C. Concepts for agonistic targeting of CD40 in immuno-oncology. *Hum Vaccin Immunother.* 2020; 16(2):377-387.

Romanov VI, Durand DB, Petrenko VA. Phage display selection of peptides that affect prostate carcinoma cells attachment and invasion. *Prostate.* 2001; 47(4):239-51.

Salomon R, Dahan R. Next Generation CD40 Agonistic Antibodies for Cancer Immunotherapy. *Front Immunol.* 2022; 13:940674.

Sasagawa T, Takagi H, Makinoda S. Immune responses against human papillomavirus (HPV) infection and evasion of host defense in cervical cancer. *J Infect Chemother.* 2012; 18(6):807-15.

Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell.*

1990;63(6):1129–36.

Schiller JT, Castellsagué X, Garland SM. A review of clinical trials of human papillomavirus prophylactic vaccines. *Vaccine*. 2012; 20:30 Suppl 5:F123-38.

Schlecht NF, Kulaga S, Robitaille J, Ferreira S, Santos M, Miyamura RA, et al. Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. *JAMA*. 2001; 286:3106-14.

Schönbeck U, Libby P. The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cell Mol Life Sci*. 2001; 58(1):4-43.

Shapiro GK. HPV Vaccination: An Underused Strategy for the Prevention of Cancer. *Curr Oncol*. 2022; 29(5):3780-3792.

Shimauchi T, Piguet V. Manipulated microenvironment in human papilloma virus-infected epithelial cells: is the CD40-CD154 pathway beneficial for host or virus? *J Invest Dermatol*. 2014; 134(12): 2866-2868.

Sidhu SS, Koide S. Phage display for engineering and analyzing protein interaction interfaces. *Curr Opin Struct Biol*. 2007; 17(4):481-7.

Sioud M. Phage Display Libraries: From Binders to Targeted Drug Delivery and Human Therapeutics. *Mol Biotechnol*. 2019; 61(4):286-303.

Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, et al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *Jama*. 2002; 287(16):2114–9.

Stamenkovic I, Clark E. A. and Seed B. A B lymphocyte activation molecule related to the nerve growth factor receptor and induced by cytokines in carcinomas. *EMBO J*. 1989; 8: 1403–1410.

Stanley M. Chapter 17: Genital human papillomavirus infections--current and prospective therapies. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003; 31:117-24.

Stanley M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. 2010; 117(2 Suppl): S5-10.

Stanley MA. Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus. *Clinical Microbiology Reviews*. 2012; 25: 215–22.

Staquicini FI, Hajitou A, Driessen WH, Proneth B, Cardó-Vila M, Staquicini DI, et al. Targeting a cell surface vitamin D receptor on tumor-associated macrophages in triple-negative breast cancer. *Elife*. 2021;10: e65145.

Staquicini DI, Barbu EM, Zemans RL, Dray BK, Staquicini FI, Dogra P, et al. Targeted phage display-based pulmonary vaccination in mice and non-human primates. *Med (NY)*. 2021; 2:321–342.

Staquicini DI, Tang FH, Markosian C, Yao VJ, Staquicini FI, Rojas ED, et al. Design and proof of concept for targeted phage-based COVID-19 vaccination strategies with a streamlined cold-free supply chain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2021; 118:e2105739118.

Steinbach A, Riemer AB. Immune evasion mechanisms of human papillomavirus: An update. *Int J Cancer*. 2018; 142(2):224-229.

Stenlund A. Initiation of DNA replication: Lessons from viral initiator proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2003; 4 777–85.

Stern PL, van der Burg SH, Hampson IN, Broker TR, Fiander A, Lacey CJ, et al. Therapy of human papillomavirus-related disease. *Vaccine*. 2012; 30 Suppl 5(0 5):F71-82.

Sulaiman LPK. Seleção de motivos semelhantes a Papilomavírus, a partir de bibliotecas de phage display, que apresentem potencial aplicação translacional [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

Sung, H, Ferlay, J, Siegel, RL, Laversanne, M, Soerjomataram, I, Jemal, A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2021; 71: 209- 249.

Tang T, Cheng X, Truong B, Sun L, Yang X, Wang H. Molecular basis and therapeutic implications of CD40/CD40L immune checkpoint. *Pharmacol Ther*. 2021; 219:107709.

Tavakoli F, Khatami SS, Momeni F, Azadbakht J, Ghasemi F. Cervical Cancer Diagnosis: Insights into Biochemical Biomarkers and Imaging Techniques. *Comb Chem High Throughput Screen*. 2021; 24(5):605-623.

Tikunova NV, Morozova VV. Phage display on the base of filamentous bacteriophages: application for recombinant antibodies selection. *Acta Naturae*. 2009; 1(3):20-28.

Topfer K, Kempe S, Muller N, Schmitz M, Bachmann M, Cartellieri M, et al. Tumor evasion from T cell surveillance. *T. J Biomed Biotechnol.* 2011; 2011:918471.

Tungtrakanpoung R, Pitaksajjakul P, Na-Ngarm N, Chaicumpa W, Ekpo P, Saengjaruk P, et al. Mimotope of *Leptospira* from phage-displayed random peptide library is reactive with both monoclonal antibodies and patients' sera. *Vet Microbiol.* 2006 ;115(1-3):54-63.

Ünver N, Yöyen Ermiş D, Weber BZ, Esendağlı G. Transcriptional splice variants of CD40 and its prognostic value in breast cancer. *Turk J Biol.* 2020 Apr 2;44(2):73-81.

Van Doorslaer K, Chen Z, Bernard HU, Chan PKS, DeSalle R, Dillner J, et al, Ictv Report Consortium. ICTV Virus Taxonomy Profile: Papillomaviridae. *J Gen Virol.* 2018.

van Kooten C, Gaillard C, Galizzi JP., Hermann P, Fossiez F, Banchereau J, et al. B cells regulate expression of CD40 ligand on activated T cells by lowering the mRNA level and through the release of soluble CD40. *Eur. J. Immunol.* 1994; 24: 787–792.

van Kooten C, Banchereau J. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol.* 2000; 67(1):2-17.

Vardouli L, Lindqvist C, Vlahou K, Loskog AS, Eliopoulos AG. Adenovirus delivery of human CD40 ligand gene confers direct therapeutic effects on carcinomas. *Cancer Gene Ther.* 2009; 16(11):848-60.

Vidal CI, Mintz PJ, Lu K, Ellis LM, Manenti L, Giavazzi R, et al. An HSP90-mimic peptide revealed by fingerprinting the pool of antibodies from ovarian cancer patients. *Oncogene.* 2004; 23(55):8859-67.

Villa LL. HPV prophylactic vaccination: The first years and what to expect from now. *Cancer Lett.* 2011; 305:106-12.

Villa-Mancera A, Reynoso-Palomar A, Utrera-Quintana F, Carreón-Luna L. Cathepsin L1 mimotopes with adjuvant Quil A induces a Th1/Th2 immune response and confers significant protection against *Fasciola hepatica* infection in goats. *Parasitol Res.* 2014; 113(1):243-50.

Villa-Mancera A, Olivares-Pérez J, Olmedo-Juárez A, Reynoso-Palomar A. Phage display-based vaccine with cathepsin L and excretory-secretory products mimotopes of *Fasciola hepatica* induces protective cellular and humoral immune responses in sheep. *Vet Parasitol.* 2021; 289:109340.

Vinokurova S, Wentzensen N, Kraus I, Klaes R, Driesch C, Melsheimer P, et al. Type-dependent integration frequency of human papillomavirus genomes in cervical lesions. *Cancer Res.* 2008;

68(1):307–13.

Voorzanger-Rousselot N, Blay JY. Coexpression of CD40 and CD40L on B lymphoma and carcinoma cells: an autocrine anti-apoptotic role. *Leuk Lymphoma*. 2004; 45(6):1239-45.

Vonderheide RH, Dutcher JP, Anderson JE, Eckhardt SG, Stephans KF, Razvillas B, et al.. Phase I study of recombinant human CD40 ligand in cancer patients. *J. Clin. Oncol*. 2001; 19:3280–87.

Vonderheide RH. Prospect of targeting the CD40 pathway for cancer therapy. *Clin Cancer Res*. 2007;13(4):1083-1088.

Vonderheide RH. CD40 Agonist Antibodies in Cancer Immunotherapy. *Annu Rev Med*. 2020; 71:47-58.

von Knebel Doeberitz M. New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. *Eur J Cancer*. 2002; 38(17):2229-42.

Wainstein AJ, Calabrich A, Melo AC, Buzaid AC, Katz A, Anjos CA, et al. Brazilian guidelines for the management of immune-related adverse events associated with checkpoint inhibitors. *Braz J Oncol*. 2017;13:1-15.

Wang LF, Yu M. Epitope mapping using phage-display random fragment libraries. *Methods Mol Biol*. 2009;524:315-32.

Wang M, Zhao J, Zhang L, Wei F, Lian Y, Wu Y, et al. Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *J Cancer*. 2017; 8(5):761-773.

Woodman CBJ, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat. Rev. Cancer*, 7:11-22, 2007.

World Health Organization. Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer. Fact sheet, 2022.

Yan C, Saleh N, Yang J, Nebhan CA, Vilgelm AE, Reddy EP, et al. Novel induction of CD40 expression by tumor cells with RAS/RAF/PI3K pathway inhibition augments response to checkpoint blockade. *Mol Cancer*. 2021;20(1):85.

Yu T, Ferber MJ, Cheung TH, Chung TKH, Wong YF, Smith DI. The role of viral integration in the development of cervical cancer. *Cancer Genet Cytogenet*. 2005;158(1):27–34.

Zhang B, Li P, Wang E, Brahmī Z, Dunn KW, Blum JS, et al. The E5 protein of human papillomavirus type 16 perturbs MHC class II antigen maturation in human foreskin keratinocytes

treated with interferon- γ . *Virology*. 2003;310(1):100–8.

Zhang B, Wu T, Chen M, Zhou Y, Yi D, Guo R. The CD40/CD40L system: a new therapeutic target for disease. *Immunol Lett*. 2013;153(1-2):58-61.

Zhou JZ, Jou J, Cohen E. Vaccine Strategies for Human Papillomavirus-Associated Head and Neck Cancers. *Cancers (Basel)*. 2021; 14(1):33.

Zhou J, Li Y, Liu Z, Qian W, Chen Y, Qi Y, et al. Induction of anti-Zearalenone immune response with mimotopes identified from a phage display peptide library. *Toxicon*. 2021; 199:1-6.

zur Hausen H. Papillomavirus infections — a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer*. 1996; 1288(2):F55–78.

zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(5):342–50.

8 ANEXOS

ANEXO A

Súmula Curricular – Gabriela Ávila de Grazia

Informações pessoais

Nome: Gabriela Ávila de Grazia (nome - casada) / Gabriela Ávila Fernandes Silva (nome - solteira)

Data de nascimento: 8 de dezembro de 1988

e-mail: gabriela.avilafs@gmail.com

Curriculum Lattes: <http://lattes.cnpq.br/0600311205997366>

Formação Acadêmica**Doutorado (Set/2018 - em curso)**

Departamento de Radiologia e Oncologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), São Paulo, Brasil.

“Caracterização de um peptídeo selecionado por Phage Display com atividade anti-tumoral”

Mestrado (Dez/2015-Mai/2018)

Departamento de Radiologia e Oncologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), São Paulo, Brasil.

“Estudo do papel da proteína Superóxido Dismutase 2 (SOD2) no processo de transformação celular mediado por HPV.” – Projeto FAPESP, processo: #2015/26327-1.

Especialização (Mai/2022 - em curso)

MBA em Gestão de Projetos - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo (Esalq-USP), São Paulo, Brasil.

Iniciação científica (Jan/2012-Nov/2014)

Departamento de Bioquímica - Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQUSP), São Paulo, Brasil.

“Identificação de novas interações proteína-proteína da PKC β I.” – Projeto FAPESP, processo: #2012/17279-5.

Graduação (Fev/2011- Dez/2014)

Bacharel em Química - Faculdades Oswaldo Cruz (FOC) – São Paulo, SP, Brasil.

“Identificação de novas interações proteína-proteína da PKC β I”

Formação Complementar

2015 – Curso Básico de Radioproteção – Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP)

2015 - Cervical Cancer Prevention Course (e-oncologia), elaborado pelo Institut Català d'Oncologia e pela International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO).

2016 – Radicais livres em sistemas biológicos – Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQUSP).

2016 - Mecanismos de carcinogênese – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

2016 – Cell Biology: Mitochondria – Harvard University.

2016 - Curso de Biossegurança e Pesquisa com Organismos Geneticamente Modificados - Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP).

2019 - Imunobiologia dos tumores - Universidade de São Paulo (USP).

2019 - Metodologia de Ensino I: Preparação Pedagógica - Universidade de São Paulo (USP).

2022 - Curso Online de Boas Práticas Clínicas (2a edição) - Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

2022 - Curso Introdutório de Pesquisa Clínica - Hospital Alemão Oswaldo Cruz (HAOC).

Monitoria pedagógica

- Monitora do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino - PAE - da Universidade de São Paulo (USP) – Mar/2021 – Jul/2021

Monitora pedagógica na disciplina Integração das Principais Doenças e Situações Infecciosas e Medicina Preventiva.

- Monitora do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino - PAE - da Universidade de São Paulo (USP) – Fev/ 2020 – Jun/2020

Monitora na disciplina Integração das Principais Doenças e Situações Infecciosas e Medicina Preventiva.

Histórico profissional

Pesquisa básica:

2018- atual: aluna de doutorado do Laboratório de Inovação em Câncer do Centro de Investigação Translacional em Oncologia do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP).

2015-2018: aluna de mestrado do Laboratório de Inovação em Câncer do Centro de Investigação Translacional em Oncologia do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP).

2012-2014: aluna de iniciação científica do Laboratório de Sinalização Celular do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQUSP).

Publicações

Artigos completos publicados em periódicos:

- Lorenzi, Noely PC; Termini, Lara ; Ferreira-Filho, Edson S ; Nunes, Rafaella AL ; **Silva, Gabriela AF** ; Lepique, Ana P ; Longatto-Filho, Adhemar ; Tacla, Maricy ; Baracat, Edmund C;

Villa, Luisa L ; Soares-Júnior, José M . A positive HPV test with positive p16/Ki67 double staining in self-sampled vaginal material is an accurate tool to detect women at risk for cervical cancer. *Cancer Cytopathology*, v. 2021, p. 1-14, 2021.

- Nunes, Emily Montosa; Talpe-Nunes, Valéria; Sobrinho, João Simão; Ferreira, Silvaneide; Lino, Vanesca de Souza; Termini, Lara; **Silva, Gabriela Ávila Fernandes**; Boccardo, Enrique; Villa, Luisa Lina; Sichero, Laura . E6/E7 functional differences among two natural human papillomavirus 18 variants in human keratinocytes. *Viruses-basel*, v. 13, p. 1114, 2021.

- Talarico, Maria Cecília Ramiro; Nunes, Rafaella Almeida Lima; **Silva, Gabriela Ávila Fernandes**; Costa, Larissa Bastos Eloy da; Cardoso, Marcella Regina; Esteves, Sérgio Carlos Barros; Sarian, Luis Otávio Zanatta; Zeferino, Luiz Carlos; Termini, Lara. High Expression of SOD2 Protein Is a Strong Prognostic Factor for Stage IIIB Squamous Cell Cervical Carcinoma. *Antioxidants*, v. 10, p. 724, 2021.

- **Silva, Gabriela Ávila Fernandes**; Nunes, Rafaella Almeida Lima; Morale, Mirian Gallote; Boccardo, Enrique; Aguayo, Francisco; Termini, Lara. Oxidative Stress: Therapy approaches for cervical cancer treatment. *Clinics*, v. 73, p. e548s, 2018.

- Nunes, Rafaella Almeida Lima; Morale, Mirian Gallote; **Silva, Gabriela Ávila Fernandes**; Villa, Luisa Lina; Lara Termini. Innate Immunity and HPV: friends or foes. *Clinics*, v. 73, p.e549s, 2018.

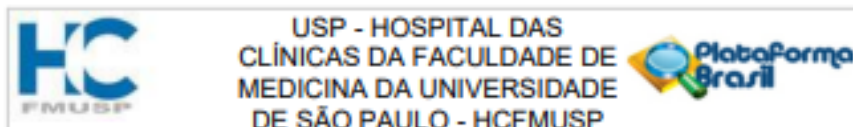
-Pena, Darlene Aparecida; Andrade, Victor Piana de ; **Silva, Gabriela Ávila Fernandes**; Neves, José Ivanildo ; Oliveira, Paulo Sergio Lopes de ; Alves, Maria Julia Manso ; Devi, Lakshmi A.; Schechtman, Deborah . Rational design and validation of an anti-protein kinase C active-state specific antibody based on conformational changes. *Scientific Reports* , v. 6, p.2114, 2016.

Capítulos de livros publicados:

Silva, GAF; Tortelli Junior, TC; Antunes, F. Metabolismo da célula tumoral. *Oncologia - Da molécula à Clínica*. 1 ed.São Paulo: Editora dos Editores, 2022, v. 1, p. 189-209.

ANEXO B

**Documento fornecido pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo declarando ciência perante a execução do Projeto CAAE:
41737420.0.0000.0068**



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Caracterização de um peptídeo selecionado por Phage Display com atividade anti-tumoral

Pesquisador: Luisa Lina Villa

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 41737420.0.0000.0068

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.062.214

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de pesquisa apresentado como requisito para ingresso em curso de pós-graduação em Oncologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) - Doutorado.

O presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito do bacteriófago recombinante em linhagens celulares derivadas de câncer de colo do útero e de cabeça e pescoço, bem como em soros e linfócitos femininos derivados de pacientes com neoplasia intraepitelial cervical positiva para HPV. Essas linhagens celulares, os soros e os linfócitos serão utilizados em ensaios de ligação, dot blot, citometria de fluxo e imunocitoquímica. As linhagens celulares também serão utilizadas nas etapas de identificação de receptor celular, ensaios de invasão, migração, crescimento e proliferação celulares.

Objetivo da Pesquisa:

Emenda com alteração do título do projeto: Caracterização de um peptídeo selecionado por Phage Display com atividade anti-tumoral.

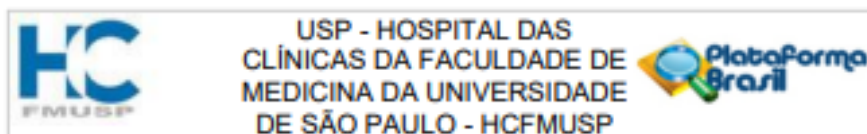
Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Não se aplica

Benefícios: Não se aplica

Metodologia de Análise de Dados: Os resultados serão representados como média e desvio padrão

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira César **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SÃO PAULO
Telefone: (11)2061-7585 **Fax:** (11)2061-7585 **E-mail:** cappelq adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: S.082.214

e

analisados usando ANOVA com $p < 0,05$ para indicar diferenças estatísticas entre os grupos.

Desfecho Primário:

Caracterizar o efeito do bacteriófago recombinante em soros e linfócitos femininos derivados de pacientes com neoplasia intraepitelial cervical positiva para HPV linhagens e em linhagens celulares derivadas de câncer de colo do útero e de cabeça e pescoço.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Solicitada a dispensa de TCLE porque serão utilizadas, neste estudo, linhagens celulares estabelecidas, mantidas em laboratórios de todo o mundo há vários anos, obtidas comercialmente de bancos de células internacionais como a ATCC, bem como amostras de soros de um biorepositório, proveniente do estudo prospectivo de HPV e

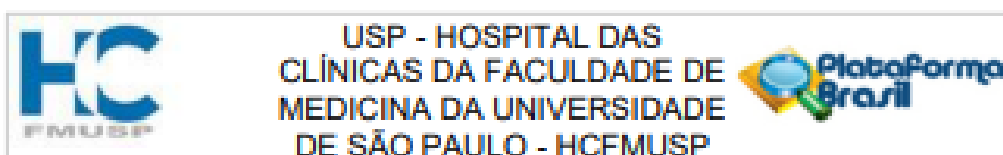
neoplasia cervical (coorte de Ludwig Mc-Gill) realizado há 30 anos. Diante da impossibilidade absoluta de recontactar as voluntárias daquele estudo,

solicitamos dispensa de resubmissão de consentimento. Além disso, serão utilizadas, neste estudo, linhagens celulares estabelecidas, mantidas em laboratórios de todo o mundo há vários anos, obtidas comercialmente de bancos de células internacionais como a ATCC (American Type Culture Collection). Linhagem estabelecida de células HeLa: células derivadas de adenocarcinoma de colo de útero

positivas para HPV 18. Linhagem estabelecida de células SiHa: células derivadas de carcinoma de células escamosas de colo de útero

positivas para HPV 16. Linhagem estabelecida de células C33: linhagem tumoral de colo uterino negativa para HPV. Linhagem de células SCC 154:

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira César **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2061-7585 **Fax:** (11)2061-7585 **E-mail:** cappelacq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 5.092.216

linhagem de carcinoma escamoso de cabeça e pescoço HPV positiva. Linhagem de células SCC78: linhagem de carcinoma escamoso de cabeça e pescoço HPV negativa. O número de participantes a pesquisa preenchido como "06", refere-se ao número de linhagens celulares estabelecidas (5 linhagens) e ao soro obtido no estudo de coorte Ludwig McGill que serão utilizados.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Possui aprovação da CCEP, parecer de uso de dados digitais assinado negando uso destes.

Não haverá uso de fontes secundárias de dados (prontuários, dados demográficos, etc).

Não haverá retenção de amostras para armazenamento em banco.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

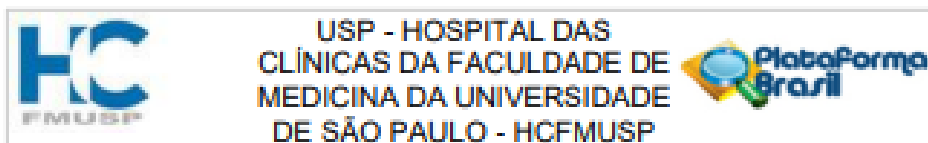
Serão utilizadas amostras de soros de pacientes de um biorepositório de um projeto realizado há 30 anos pela responsável do projeto, proveniente do estudo prospectivo Ludwig McGill e linhagens celulares derivadas de tumores de colo uterino e cabeça e pescoço.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1848937_É2.pdf	26/10/2021 09:05:32		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_doutorado_versao_final_novo_titulo.pdf	04/08/2021 11:28:35	Luisa Lina Villa	Aceito
Outros	emenda_Cappesq.pdf	04/08/2021 11:25:10	Luisa Lina Villa	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto_PB_nvo_titulo_com_todas_asassinaturas.pdf	12/07/2021 13:35:26	Luisa Lina Villa	Aceito
Outros	dadosdigitais.pdf	06/01/2021 09:51:25	Aline Soares de Lima	Aceito
Outros	regbiorepositorio.doc	06/01/2021 09:50:58	Aline Soares de Lima	Aceito
Outros	CRONOGRAMA.docx	06/01/2021 09:48:06	Aline Soares de Lima	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	22/12/2020 11:50:01	Luisa Lina Villa	Aceito

Endereço: Rua Cívico Pires de Campos, 225 5º andar
 Bairro: Cerqueira César 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



Continuação do Parecer: 5.062.214

Recurso Anexado pelo Pesquisador	recursos.pdf	06/10/2020 11:03:30	Luiza Lina Villa	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	dispensatcle.pdf	06/10/2020 11:00:16	Luiza Lina Villa	Aceito
Solicitação registrada pelo CEP	cep.pdf	06/10/2020 10:58:37	Luiza Lina Villa	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 26 de Outubro de 2021

Assinado por:
Joel Fainbuch
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 325 5º andar
Bairro: Cerqueira César **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2061-7585 **Fax:** (11)2061-7585 **E-mail:** cappelq.adm@hc.fm.usp.br

Anexo C- Documento fornecido pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo declarando ciência perante a execução do Projeto CAAE: 6373918.1.3002.0065.



Departamento de Radiologia e Oncologia
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, s/nº
CEP 05403-010
São Paulo - SP - Brasil
Fone (11) 2661-7861

São Paulo, 28 de março de 2021.

Carta de anuência para participação em projeto de pesquisa

Declaro estar de ciência e de acordo com o projeto "Avaliação do potencial imunomodulador de células mielóides circulantes de pacientes com câncer cervical", sob a responsabilidade da Profa. Ana Paula Lepique do Instituto de Ciências Biomédicas, USP, CAAE: 06373918.1.3002.0065.

Declaro ciência e cumprimento das Resoluções Éticas Brasileiras, em especial a Resolução CNS No. 466 de 12 de dezembro de 2021. Assumo compromisso no resguardo da segurança e bem-estar dos participantes do projeto de pesquisa nela recrutados.


Profª Dra Luisa Lina Villa
Dra. Luisa Lina Villa
Deptº Radiologia e Oncologia
Faculdade de Medicina, USP


Gabriela Ávila Fernandes Silva

Anexo D- Documento fornecido pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo declarando ciência perante a execução do Projeto “Validação da avaliação do perfil de expressão gênica de dois subtipos de câncer de colo uterino : carcinoma escamoso e adenocarcinoma” - Protocolo de Pesquisa n° 282/18



APROVAÇÃO

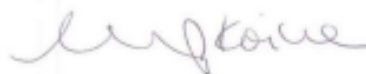
O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 08/08/2018, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 282/18 intitulado: “Validação da avaliação do perfil de expressão gênica de dois subtipos de câncer de colo uterino : carcinoma escamoso e adenocarcinoma.” apresentado pelo Departamento Radiologia e Oncologia.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 466/12, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: Profa Dra. Luisa Lina Villa

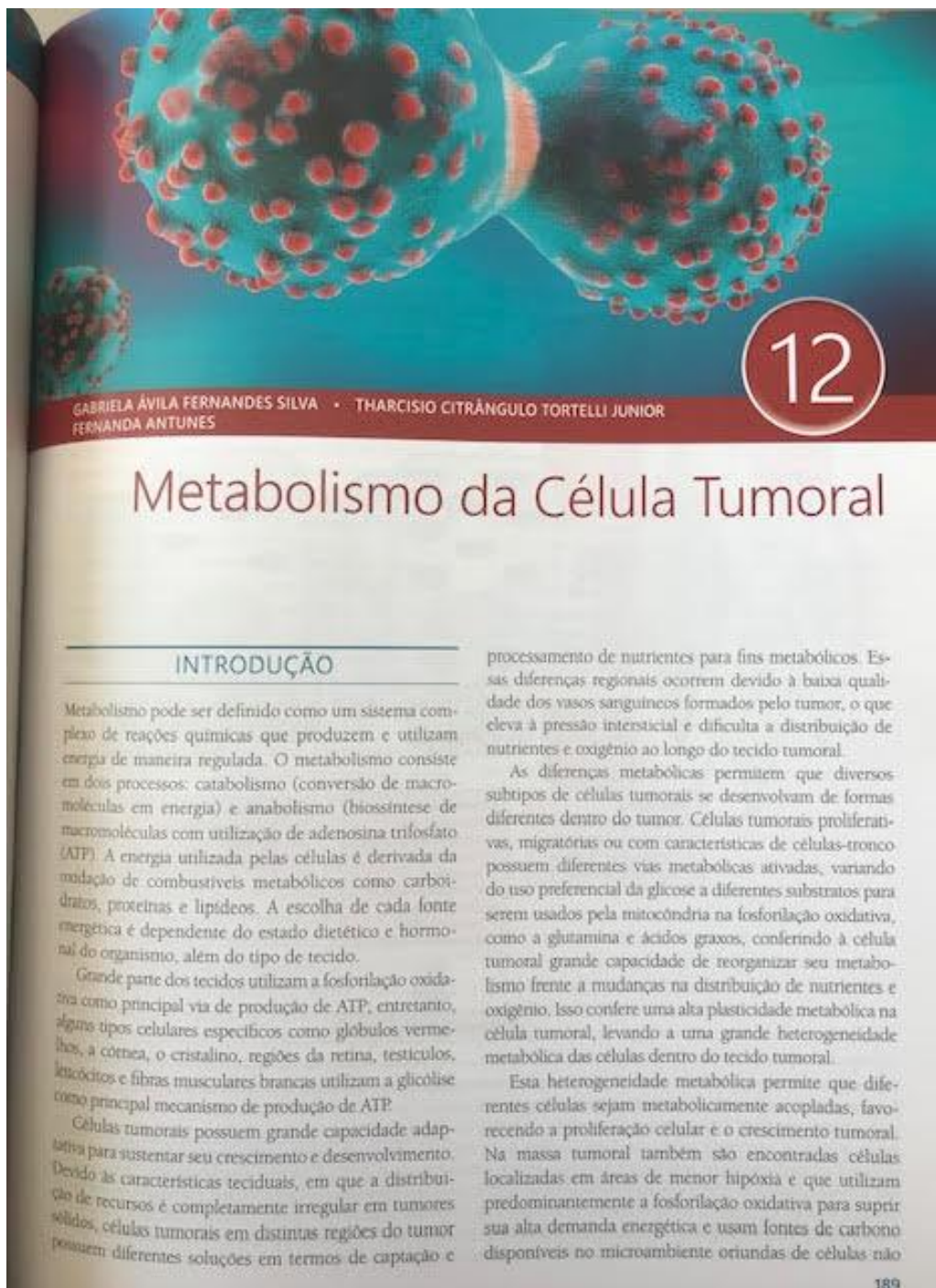
Pesquisador (a) Executante: Profa Dra. Laura Sichero

CEP-FMUSP, 08 de Agosto de 2018.



Profa. Dra. Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

**ANEXO E - Autora do capítulo “Metabolismo da célula tumoral” do livro “Oncologia -
Da molécula à Clínica”**



GABRIELA ÁVILA FERNANDES SILVA • THARCISIO CITRÂNGULO TORTELLI JUNIOR
 FERNANDA ANTUNES

12

Metabolismo da Célula Tumoral

INTRODUÇÃO

Metabolismo pode ser definido como um sistema complexo de reações químicas que produzem e utilizam energia de maneira regulada. O metabolismo consiste em dois processos: catabolismo (conversão de macromoléculas em energia) e anabolismo (biossíntese de macromoléculas com utilização de adenosina trifosfato (ATP). A energia utilizada pelas células é derivada da oxidação de combustíveis metabólicos como carboidratos, proteínas e lipídeos. A escolha de cada fonte energética é dependente do estado dietético e hormonal do organismo, além do tipo de tecido.

Grande parte dos tecidos utilizam a fosforilação oxidativa como principal via de produção de ATP; entretanto, alguns tipos celulares específicos como glóbulos vermelhos, a córnea, o cristalino, regiões da retina, testículos, leucócitos e fibras musculares brancas utilizam a glicólise como principal mecanismo de produção de ATP.

Células tumorais possuem grande capacidade adaptativa para sustentar seu crescimento e desenvolvimento. Devido às características teciduais, em que a distribuição de recursos é completamente irregular em tumores sólidos, células tumorais em distintas regiões do tumor possuem diferentes soluções em termos de captação e

processamento de nutrientes para fins metabólicos. Essas diferenças regionais ocorrem devido à baixa qualidade dos vasos sanguíneos formados pelo tumor, o que eleva a pressão intersticial e dificulta a distribuição de nutrientes e oxigênio ao longo do tecido tumoral.

As diferenças metabólicas permitem que diversos subtipos de células tumorais se desenvolvam de formas diferentes dentro do tumor. Células tumorais proliferativas, migratórias ou com características de células-tronco possuem diferentes vias metabólicas ativadas, variando do uso preferencial da glicose a diferentes substratos para serem usados pela mitocôndria na fosforilação oxidativa, como a glutamina e ácidos graxos, conferindo à célula tumoral grande capacidade de reorganizar seu metabolismo frente a mudanças na distribuição de nutrientes e oxigênio. Isso confere uma alta plasticidade metabólica na célula tumoral, levando a uma grande heterogeneidade metabólica das células dentro do tecido tumoral.


Esta heterogeneidade metabólica permite que diferentes células sejam metabolicamente acopladas, favorecendo a proliferação celular e o crescimento tumoral. Na massa tumoral também são encontradas células localizadas em áreas de menor hipóxia e que utilizam predominantemente a fosforilação oxidativa para suprir sua alta demanda energética e usam fontes de carbono disponíveis no microambiente oriundas de células não

ANEXO F - Co-autora do artigo “High Expression of SOD2 Protein Is a Strong Prognostic Factor for Stage IIB Squamous Cell Cervical Carcinoma”



Article

High Expression of SOD2 Protein Is a Strong Prognostic Factor for Stage IIIB Squamous Cell Cervical Carcinoma

Maria Cecília Ramiro Talarico¹ , Rafaella Almeida Lima Nunes², Gabriela Ávila Fernandes Silva², Larissa Bastos Eloy da Costa³, Marcella Regina Cardoso¹, Sérgio Carlos Barros Esteves⁴, Luis Otávio Zanatta Sarian¹, Luiz Carlos Zeferino^{1,*,†} and Lara Termini^{2,*,†}

¹ Department of Obstetrics and Gynecology, Division of Gynecologic and Breast Oncology, School of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP—Universidade Estadual de Campinas), Campinas, São Paulo 13081970, Brazil; mcecilia_r@hotmail.com (M.C.R.T.); mrcardoso@mg.harvard.edu (M.R.C.); sarian@unicamp.br (L.O.Z.S.)

² Centro de Investigação Translacional em Oncologia, Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo 05403911, Brazil; rafaellaln300@gmail.com (R.A.L.N.); gabriela.avila@hc.fm.usp.br (G.Á.F.S.)

³ Department of Pathology, State University of Campinas (UNICAMP—Universidade Estadual de Campinas), Campinas, São Paulo 13083887, Brazil; lbelay@unicamp.br

⁴ Department of Radiotherapy, Division of Gynecologic and Breast Oncology, Women's Hospital Professor Doutor José Aristodemo Pinotti—Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM), State University of Campinas (UNICAMP—Universidade Estadual de Campinas), Campinas, São Paulo 13083881, Brazil; sergiocb@unicamp.br

* Correspondence: zeferino@unicamp.br (L.C.Z.); lara.termini@hc.fm.usp.br (L.T.); Tel.: +55-19-3521-9516 (L.C.Z.)

† These authors contributed equally to this work.



Citation: Talarico, M.C.R.; Nunes, R.A.L.; Silva, G.Á.F.; Costa, L.B.E.d.; Cardoso, M.R.; Esteves, S.C.B.; Zanatta Sarian, L.O.; Zeferino, L.C.; Termini, L. High Expression of SOD2 Protein Is a Strong Prognostic Factor for Stage IIIB Squamous Cell Cervical Carcinoma. *Antioxidants* **2021**, *10*, 724. <https://doi.org/10.3390/antiox10050724>

Academic Editor: John Richie

Received: 26 March 2021

Accepted: 30 April 2021

Published: 5 May 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: High superoxide dismutase 2 (SOD2) expression is associated with a poor prognosis at many cancer sites, the presence of metastases, and more advanced cervical cancer. This study aims to determine whether SOD2 protein expression is associated with the prognosis of stage IIIB cervical carcinoma. **Methods:** sixty-three patients with stage IIIB squamous cell cervical carcinoma were included. The evaluation of SOD2 expression by immunohistochemistry was based on a positive cell ratio score and the staining intensity score. Taking disease recurrence and death as endpoints, receiver operating characteristic curves were used to discriminate between high and low SOD2 expression. **Results:** high SOD2 expression was associated with recurrence ($p = 0.001$), distant recurrence ($p = 0.002$), and death ($p = 0.005$). A multivariate analysis showed that patients with high SOD2 expression had a threefold increased risk for recurrence (HR = 3.16; 1.33–7.51) and death (HR = 2.98; 1.20–7.40) compared with patients who had low SOD2 expression. Patients with high SOD2 expression had shorter disease-free survival ($p = 0.001$) and overall survival ($p = 0.003$) than patients with low SOD2 expression. **Conclusion:** high SOD2 expression is a strong prognostic factor for stage IIIB squamous cell carcinoma of the cervix and could be used as a prognostic marker in women with cervical carcinoma.

Keywords: biomarkers; tumor; superoxide dismutase 2; antioxidants; uterine cervical neoplasms; survival analysis; prognosis

1. Introduction

Cervical cancer is a very common malignant neoplastic disease, which is treatable even at advanced stages and has more than 600,000 new cases diagnosed each year worldwide [1]. The development of clinical tools for the diagnosis, treatment, and follow-up of malignant neoplasms may help improve the outcome and may benefit patients.

Currently, HPV (human papillomavirus) testing, cytology, or a combination of HPV testing cytology are the major means to screen a population for cervical cancer [2]. Having

ANEXO G - Co-autora do artigo “E6/E7 Functional Differences among Two Natural Human Papillomavirus 18 Variants in Human Keratinocytes”

Article

E6/E7 Functional Differences among Two Natural Human Papillomavirus 18 Variants in Human Keratinocytes

Emily Montosa Nunes ¹, Valéria Talpe-Nunes ¹, João Simão Sobrinho ¹, Silvaneide Ferreira ¹,
 Vanesca de Souza Lino ², Lara Termini ¹, Gabriela Ávila Fernandes Silva ¹, Enrique Boccardo ²,
 Luisa Lina Villa ^{1,3} and Laura Sichero ^{1,*}

¹ Center for Translational Research in Oncology, Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), São Paulo 01246-000, Brazil; emontosa.biotech@gmail.com (E.M.N.); valeria.talpe.nunes@gmail.com (V.T.-N.); simao.sob@gmail.com (J.S.S.); silvaneide.ferreira@hc.fm.usp.br (S.F.); terminilara@gmail.com (L.T.); galbi-avila@hotmail.com (G.Á.F.S.); lvilla@hc.fm.usp.br (L.L.V.)

² Department of Microbiology, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo 05508-900, Brazil; vanesca_lino@hotmail.com (V.d.S.L.); eboccardo@usp.br (E.B.)

³ Department of Radiology and Oncology, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo 01246-000, Brazil

* Correspondence: laura.sichero@hc.fm.usp.br; Tel.: +55-11-3893-3010



Citation: Nunes, E.M.; Talpe-Nunes, V.; Sobrinho, J.S.; Ferreira, S.; Lino, V.d.S.; Termini, L.; Silva, G.Á.F.; Boccardo, E.; Villa, L.L.; Sichero, L. E6/E7 Functional Differences among Two Natural Human Papillomavirus 18 Variants in Human Keratinocytes. *Viruses* **2021**, *13*, 1114. <https://doi.org/10.3390/v13061114>

Academic Editor: Elizabeth White

Received: 9 April 2021

Accepted: 1 June 2021

Published: 10 June 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: It is suggested that HPV-18 variants from the A lineage have higher oncogenic potential compared to B variants. Some studies show uneven distribution of HPV-18 variants in cervical adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. Regarding HPV-18 variants' functions, the few studies reported focus on E6, and none were performed using natural host cells. Here, we immortalized primary human keratinocytes (PHKs) with E6/E7 of HPV-18 A1 and B1 sublineages and functionally characterized these cells. PHK18A1 reached immortalization significantly faster than PHK18B1 and formed a higher number of colonies in monolayer and 3D cultures. Moreover, PHK18A1 showed greater invasion ability and higher resistance to apoptosis induced by actinomycin-D. Nevertheless, no differences were observed regarding morphology, proliferation after immortalization, migration, or epithelial development in raft cultures. Noteworthy, our study highlights qualitative differences among HPV-18 A1 and B1 immortalized PHKs: in contrast to PHK18A1, which formed more compact colonies and spheroids of firmly grouped cells and tended to invade and migrate as clustered cells, morphologically, PHK18B1 colonies and spheroids were looser, and migration and invasion of single cells were observed. Although these observations may be relevant for the association of these variants with cervical cancer of different histological subtypes, further studies are warranted to elucidate the mechanisms behind these findings.

Keywords: HPV-18; oncogenic potential; molecular variant; cell transformation; immortalization

1. Introduction

Human papillomavirus (HPV) responds for virtually all cases of cervical cancer (CC). Worldwide, cervical squamous cell carcinomas (SCCs) are primarily associated with HPV-16 infection (60%), while HPV-16 and -18 are similarly prevalent in adenocarcinomas (ADCs) [1]. Based on a fragment of the long control region (LCR), HPV-18 genetic variants were initially classified into three branches of phylogenetic and geographical relatedness: African (Af), Amerindian (As + AI or American Indian or East Asian), and European (E) [2]. More recently, the nomenclature of HPV-18 variants was revised, and these are now categorized into variant lineages (1–2% sequence difference; designated by letters) and sublineages (0.5–1% sequence difference; designated by numbers) based on whole-genome sequencing. Thus, now while A1/A2 and A3/A4 HPV-18 sublineages correspond to previously nominated As + AI and E variants, respectively, the HPV-18 B lineage comprises previously nominated Af variants [3,4].

ANEXO H - Co-autora do artigo “A Positive HPV Test With Positive p16/Ki-67 Double Staining in Self-Sampled Vaginal Material Is an Accurate Tool to Detect Women at Risk for Cervical Cancer ”

A Positive HPV Test With Positive p16/Ki-67 Double Staining in Self-Sampled Vaginal Material Is an Accurate Tool to Detect Women at Risk for Cervical Cancer

Noely P. C. Lorenzi, MD, PhD^{1,2}; Lara Termini, PhD³; Edson S. Ferreira-Filho, MD^{1,4};
Rafaella A. L. Nunes, PhD⁵; Gabriela A. F. Silva, MSc³; Ana P. Lepique, PhD⁵;
Adhemar Longatto-Filho, PhD^{6,7,8,9,10}; Maricy Tacla, MD, PhD⁴; Edmund C. Baracat, MD, PhD^{1,4};
Luisa L. Villa, PhD¹¹; and José M. Soares-Júnior, MD, PhD^{1,4}

BACKGROUND: The development of efficient strategies for managing high-risk human papillomavirus (HR-HPV)-positive women is a major challenge when human papillomavirus-based primary screening is being performed. The objectives of this study were to evaluate the comparative effectiveness of HR-HPV testing based on self-collection (SC) and HR-HPV testing based on collection by a health professional (HP) and to assess the potential usefulness of HR-HPV testing combined with testing with the biomarkers p16/Ki-67, α -mannosidase, and superoxide dismutase 2 (SOD2). **METHODS:** This was a cross-sectional study of 232 women admitted for colposcopy because of an abnormal Papanicolaou smear. The collected material underwent liquid-based cytology, HR-HPV detection, and immunocytochemical testing (p16/Ki-67, α -mannosidase, and SOD2). The gold standard was the histopathological result; the positive reference was CIN2+. **RESULTS:** The overall accuracy of HR-HPV testing was 76.6%; the results for the SC group (78.1%) and the HP group (75.2%) were similar. The positive predictive values (HP, 76.5%; SC, 80.0%), the negative predictive values (HP, 66.7%; SC, 64.3%), the positive likelihood values (HP, 1.35; SC, 1.36), and the negative likelihood values (HP, 0.2; SC, 0.19) were also similar. p16/Ki-67 showed higher sensitivity than the other 2 biomarkers: 78.1% versus 45.8% for α -mannosidase and 44.5% for SOD2. The specificities of the biomarkers were equivalent: 71.4% for p16/Ki-67, 77.8% for α -mannosidase, and 71.2% for SOD2. In the HP group, accuracy also leaned more heavily toward the final score (using α -mannosidase and SOD2) without statistical significance (80.8% vs 77.9%). The contrast with the SC group yielded the same level of accuracy. **CONCLUSIONS:** SC, when associated with testing with biomarkers, is as accurate as collection by HPs in the detection of women at risk for cervical cancer. *Cancer Cytopathol* 2021;0:1-14. © 2021 American Cancer Society.

KEY WORDS: α -mannosidase; biomarkers; cervical cancer screening; human papillomavirus (HPV); p16/Ki-67; superoxide dismutase 2; vaginal self-collection.

INTRODUCTION

Cervical cancer remains the most common cause of cancer-related death among women in several developing countries and is responsible for a serious public health issue.¹ In Brazil, it is estimated that the 2020-2022 triennium will show 16,590 new cervical cancer cases yearly and an approximate incidence of 17.11 cases per 100,000 women.² The disease tops the list of cancers affecting women in northern Brazil with an incidence

Corresponding Author: Noely P. C. Lorenzi, MD, PhD, Hospital Universitário, Avenida Professor Lineu Prestes 2565, São Paulo, SP, 05508-000, Brazil (noelylorenzi@gmail.com).

¹Disciplina de Ginecologia, Departamento de Obstetrícia e Ginecologia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil; ²Departamento de Ginecologia, Hospital Universitário, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil; ³Center for Translational Investigation in Oncology, Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil; ⁴Divisão de Clínica Ginecológica, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil; ⁵Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil; ⁶Molecular Oncology Research Center, Barretos Cancer Hospital/Pio XII Foundation, São Paulo, Brazil; ⁷Medical Laboratory of Medical Investigation 14, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil; ⁸Department of Pathology, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil; ⁹Research Institute of Life and Health Sciences, University of Minho, Braga, Portugal; ¹⁰BICVS/381—Associated Laboratory to the Government of Portugal, Braga/Guimarães, Portugal; ¹¹Department of Radiology and Oncology, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

Received: May 31, 2021; **Revised:** July 13, 2021; **Accepted:** July 15, 2021

Published online Month 00, 2021 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com)

DOI: 10.1002/cncy.22498, wileyonlinelibrary.com