

ROBERTA LIBERATO PAGNI

Papel da indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) na oncogênese e imunossupressão de tumores associados ao Papilomavírus Humano (HPV)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Profa Dra. Ana Carolina Ramos Moreno

Co-orientador: Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira

Versão original.

São Paulo

2020

RESUMO

PAGNI, R.L. **Papel da indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) na oncogênese e imunossupressão de tumores associados ao Papilomavírus Humano (HPV)**. 2020. 98 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

A imunoterapia tornou-se um aliado importante na luta contra tipos distintos de câncer. No entanto, a plasticidade metabólica do ambiente tumoral frequentemente influencia a eficácia dos procedimentos terapêuticos. Nesse cenário, os adjuvantes imunometabólicos surgem como uma alternativa para o desenvolvimento de novas terapias contra o câncer. Evidências sólidas mostram que a enzima indoleamina 2,3 dioxigenase-1 (IDO1) é um importante mediador da evasão tumoral à resposta imunológica. Embora seja notável a semelhança entre os mecanismos de regulação de IDO1 e a assinatura molecular associada ao câncer cervical e outros tipos de tumores associados ao papilomavírus humano (HPV), o papel ativo de IDO1 nestes tumores ainda é pouco estudado. No presente trabalho, nos propusemos a estudar uma nova abordagem terapêutica para o tratamento de tumores associados HPV. A imunoterapia proposta apresenta duas frentes de tratamento: o 1-metil-triptofano (1-MT) e a vacina terapêutica gDE7, específica para HPV-16. Os inibidores de IDO (sendo o enantiômero D-1MT e mistura racêmica DL-1MT) foram escolhidos para compor com base em dados não-clínicos e clínicos como adjuvantes imunometabólicos de terapias antitumorais. A vacina gDE7, por sua vez, mostrou excelentes efeitos terapêuticos em condições experimentais baseadas em camundongos transplantados com células TC-1, uma linhagem tumoral murina que codifica as oncoproteínas E6 e E7 do HPV-16. Os principais aspectos identificados neste estudo foram: 1) IDO1 está presente e é enzimaticamente ativa em células tumorais TC-1, o que possibilita o uso desse modelo animal na busca por novas alternativas terapêuticas para tumores associados ao HPV; 2) Há um aumento da expressão de IDO1 em leucócitos intratumorais no curso do crescimento tumoral, o que favorece a instalação de um microambiente imunossupressor, e elege essa enzima como um alvo terapêutico em modelo de câncer associado ao HPV-16; 3) A ausência da expressão de IDO1 em leucócitos e células estromais, mas não em células tumorais, aumenta a eficiência da imunoterapia ativa, particularmente da vacina gDE7; 4) O uso de inibidores de IDO1, como o 1MT, em combinação com a vacina gDE7, favorece o controle da massa tumoral, mas não é suficiente para induzir a regressão total dos tumores; 5) A ausência de IDO1 tem um impacto direto na diminuição da expressão do receptor AhR em células dendríticas, o que pode impactar na modulação do fenótipo de células imunológicas, com consequente controle do crescimento da massa tumoral; 6) A ausência da expressão de interleucina-6 (IL-6) em leucócitos e células estromais, mas não nas células tumorais, atrasa o crescimento de tumores de células TC-1; 7) A associação de 1-MT com a vacina gDE7, quando administrado principalmente em animais deficientes em IL-6, favorece o controle da massa tumoral, o que sugere que IL-6 poderia também ser um alvo terapêutico e indica a necessidade de diferentes combinações terapêuticas para o sucesso do tratamento. Diante dos nossos achados experimentais, a combinação sem precedentes de inibidores de IDO com a vacina gDE7, principalmente em condições de ausência de IL-6, representa uma nova e promissora alternativa terapêutica para melhorar a eficácia de tratamentos de tumores associados ao HPV.

Palavras-chave: Papilomavírus humano, câncer cervical, indoleamina 2,3-dioxigenase, 1-metil-triptofano, vacina terapêutica.

ABSTRACT

PAGNI, R.L. **Role of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) in the oncogenesis and immunosuppression of tumors associated with Human Papillomavirus (HPV)**. 2020. 98 p. Masters thesis (Biotechnology) - Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2020.

Immunotherapy has become an important ally in the fight against different types of cancer. However, the metabolic plasticity of the tumor environment often influences the effectiveness of therapeutic procedures. In this scenario, immunometabolic adjuvants arise as an alternative for the development of new therapies against cancer. Solid evidence shows that the enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase-1 (IDO1) is an important mediator of tumor evasion to the immune response. Although the similarity between the mechanisms of regulation of IDO1 and the molecular signature associated with cervical cancer and other types of tumors associated with human papillomavirus (HPV) is remarkable, the active role of IDO1 in these tumors is still poorly studied. In the present work, we set out to study a new therapeutic approach for the treatment of tumors associated with HPV. The proposed immunotherapy has two treatment fronts: 1-methyl-tryptophan (1-MT) and the therapeutic vaccine gDE7, specific for HPV-16. The IDO inhibitors (being the D-1MT enantiomer and racemic mixture DL-1MT) were chosen to compose based on non-clinical and clinical data as immunometabolic adjuvants to antitumor therapies. The gDE7 vaccine, in turn, showed excellent therapeutic effects in experimental conditions based on mice transplanted with TC-1 cells, a murine tumor line that encodes the HPV-16 E6 and E7 oncoproteins. The main aspects identified in this study were: 1) IDO1 is present and is enzymatically active in TC-1 tumor cells, which allows the use of this animal model in the search for new therapeutic alternatives for tumors associated with HPV; 2) There is an increase in the expression of IDO1 in intratumor leukocytes in the course of tumor growth, which favors the installation of an immunosuppressive microenvironment, and elects this enzyme as a therapeutic target in a cancer model associated with HPV-16; 3) The absence of expression of IDO1 in leukocytes and stromal cells, but not in tumor cells, increases the efficiency of active immunotherapy, particularly of the gDE7 vaccine; 4) The use of IDO1 inhibitors, such as 1MT, in combination with the gDE7 vaccine, favors the control of the tumor mass, but it is not enough to induce the total regression of the tumors; 5) The absence of IDO1 has a direct impact on decreasing the expression of the AhR receptor in dendritic cells, which can impact the modulation of the immune cell phenotype, with consequent control of the growth of the tumor mass; 6) The absence of interleukin-6 (IL-6) expression in leukocytes and stromal cells, but not in tumor cells, slows the growth of TC-1 cell tumors; 7) The association of 1-MT with the gDE7 vaccine, when administered mainly to animals deficient in IL-6, favors the control of the tumor mass, which suggests that IL-6 could also be a therapeutic target and indicates the need for different therapeutic combinations for successful treatment. In view of our experimental findings, the unprecedented combination of IDO inhibitors with the gDE7 vaccine, especially in the absence of IL-6, represents a promising new therapeutic alternative to improve the effectiveness of treatments for tumors associated with HPV.

Key-words: Human papillomavirus, cervical cancer, indoleamine 2,3-dioxygenase, 1-methyl-tryptophan, therapeutic vaccine.

INTRODUÇÃO

- Papilomavírus Humano (HPV) e sua importância epidemiológica e na saúde pública como agente causal de câncer

Dentre as doenças não transmissíveis no século XXI, o câncer se classifica como a segunda principal causa de morte em todo o mundo, e se destaca como um dos maiores problemas de saúde pública devido à crescente incidência de casos (Bray *et.al.*, 2018). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), em uma pesquisa realizada pela Agência Internacional para Pesquisa do Câncer (IARC), somente em 2018, ocorreram cerca de 9,6 milhões de mortes relacionadas a esta doença, sendo as mais comuns o câncer de pulmão, próstata, colorretal, estômago e fígado em homens, enquanto em mulheres, mama, colorretal, pulmão, colo uterino e câncer de tireoide (IARC, 2018). Aproximadamente 70% dessas mortes ocorrem em países de baixa e média renda por conta de um diagnóstico tardio e da dificuldade de acessibilidade aos tratamentos (Araújo *et.al.*, 2018; Bray *et.al.*, 2018).

Vários tipos de câncer são atribuídos, em parte, às consequências de infecções crônicas por vírus ou bactérias, e estima-se que os microrganismos sejam responsáveis por cerca de 20 a 25% de todos os casos de câncer registrados globalmente (Damania, 2016). Dentre esses, aproximadamente 12% dos casos de cânceres humanos têm como fator causal infecções crônicas por vírus, como o vírus da hepatite B (hepatocarcinoma), vírus da hepatite C (hepatocarcinoma), vírus Epstein-Barr (Linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin, carcinoma de nasofaringe), herpes vírus tipo 8 (sarcoma de Kaposi), vírus T-linfotrófico humano tipo I (HTLV-I) (Linfoma de células T do adulto) e alguns tipos de Papilomavírus humano (HPV) (tumores da região anogenital, cabeça e pescoço) (Plummer *et.al.*, 2016). Devido à magnitude da ocorrência de câncer associado a processos infecciosos, estima-se que uma alta porcentagem desta doença poderia ser evitada com a adoção de ações de prevenção contra essas infecções.

O HPV apresenta um papel de destaque entre os vírus, uma vez que alguns tipos oncogênicos de HPV são o agente causal de aproximadamente 50% dos casos dos cânceres associados aos vírus. De fato, a infecção por HPV é uma pandemia, considerada a principal infecção sexualmente transmissível no mundo (De Martel *et.al.*, 2017). Durante toda a vida sexual de um indivíduo, estima-se que a probabilidade de se infectar com algum tipo de HPV seja superior a 75% (Chesson *et.al.*, 2014). A importância desse

dados reside no fato de que a presença de alguns tipos oncogênicos de HPV está relacionada ao desenvolvimento de câncer do trato genital inferior feminino e trato genital masculino. Cabe ressaltar que apesar da infecção genital por esse vírus ser muito frequente, o índice de desenvolvimento da doença é baixo, e apenas uma pequena porcentagem destes pacientes pode evoluir para um quadro de câncer (Tota *et.al.*, 2011; Crow, 2012; Hartwig *et.al.*, 2015; Sichero; Giuliano; Villa, 2019). Dentre as lesões malignas associadas aos HPVs se destacam o câncer de colo do útero (100% dos casos), ânus (aproximadamente 90%), vagina (aproximadamente 80%), pênis (aproximadamente 50%), orofaringe (aproximadamente 31%), vulva (aproximadamente 25%), laringe (aproximadamente 2,5%) e cavidade oral (aproximadamente 2%) (De Martel *et.al.*, 2017). Embora menos discutido na literatura, o HPV também está relacionado a neoplasias oftalmológicas, incluindo tumor escamoso da conjuntiva e saco lacrimal (Nakamura *et.al.*, 1997).

Estima-se que o HPV seja responsável por 610 mil novos casos de câncer de colo de útero, também chamado de câncer cervical, com 325 mil mortes a cada ano (Plummer *et.al.*, 2016; Bray *et.al.*, 2018; WHO, 2018). O câncer de colo de útero é a quinta neoplasia maligna mais frequente no mundo, e a quarta em incidência e mortalidade na população feminina mundial (WHO, 2018). Segundo a OMS, 85% dos casos são diagnosticados em países de baixa e média renda (WHO, 2018), onde uma alta taxa de mortalidade ocorre principalmente na África subsaariana, Leste Europeu e América Latina. No Brasil, cerca de 6.000 mulheres morrem devido ao câncer cervical, e são diagnosticados aproximadamente 16.000 novos casos por ano, com um risco estimado de 15 casos a cada 100 mil mulheres. Sem considerar o câncer de pele não melanoma, o câncer cervical é o terceiro tumor maligno mais frequente em mulheres (atrás do câncer de mama e colorretal), e a quarta causa de morte de mulheres por câncer no Brasil (atrás do câncer de mama, colorretal e pulmão) (Bray *et.al.*, 2018). Geograficamente, o câncer cervical é o mais incidente em mulheres da região Norte e o segundo mais incidente nas regiões Nordeste e Centro-Oeste. Nas regiões Sul e Sudeste ocupam a quarta posição (INCA, 2018; Santos, 2019). A incidência de câncer do colo do útero torna-se mais evidente na faixa etária de 20 a 29 anos e o risco aumenta rapidamente até atingir seu pico, geralmente na faixa etária de 45 a 49 anos (Vink *et.al.*, 2013).

O câncer do colo uterino possui alto potencial de cura quando diagnosticado em estágios iniciais. As diferentes alterações celulares, sejam elas benignas ou malignas,

podem ser diagnosticadas em exames preventivos, como citologia cérvico-vaginal (Papanicolaou), colposcopia e biópsia (WHO, 2014; Bhatla *et.al.*, 2019). Apesar dessas lesões serem passíveis de cura quase em sua totalidade, observa-se um percentual grande de mulheres que ainda não tem acesso a esse tipo de controle ginecológico. No Brasil, uma fração não superior a 15% da população feminina está envolvida em algum programa de prevenção do câncer cervical, o que parcialmente poderia explicar a alta incidência nacional dessa neoplasia (Linhares; Villa, 2006).

Recentemente, o diretor geral da OMS noticiou um apelo global à ação para a eliminação do câncer do colo do útero. O Projeto de Estratégia Global é baseado em quatro pilares centrais: prevenção, triagem e tratamento de lesões pré-cancerosas, além de programas para o tratamento do câncer invasivo. Para tal feito, é necessária a união de esforços da comunidade médica, científica e política para que até 2030, as seguintes metas globais possam ser alcançadas: 90% de cobertura da vacinação contra o HPV para meninas e meninos, 70% de cobertura da triagem de mulheres, 90% de tratamento de lesões pré-cancerosas e gerenciamento de 90% dos casos de câncer invasivo (Brisson; Drolet, 2019).

Dada a importância do tema, o médico virologista Harald zur Hausen foi laureado com o prêmio Nobel de Medicina em 2008, por identificar em 1983 o DNA de HPV-16 e HPV-18 em amostras de biópsias feitas em pacientes com câncer cervical, o que contribuiu significativamente para a criação de estratégias de controle do câncer de colo do útero (Durst *et.al.*, 1983; Mammas; Spandidos, 2017).

- Fisiopatologia do Papilomavírus Humano (HPV)

Os Papilomavírus humanos (HPV) são pequenos vírus não envelopados, com capsídeo de simetria icosaédrica de aproximadamente 55 nm, e genoma de DNA dupla hélice de aproximadamente 8000 pares de bases (Van Doorslaer *et.al.*, 2018). Pertencem à família *Papillomaviridae*, a qual é constituída por mais de 200 tipos de HPV, até a presente data numerados sequencialmente de 1 à 227 (HPV center). O genoma do vírus compreende três regiões funcionais. A região precoce (E – *early*) codifica proteínas não-estruturais envolvidas na transcrição (E1 e E2), replicação do DNA (E2), reorganização do citoesqueleto (E4), e na transformação celular (E5, E6 e E7). A região tardia (L – *late*) codifica as proteínas estruturais L1 e L2 do capsídeo viral. A região regulatória (LCR –

long control region), localizada entre os genes L1 e E6, contém a origem da replicação e os locais de ligação para fatores de transcrição virais e celulares. A classificação dos HPVs é baseada na variabilidade genética no genoma do gene L1 (Van Doorslaer *et.al.*, 2018).

Os HPVs são epiteliotrópicos, e podem infectar a pele e as mucosas, como conjuntivas, cavidade oral, laringe, árvore traqueobrônquica, esôfago, bexiga, ânus, canal anal e trato genital feminino e masculino. Dentre os mais de 200 tipos de HPV já descritos, aproximadamente 40 já foram detectados nas lesões anogenitais. A classificação epidemiológica do HPV está associada à capacidade diferencial em transformar as células epiteliais da mucosa genital, sendo divididos em HPV de baixo risco oncogênico e HPV de alto risco oncogênico (Zur Hausen; De Villiers; Gissmann, 1981; Muñoz *et.al.*, 2003; De Villiers *et.al.*, 2004). Infecções causadas pelos HPV de baixo risco (tipos 6, 11, 40, 42, 43, 54, 61, 70, 72, 81) podem desencadear lesões hiperproliferativas benignas, conhecidas como as verrugas genitais (condilomas). Os tipos HPV 6 e 11 são os mais prevalentes, e são encontrados em 90% dos condilomas genitais, principalmente na região vulvar, além de papilomas laríngeos. Pelo menos treze tipos de HPV são considerados como alto risco oncogênico (tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 68, e 59), e apresentam maior probabilidade de provocar infecções persistentes e lesões precursoras de câncer. Dentre os HPVs de alto risco oncogênico, os tipos 16 e 18 estão presentes em aproximadamente 70% dos casos de câncer do colo do útero. Outros HPVs são classificados como potencialmente de alto risco oncogênicos (tipos 53, 66, 70, 73, e 82) (Franco *et.al.*, 1999; Garland *et.al.*, 2009; Hartwig *et.al.*, 2015; De Martel *et.al.*, 2017).

A infecção persistente pelos tipos oncogênicos de HPV é condição necessária para o desenvolvimento das lesões pré-malignas de alto grau e lesões malignas do colo uterino, e o risco de lesões incidentes está diretamente relacionada à carga viral no momento da infecção (Schlecht *et.al.*, 2003). É importante destacar que, em geral, a maioria das lesões de baixo grau regridem espontaneamente, enquanto cerca de 40% das lesões de alto grau, quando não tratadas, podem evoluir para um quadro de câncer invasivo em um período médio de 10 anos (Schiffman *et.al.*, 2016).

O ciclo natural da infecção por HPV está associado à formação das lesões denominadas neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC). O ciclo viral completo do HPV

(infecção produtiva) tem início após a entrada do vírus nas células epiteliais localizadas na camada celular epitelial basal (queratinócitos indiferenciados) a partir de microabrasões, normalmente ocasionadas durante a relação sexual (Frazer, 2004; Schiffman *et.al.*, 2016). Nessas células e sua progênie, as células amplificadoras transitórias, há a replicação do DNA viral em sua forma episomal, pela ação das proteínas E1 e E2, em conjunto com o mecanismo celular de replicação de DNA. As células amplificadoras transitórias, então, preenchem a camada basal do epitélio. A expressão das proteínas não estruturais virais E6 e E7 retarda a parada do ciclo celular, o que normalmente é observado quando as células epiteliais se movem da membrana basal para se tornarem queratinócitos maduros. Este atraso na interrupção do ciclo celular permite uma replicação adicional do epissoma viral nas células epiteliais suprabasais e produz o espessamento da pele (ou verruga), característica de algumas infecções por HPV. Quando ocorre a diferenciação de células epiteliais replicantes em queratinócitos maduros não replicantes, as proteínas estruturais virais L1 e L2 são montadas no núcleo da célula. Então, os vírions maduros são liberados pelas células epiteliais superficiais (Figura 1) (Frazer, 2004).

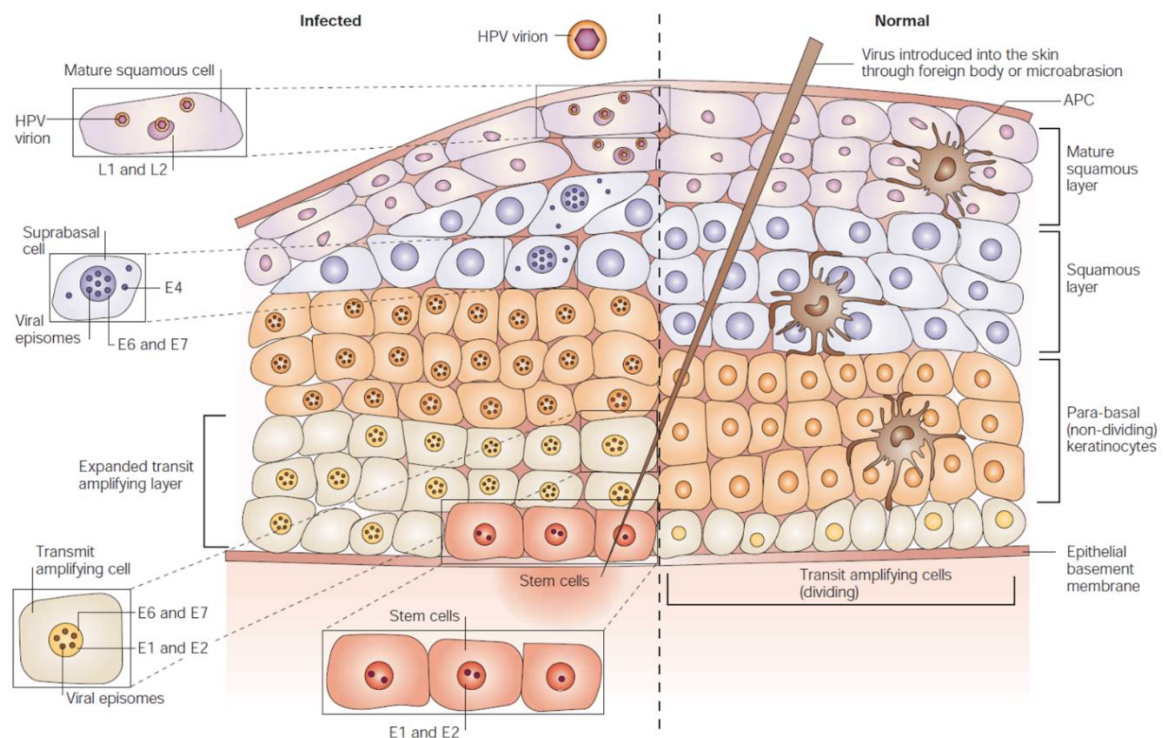


Figura 1. Localização no epitélio escamoso dos principais estágios do ciclo de vida do papilomavírus. Arquitetura das células epiteliais escamosas estratificadas cervicais e expressão de proteínas do papilomavírus humano (HPV) após infecção. As células filhas das células-tronco epiteliais se dividem ao longo da membrana basal e depois amadurecem verticalmente através do epitélio sem divisão adicional (lado direito). O HPV é capaz de acessar as células basais através de microabrasões no epitélio cervical.

Após a introdução do HPV nas células-tronco na camada basal do epitélio, ocorre a expressão de proteínas não estruturais virais (E1, E2). Sob a regulação dessas proteínas, as oncoproteínas E6 e E7 são produzidas, a população de células em divisão se expande verticalmente e a diferenciação das células epiteliais é atrasada e menos completa, o que favorece a replicação do DNA viral em sua forma episomal. As proteínas virais E6, E7 e E4 são expressas sequencialmente com a diferenciação celular, e os vírions maduros são produzidos apenas nas camadas mais superficiais do epitélio, após a expressão das proteínas estruturais L1 e L2. As células apresentadoras de antígenos intraepiteliais (APCs) são menos presentes no epitélio infectado por HPV (Frazer, 2004).

A proteína estrutural L1 representa 80% das proteínas do capsídeo viral, é altamente imunogênica, possui a região mais conservada entre os HPVs e, por conta disso, é utilizada como antígeno de detecção do vírus e na obtenção de *virus like particles* (VLPs) para a produção de vacinas profiláticas contra a infecção por alguns genótipos do vírus (Hagensee; Yaegashi; Galloway, 1993). De maneira geral, as proteínas L1 e L2 facilitam a entrada do vírus na camada basal dos queratinócitos e a proteína L2 transporta o DNA viral ao núcleo celular, auxiliando o empacotamento do genoma do vírus na célula hospedeira (Doorbar, 2005).

Os diferentes graus de NIC dependem do nível de comprometimento do epitélio cervical (William & Creasman, 2012). Em NIC1, 1/3 das células do epitélio estão modificadas de alguma forma pelo HPV, indicando uma infecção ativa do vírus (infecção produtiva); em NIC2, 2/3 estão alteradas evidenciando uma lesão de alto grau que pode regredir espontaneamente; já em NIC3, 3/3 das células estão modificadas sendo menos provável a regressão espontânea, e essa fase da lesão já é considerada um carcinoma *in situ* (William & Creasman, 2012; Bosch *et.al.*, 2013). É importante ressaltar que na NIC1 e 2 o genoma do HPV encontra-se ainda na forma episomal, ou seja, não está integrado ao genoma da célula hospedeira, no entanto, na NIC3, o genoma do HPV se encontra totalmente ou parcialmente integrado (McBride & Warburton, 2017).

Eventualmente, a infecção por HPV de alto risco resulta na integração do DNA viral ao DNA da célula hospedeira. Essa integração interrompe o gene E2 viral, o que leva à super-expressão das proteínas E6 e E7 devido à perda da repressão da transcrição desses genes mediada por E2. Como resultado, as células com DNA integrado do HPV adquirem vida útil prolongada, retêm a capacidade de proliferar e tendem a promover e perpetuar mutações no DNA da linha germinativa atribuíveis às ações das proteínas E6 e E7. Tais células são displásicas e a displasia acentuada do epitélio cervical é a lesão precursora da malignidade cervical, embora a displasia e a infecção possam se resolver espontaneamente (Frazer, 2004; Woodman; Collins; Young, 2007) (**Figura 2**).

A expressão das oncoproteínas E6 e E7 aumenta a atividade proliferativa das células, uma vez que promovem a imortalização das células infectadas pela degradação das proteínas p53 e pRB, respectivamente (Scheffner; Werness; Huibregtse, 1990; Balsitis *et.al.*, 2006). A proteína p53 apresenta um efeito inibitório na proliferação e na transformação celular, mantendo as células em repouso na fase G1 do ciclo celular, no entanto, quando esta sofre mutações ou é degradada, pode ocorrer o aparecimento de tumores. Já a proteína pRb impede o crescimento celular excessivo uma vez que regula a passagem das células da fase G1 para a fase S (Scudellari, 2013). Essas oncoproteínas também interagem com diferentes vias celulares associadas à regulação da transcrição, diferenciação e ativação celular, e atuam na regulação negativa da imunidade inata uma vez que interferem na expressão de receptores do tipo Toll (Toll-likereceptors – TLR), especialmente o TLR-9 (Hasan *et.al.*, 2007). O comprometimento dessas respostas é considerado um passo importante na carcinogênese do HPV. Com sua importância reconhecida, as oncoproteínas E6 e E7 são alvos para terapias de doenças associadas ao HPV.

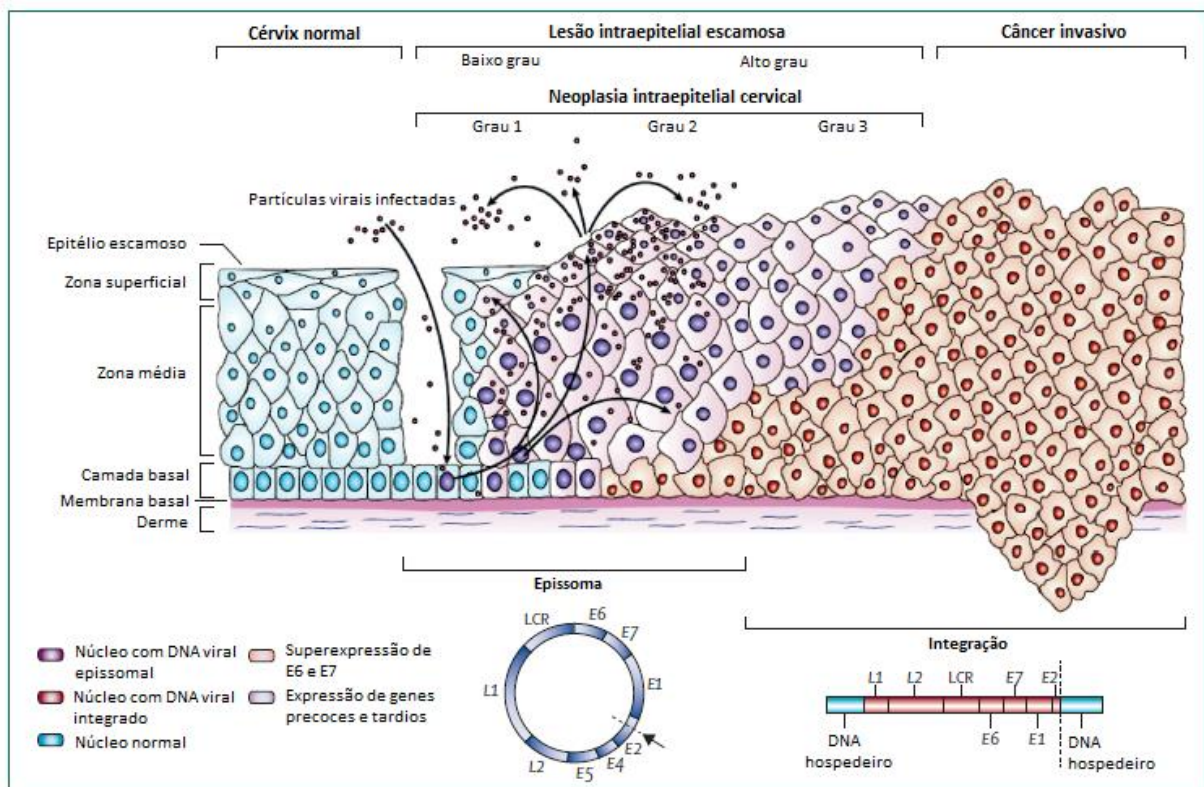


Figura 2. Ciclo de vida e organização genômica do HPV. Células basais no epitélio cervical repousam sobre a membrana basal, que é suportada pela derme. HPV é capaz de acessar as células basais através de microlesões no epitélio cervical. Após ocorrer a infecção, os genes precoces (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) são expressos e o DNA viral é replicado a partir do DNA episossomal. Nas camadas mais superficiais do epitélio (zonas média e superficial) o genoma viral é replicado ainda mais, e os genes tardios (L1, L2) e E4 são expressos. Há o empacotamento dos genomas virais por L1 e L2 para formar vírions no núcleo. A

transmissão viral pode então iniciar uma nova infecção. Lesões intraepiteliais de baixo grau suportam replicação viral produtiva. Infecções por HPVs de alto risco progridem para neoplasias intraepiteliais cervicais de alto grau. A progressão de lesões não tratadas a câncer microinvasivo e invasivo associado a integração do genoma do HPV dentro do cromossomo hospedeiro (núcleo vermelho), com perda ou perturbação de E2 associados, e subsequente regulação positiva da expressão dos oncogenes E6 e E7. LCR = região de controle longo. (Woodman; Collins; Young, 2007).

- Prevenção contra infecções causadas por HPV e estratégias convencionais contra o câncer

As vacinas profiláticas disponíveis atualmente que protegem contra infecções causadas por HPV são a bivalente (Cervarix® - Glaxo Smith&Kline), que protege contra os HPV 16 e 18, a tetravalente (Gardasil® - Merck Sharp&Dohme) que cobre os genótipos 6, 11, 16 e 18 do HPV e a nova versão nonavalente (Gardasil 9® - Merck Sharp&Dohme) que protege não somente dos quatro genótipos virais citados mas também os HPV 31, 33, 45, 52 e 58 (Lowy, 2006; Monie *et.al.*, 2009; Zhai & Tumban, 2016). Essas vacinas são baseadas em VLPs (*virus like particles*) e induzem a produção de anticorpos neutralizantes contra os tipos oncogênicos cobertos por elas (Villa, 2006). A vacinação contra o HPV poderia reduzir consideravelmente a morbidade e a mortalidade dos cânceres causalmente associados a esse vírus. No entanto, a falta de acessibilidade às vacinas atinge uma grande parte da população mundial, principalmente em países de baixa renda (Bruni *et.al.*, 2017). Além disso, apesar das vacinas terem eficácia comprovada, elas não beneficiam pessoas que possuem infecção já estabelecida, e o custo ainda é um grande obstáculo para sua implementação em países em desenvolvimento (Villa, 2006; zur Hausen, 2009).

No Brasil, o controle do câncer cervical é prioridade para saúde pública, integrando o plano de ações estratégicas frente a doenças não transmissíveis (Santos, 2019). A prevenção e redução da incidência deste e de outros tipos de câncer associados ao HPV se baseiam no fornecimento da vacina Gardasil pelo Programa Nacional de Imunização, a qual é recomendada para meninas entre 9 e 14 anos e meninos de 11 a 14 anos (WHO, 2016; INCA, 2018). Além disso, o Ministério da Saúde recomenda o exame citopatológico em mulheres assintomáticas de 25 a 64 anos (INCA, 2018), pois por meio de exames preventivos é possível detectar e monitorar lesões pré-malignas ou tumores em estágios iniciais, levando ao diagnóstico precoce e a tratamentos mais efetivos da doença (Libera *et.al.*, 2016; INCA, 2018).

As estratégias convencionais atuais para o tratamento de câncer cervical variam de acordo com o estágio clínico em que a doença se encontra (Trimble *et.al.*, 2015). O tratamento para pacientes com câncer cervical metastático/recorrente baseia-se em histerectomia combinada com radioterapia ou quimioterapia, sendo esta última considerada a abordagem de primeira linha (Tsuda; Watari; Ushijima, 2016). Entretanto, tais procedimentos são altamente invasivos, não agem especificamente sobre as células tumorais, ocasionando a morte ou remoção de tecidos saudáveis e efeitos adversos severos (Lin *et.al.*, 2016). Adicionalmente, a eficiência da quimioterapia, assim como outras intervenções terapêuticas, cai drasticamente em tumores mais avançados, sendo esta uma consequência direta do estabelecimento da imunossupressão no microambiente tumoral e sistemas periféricos, marcados pelo acúmulo de citocinas inibitórias e células imunológicas disfuncionais ou tolerantes (Szakacs *et.al.*, 2006). Nesse cenário, o desenvolvimento de imunoterapias mais eficientes, que tenham impacto no microambiente imunossupressor gerado pelas células tumorais e que melhorem o desempenho dos tratamentos convencionais, representa uma prioridade (Kang *et.al.*, 2013).

- Estratégias terapêuticas contra tumores associados ao HPV

As vacinas terapêuticas são construídas para inibir ou controlar o crescimento de tumores associados ao HPV via ativação de respostas imunológicas (Diniz & Ferreira, 2010). Como dito anteriormente, tumores associados ao HPV expressam as oncoproteínas E6 e E7 constitutivamente, que são antígenos alvo codificados pelo DNA viral integrado (Wakeham & Kavanagh, 2014), o que permite a elaboração de vacinas terapêuticas baseadas na indução de respostas imunológicas contra essas oncoproteínas (Skeate *et.al.*, 2016). É válido ressaltar que essas proteínas são não-próprias ao hospedeiro e, consequentemente, os riscos de indução de auto-imunidade são baixos (Skeate *et.al.*, 2016).

Um dos principais desafios para o desenvolvimento de vacinas terapêuticas eficazes é que as oncoproteínas E6 e E7 modulam o sistema imunológico de forma que as células tumorais se tornem pouco imunogênicas (Zhou *et.al.*, 2019). As respostas imunológicas envolvidas na eliminação de células tumorais são baseadas em células T CD8⁺ juntamente com células T CD4⁺ (Stevanović *et.al.*, 2015; Masterson *et.al.*, 2016). Como alternativa

para melhorar a imunogenicidade, as proteínas alvo são frequentemente fusionadas a outras proteínas ou associadas a adjuvantes que proporcionam aumento da imunogenicidade humoral e celular das formulações (Diniz & Ferreira, 2010; Li *et.al.*, 2017). Estudos relacionados utilizaram como plataforma no controle de tumores associados à infecção pelo HPV-16 estratégias baseadas na proteína E7 fusionada à hsp65 de *Mycobacterium bovis* BCG, obtendo proteção em camundongos contra tumores induzidos após transplante com células TC-1 que expressam as oncoproteínas E6 e E7 do HPV-16 (Chu *et.al.*, 2000). Essa plataforma foi testada em modelo clínico de fases I e II demonstrando tolerância e capacidade de regressão de lesões celulares associadas ao HPV-16, no entanto, nem todos os participantes do estudo apresentaram imunogenicidade à vacina e melhoras clínicas, sendo observado somente um efeito parcial na doença pré-invasiva (Roman *et.al.*, 2007; Lee *et.al.*, 2016; Vici *et.al.*, 2016).

Neste contexto, o Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas (LDV) do ICB-USP desenvolveu duas estratégias vacinais, uma baseada em DNA (pgDE7h) (Diniz *et.al.*, 2010; Diniz & Ferreira, 2011) e outra em proteína recombinante purificada (gDE7) (Porchia *et.al.*, 2011). Ambas baseiam-se na expressão da proteína híbrida resultante da fusão genética da glicoproteína D (gD) do Herpes simplex virus-1 (HSV-1) com a oncoproteína E7 do HPV-16 (Diniz *et.al.*, 2010; Porchia *et.al.*, 2011), fusão esta que conferiu um aumento da imunogenicidade ao antígeno E7 via ativação de sinais co-estimulatórios e redução de efeitos co-inibitórios em linfócitos T e B (Porchia *et.al.*, 2011; Porchia *et.al.*, 2017). A vacina de DNA quando administrada com eletroporação, induz a um aumento dos efeitos antitumorais e à ativação de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos, com características polifuncionais, e controle da expansão de células imunossupressoras (Sales *et.al.*, 2017). A vacina pgDE7h também foi associada a pIL-10R, obtendo como resultado o controle de tumores em estágio mais avançado da doença (Silva *et.al.*, 2019).

A estratégia que utiliza a proteína recombinante gDE7 apresenta uma magnitude da resposta imunológica atribuída à capacidade imunomoduladora da proteína gDE7 em ativar células dendríticas e favorecer a apresentação cruzada de antígenos para as células T CD8⁺. Como consequência, são geradas células T CD8⁺ E7-específicas que culminam na proteção antitumoral em camundongos tratados terapeuticamente (Porchia *et.al.*, 2017). Foi observado que duas doses de gDE7 associadas ao adjuvante poly(I:C) desencadeiam proteção antitumoral total e duradoura em animais desafiados com células tumorais (TC-1) e induziram um perfil de resposta T CD8⁺ polifuncional E7-específico

com atividade citotóxica e com fenótipo de memória efetora. Além disso, essa combinação controlou a expansão de células T reguladoras (Treg) e células mielóides supressoras (MDSC) induzidas pelo microambiente tumoral (Porchia *et.al.*, 2017). Em outro braço desta pesquisa, foi administrado duas doses da vacina gDE7 associada a inibidores de IDO e melatonina, sendo possível observar um retardo do crescimento tumoral dos animais inoculados com células TC-1 (Moreno *et.al.*, 2018). Coletivamente, estes dados abrem perspectivas para o teste clínico de vacinas baseadas na proteína gDE7 como ferramenta para o controle terapêutico do câncer associado ao HPV, sendo necessário maiores evidências que demonstrem a eficácia desta estratégia terapêutica, e que reforcem e embasem estudos para o direcionamento do tratamento para a fase clínica.

Apesar desses resultados encorajadores, o sucesso das vacinas terapêuticas ainda se mostra um grande desafio por conta da resposta imunossupressora gerada pelo tumor (Trimble *et.al.*, 2015), já que no microambiente tumoral existem diversos fatores que levam ao escape do tumor pelo sistema imunológico, seja pela geração de células mielóides supressoras (MDSC) (Condamine *et.al.*, 2015; Damuzzo *et.al.*, 2015) seja pelas células T reguladoras (Treg) (Nishikawa & Sakaguchi, 2014). Esse panorama imunológico pode limitar a eficiência de linfócitos na eliminação de células neoplásicas (Whiteside, 2008; Poggi *et.al.*, 2014). Dentre os possíveis mecanismos mediadores da evasão imunológica de tumores está a expressão da enzima indoleamina 2,3-dioxigenase-1 (IDO1) (Nakamura *et.al.*, 2007; Poggi *et.al.*, 2014).

- Indoleamina 2,3-Dioxigenase (IDO)

A indoleamina 2,3-dioxigenase 1 (IDO1) é uma importante enzima evolutivamente antiga que participa do metabolismo do aminoácido triptofano (TRP) (Taylor & Feng, 1991), e sua atividade enzimática leva à diminuição de TRP e aumento de seus produtos metabólicos, como as quinureninas (QUIN) (**Figura 3**) (Shimizu *et.al.*, 1978; Mittal *et.al.*, 2013; Sato *et.al.*, 2012; Araújo *et.al.*, 2014; Shibata *et.al.*, 2016). A expressão de IDO1 está envolvida em um amplo espectro de doenças humanas, incluindo infecções, doenças autoimunes, aterosclerose, obesidade e depressão (Ricciuti *et.al.*, 2019). IDO1 é reconhecida como um mecanismo de evasão imunológica responsável pelo desenvolvimento e progressão de câncer, bem como por promover neo-angiogênese associada a tumores (Prendergast *et.al.*, 2014).

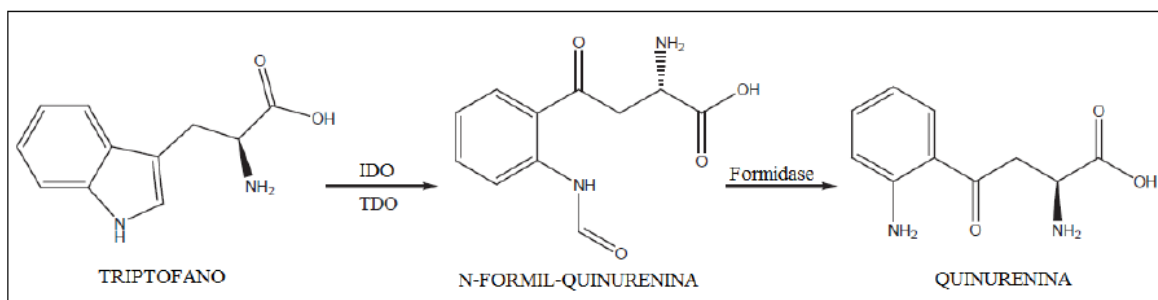


Figura 3. Metabolismo do triptofano pela via das quinureninas. IDO – Indoleamina 2,3 dioxigenase. TDO – Triptofano 2,3 dioxigenase. Figura modificada (Moreno *et.al.*, 2013).

Existem duas isoformas da enzima IDO, sendo IDO1 e IDO2, que compartilham 43% de identidade de sequência e são dotadas de características bioquímicas distintas que apoiam a hipótese de seus diversos papéis biológicos (Meininger *et.al.*, 2011; Van Baren & Van den Eynde, 2015). A IDO1 é uma enzima citosólica extra-hepática distribuída em muitos tecidos humanos, incluindo placenta, pulmão, intestino delgado e grosso, cólon, trato genital feminino, baço, fígado, rim, estômago e cérebro (King; Thomas, 2007; Brochez; Chevolet; Kruse, 2017), sendo implicada na resistência imune tumoral (Uyttenhove *et.al.*, 2003; Muller *et.al.*, 2005). Já a IDO2 apresenta um padrão de expressão diferente, a qual é expressa predominantemente nos túbulos renais, fígado e espermatozoides (Ball *et.al.*, 2007; Metz *et.al.*, 2007), mostrando uma atividade de degradação de TRP muito baixa, o que leva ao seu papel fisiológico pouco claro (Witkiewicz *et.al.*, 2009; Meininger *et.al.*, 2011). A enzima triptofano 2,3-dioxigenase, TDO, é expressa principalmente no fígado, que catalisa a mesma reação de IDO1 e, sob certos estímulos, também é expressa em outros tecidos, incluindo epidídimo, placenta, testículo, cérebro e útero (Tatsumi *et.al.*, 2000; Britan *et.al.*, 2006). Diferentemente do papel regulador imunológico de IDO1, a TDO tem como principal função controlar a concentração de TRP livre no sangue (Hornýák *et.al.*, 2018).

Originalmente, a IDO1 foi considerada como uma molécula anticâncer, propondo que o aumento da atividade desta enzima nas células apresentadoras de antígenos (APCs) esgota o TRP das células tumorais e inibe seu crescimento. Entretanto, com a descoberta das funções imunossupressoras mediadas por IDO1, sua atividade pró-câncer foi reconhecida (Katz; Muller; Prendergast, 2008). A IDO1 é super-expressa em mais de 50% dos tumores (Lob *et.al.*, 2009) que usam mecanismos imunossupressores associados à IDO1 para promover sua disseminação e sobrevivência (Godin-Ethier *et.al.*, 2011), a qual já foi observada em tumor primário e/ou tecido metastático de diferentes tipos de tumores

(Ino *et.al.*, 2008; Yu *et.al.*, 2011). Estudos demonstraram níveis elevados de IDO1 em estágios avançados de carcinoma de ovário (Okamoto *et.al.*, 2005; Tanizaki *et.al.*, 2014), câncer colo-retal (Cavia-Saiz *et.al.*, 2014; Chen *et.al.*, 2016) e melanoma (Speeckaert *et.al.*, 2012). Dentre as neoplasias, também foi relatado a atividade imunossupressora de IDO1 em câncer cervical (Nakamura *et.al.*, 2007; Mittal *et.al.*, 2013; Ferns *et.al.*, 2015; Venancio *et.al.*, 2019).

Em amostras de tumores humanos, a expressão de IDO1 é comumente observada tanto no nível de RNA, como de proteínas (van Baren e Van den Eynde, 2015). Geralmente, a presença de IDO se correlaciona com um pobre prognóstico, e está associada a um fenótipo mais agressivo do tumor, com aumento do número de células Treg no microambiente tumoral (Ferns *et al.*, 2015; Fukuno *et al.*, 2015). Parte da expressão de IDO1 pelas células tumorais poderia ser resultado da resposta imunológica em curso, com envolvimento de linfócitos T produtores de IFN- γ . De fato, no câncer cervical, as células tumorais IDO1⁺ foram frequentemente localizadas na periferia dos nódulos tumorais, rodeada por linfócitos T (Théate *et al.*, 2015; Van Baren & Van den Eynde, 2015). Assim, a expressão de IDO1 em tumores inflamados poderia indicar um mecanismo de resistência adaptativa (IDO1 induzida) (**Figura 4**), mas não a resistência intrínseca do tumor, a qual é relevante para a situação humana, podendo ser avaliada somente em modelos baseados em tumores murinos transfectados estavelmente com o gene *Indo* (Uytenhove *et.al.*, 2003).

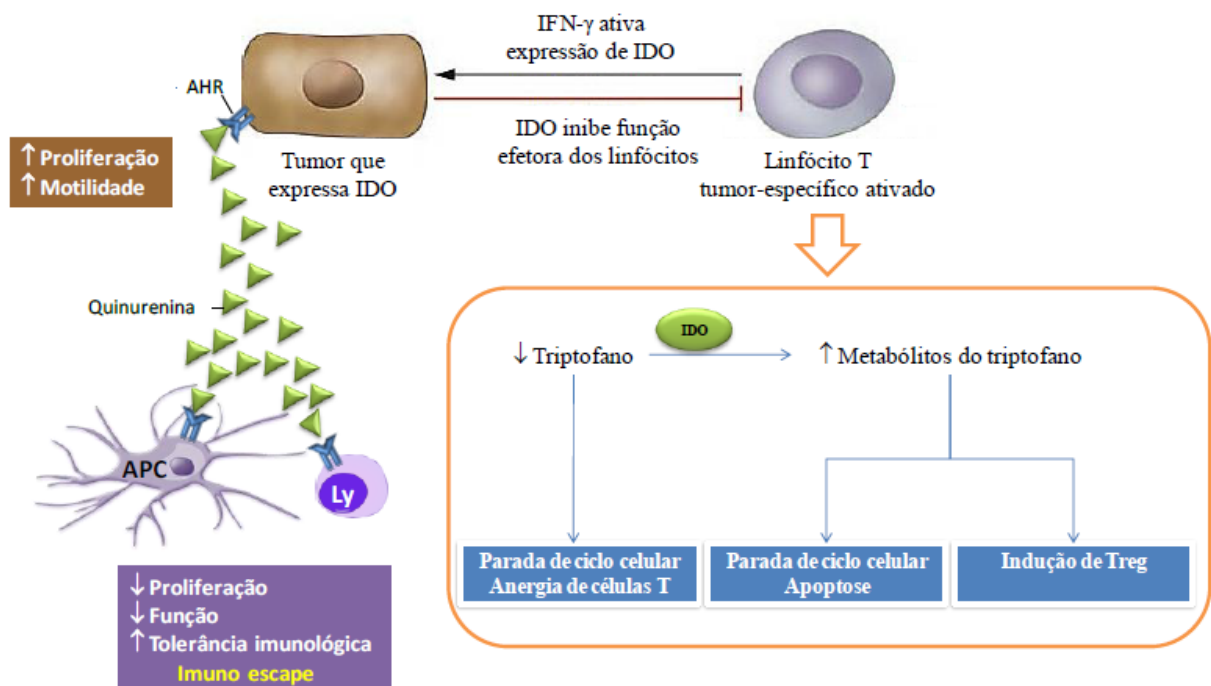


Figura 4. Modelo de imunossupressão tumoral mediado por IDO. Esquema da resistência adaptativa tumoral, mediada pela expressão induzida de IDO por IFN- γ , e da resistência intrínseca tumoral, mediada pela expressão constitutiva de IDO1. A depleção de triptofano e aumento de seus metabólitos afetam a função efetora de células T e APC. AHR – receptor de hidrocarboneto aril, APC – células apresentadoras de antígeno, IDO – indoleamina 2,3 dioxigenase-1, Ly – linfócito. Figura modificada (Munn e Mellor, 2007; Opitz. *et al.*, 2011).

- Eixo regulatório IDO1/IL-6/STAT-3/AhR

Os mecanismos que conduzem à expressão constitutiva da IDO1 em tumores humanos são em sua maioria desconhecidos. Acredita-se que a atividade da enzima mantém sua própria expressão pela regulação auto-sustentável do eixo IL-6/STAT-3/AHR, os quais são expressos em vários tipos de tumores, em linhas de células cancerígenas e em tumores de modelos animais (Litzenburger *et al.*, 2014).

Inicialmente identificada como um fator regulador derivado de células T na diferenciação de células B, a interleucina-6 (IL-6) é agora reconhecida como citocina pleiotrópica que apresenta propriedades pró e anti-inflamatórias (Ferguson-Smith *et al.*, 1988; Paul, 1991). IL-6 desempenha papéis importantes na regulação imune, hematopoese e oncogênese e, além disso, também está envolvida em processos inflamatórios celulares normais, mecanismos de defesa imunológica do hospedeiro e modulação do crescimento celular (Guo *et al.*, 2012). Se destaca mais ainda devido seu envolvimento na proliferação e diferenciação de diferentes células tumorais malignas (Grivennikov & Karin, 2011).

A ativação do eixo de sinalização IL-6/STAT-3 é um evento importante no câncer, promovendo a tumorigênese que regula várias vias de sinalização de sobrevivência nas células cancerígenas (Mihara *et al.*, 2012). IL-6 regula quase todas as características do câncer, como inibição da apoptose (Jourdan *et al.*, 2003), promoção da sobrevivência (Chang *et al.*, 2013), proliferação (Yeoh *et al.*, 2007), angiogênese (Wei *et al.*, 2003), invasividade e metástase (Oh *et al.*, 2013; Zou; Zhang; Xu, 2016), e também é conhecido por regular o metabolismo das células cancerígenas (Mauer; Denson; Bruning, 2015). Dentre as fontes primárias de IL-6 no microambiente tumoral destacam-se os macrófagos associados a tumores (TAMs), células T CD4⁺, MDSCs e fibroblastos (Bode *et al.*, 1999; Oh *et al.*, 2013; Nagasaki *et al.*, 2014). No microambiente tumoral, IL-6 suporta a tumorigênese afetando diretamente as células cancerígenas via modulação das atividades intrínsecas e extrínsecas das células tumorais, bem como influenciando as células estromais que indiretamente apoiam a tumorigênese (Fisher; Appenheimer; Evans, 2014).

A expressão de IL-6 tem sido implicada em muitos tipos de tumores, como câncer colo-retal (Belluco *et.al.*, 2000; Waldner; Foersch; Neurath, 2012), próstata (Culig *et.al.*, 2005; Culig & Puhr, 2012), câncer de mama (Garcia-Tunon *et.al.*, 2005; Dethlefsen *et.al.*, 2013), carcinoma de ovário (Zakrzewska & Poznanski, 2001; Maccio & Madeddu, 2013), pâncreas (Miura *et.al.*, 2015), pulmão (Songur *et.al.*, 2004; Chang *et.al.*, 2013), carcinoma de células renais (Altundag; Altundag; Gunduz, 2005), câncer cervical (Wei *et.al.*, 2003; Stone *et.al.*, 2014), mieloma múltiplo (Fulciniti *et.al.*, 2009; Singh *et.al.*, 2015), linfomas (Cozen *et.al.*, 2004) e câncer endometrial (Bellone *et.al.*, 2006). A expressão desta citocina também foi encontrada em tumores recorrentes em comparação com tumores primários, bem como em lesões metastáticas recorrentes em comparação com metástases primárias (Guo *et.al.*, 2012). Pacientes com altos níveis de IL-6 circulante geralmente estão associados ao crescimento agressivo do tumor, levando a um mau prognóstico e menor sobrevida, enquanto um nível mais baixo de IL-6 está associado a uma melhor resposta à terapia (Guo *et.al.*, 2012; Chen *et.al.*, 2013; Wu *et.al.*, 2013; Hagi *et.al.*, 2017). Foi demonstrado anteriormente que IDO1 impulsiona a produção de IL-6 em câncer de pulmão e mama metastático, enquanto o produto do metabolismo de IDO, o ácido cinurênico, pode potencializar a produção de IL-6 pelo receptor de hidrocarboneto aril (AhR) (Uyttenhove *et.al.*, 2003).

O receptor de hidrocarboneto aril (AhR) é um importante receptor citosólico que responde a vários sinais exógenos e endógenos derivados de dieta, metabolismo do hospedeiro e microbiota intestinal (Hahn, 2002; Yamada *et.al.*, 2016). Este é distribuído em quase todos os tecidos humanos e expresso abundantemente na placenta, fígado e pulmões (Xue; Fu; Zhou, 2018). AhR desempenha um papel proeminente na fisiologia e fisiopatologia, incluindo papéis importantes na função imune, autoimunidade, função gastrointestinal, inflamação e câncer (Benson & Shepherd, 2011; Punj *et.al.*, 2014; Ehrlich *et.al.*, 2016). Inesperadamente, Ahr é crítico para uma ampla gama de funções imunológicas, incluindo manutenção de populações celulares inatas e adaptativas em mucosas e controle dos nódulos da inflamação, tanto em estado estacionário quanto nos ciclos de feedback durante as reações inflamatórias em curso (Shinde & McGaha, 2018).

Por estar envolvido na formação de tumores, a expressão de AhR constitutivamente alta e cronicamente ativa pode ser observada em uma gama de tecidos tumorais invasivos e em linhagens celulares tumorais malignas (DiNatale *et.al.*, 2012). Dentre estes, destacam-se os tumores sanguíneos, como leucemia de células T e linfoma,

bem como em tumores sólidos como glioblastoma, câncer de ovário, pulmão, fígado e carcinomas de cabeça e pescoço (Xue; Fu; Zhou, 2018). Os efeitos fisiológicos da ativação de AhR apresentam papéis significativos na modulação do sistema imune e carcinogênese, podendo afetar a proliferação, invasão tecidual, metástase e angiogênese das células cancerígenas (Dietrich & Kaina, 2010). Foi visto que o AhR pode reduzir o contato e a adesão célula-célula e aumentar a motilidade e invasividade das células cancerígenas, resultando em invasão e metástase dessas células (Xue; Fu; Zhou, 2018).

Como mencionado anteriormente, AhR demonstra um papel essencial na regulação do sistema imune, controlando a diferenciação e função de diferentes células imunes, incluindo principalmente macrófagos e células dendríticas (DCs) que induzem respostas imunes inatas, e células T que induzem repostas adaptativas (Gutierrez-Vazquez & Quintana, 2018). Os macrófagos possuem potencial inflamatório que deve ser rigidamente controlado. Neste contexto, foi sugerido que o AhR é um fator-chave que restringe a função inflamatória de macrófagos em resposta ao feedback regulatório intrínseco celular e fatores condicionantes extrínsecos. Quanto as DCs, é demonstrado que AhR pode atuar como um importante regulador da imunossupressão controlada por DC e restrição do potencial inflamatório (Shinde *et.al.*, 2018). Assim, as respostas de AhR parecem ser altamente integradas nas vias de feedback de macrófagos e DCs, reagindo a sinais inflamatórios e processos enzimáticos, além de reforçar a função de AhR e fornecer feedback que pode limitar a magnitude e a duração da inflamação (Simones & Shepherd, 2011). Em relação as células T, os tumores escapam da vigilância imunológica por inativação ou exclusão dessas células, que é um evento precoce importante no desenvolvimento do tumor (de Araujo *et.al.*, 2017), onde o AhR pode desempenhar um papel crucial no equilíbrio das respostas iniciais das células T (Shinde *et.al.*, 2018). A alta expressão deste receptor em alguns tipos de tumores regula a diferenciação de células T CD4⁺ (Darrasse-Jeze & Podsypanina, 2013) e, além disso, também é crucial na regulação das respostas das células T CD8⁺ (Shinde *et.al.*, 2018), estando associado à diminuição da infiltração tumoral por esse linfócito (Opitz *et.al.*, 2011). A quinurenina afeta a proliferação de células T CD4⁺ e CD8⁺ no microambiente tumoral de maneira promíscua e é capaz de suprimir as respostas imunes antitumorais através do AhR (Opitz *et.al.*, 2011; Liu *et.al.*, 2017).

Os metabólitos do triptofano (TRP) são ligantes naturais de AhR endógenos que medeiam funções imunossupressoras. A quinurenina (QUIN) foi descrita como o

metabólito mais intrigante do TRP em diferentes tipos de câncer. Em vários tipos de células, a maior parte do triptofano é metabolizado por uma via de quinurenina, sendo IDO1 a enzima limitante da taxa desta metabolização (Wirthgen *et.al.*, 2015). A expressão de IDO1 demonstra ser controlada por AhR, cuja atividade enzimática leva à exaustão do TRP no microambiente local, supressão das respostas das células T específicas ao antígeno e promoção da diferenciação das células T reguladoras (Treg) durante o desenvolvimento tumoral (Platten *et.al.*, 2015).

A hipótese de que IDO1 pode ativar sua própria expressão em células cancerígenas humanas por meio de um loop de sinalização autócrino de AhR/IL-6/STAT-3 surgiu por conta da quinurenina, produzida por IDO1 nas células tumorais, ativar AhR e induzir assim IL-6, que por sua vez, direciona a expressão de IDO1 através da ativação de STAT-3 (Litzenburger *et.al.*, 2014). Esses dados podem indicar que a expressão constitutiva de IDO1 em diferentes tipos de cânceres é sustentada por seu próprio produto enzimático, a quinurenina, através do loop de auto ativação AhR/IL-6/STAT-3 (**Figura 5**).

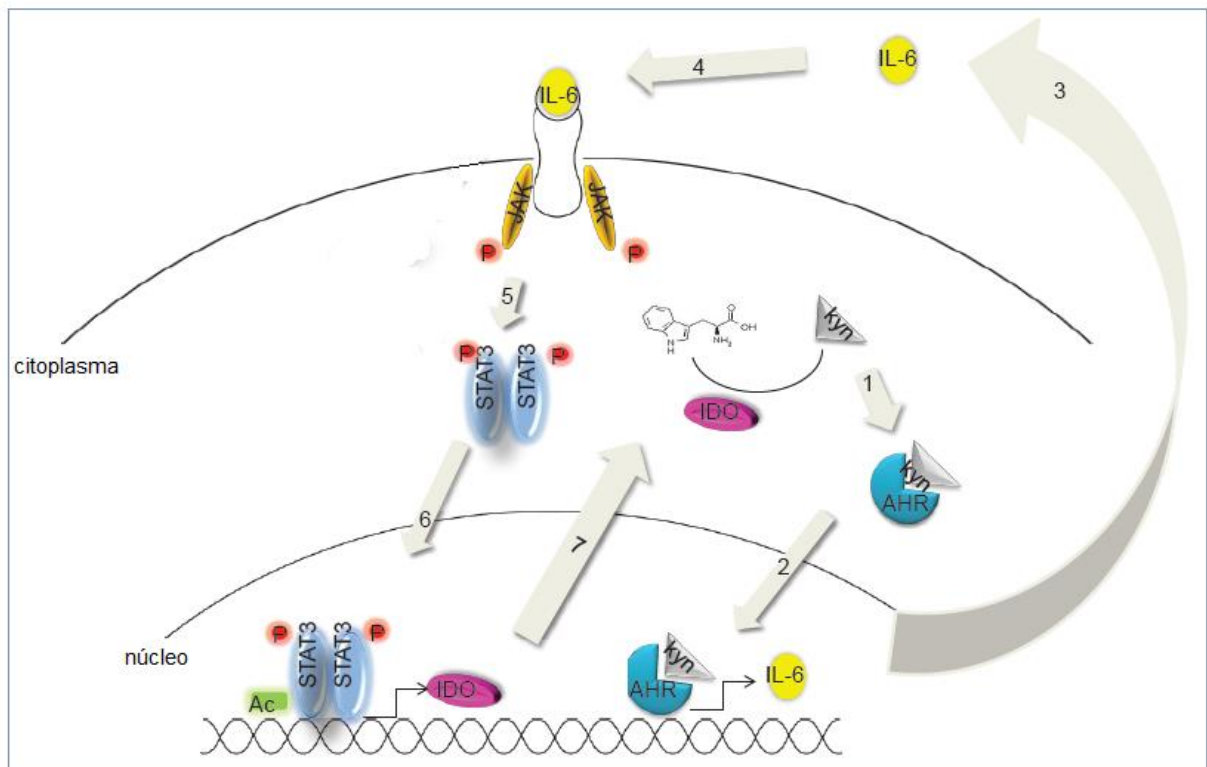


Figura 5. Regulação auto-sustentável do eixo IDO1/AhR/IL-6/STAT-3. No citoplasma, IDO1 metaboliza o triptofano em quinurenina (kyn): (1) A quinurenina ativa o AhR. (2) AhR transloca-se para o núcleo, onde se liga ao promotor de genes alvo, como a IL-6. (3) IL-6 é liberada das células e (4) se liga ao seu receptor de superfície celular. Após a IL-6 se ligar e estabilizar o complexo receptor, leva a ativação de JAK, (5) permitindo o recrutamento e fosforilação de STAT-3. (6) Dímeros STAT-3 fosforilados e

acetilados translocam-se para o núcleo, (7) onde se ligam ao promotor de genes alvo como a IDO1. Figura modificada (Litzenburger *et.al.*, 2014).

- Imunomoduladores e sua aplicação na clínica

Uma vez que a expressão de IDO1 tem sido documentada em tumores que afetam uma variedade de órgãos humanos como próstata, pâncreas, ovário, pulmão, estômago, reto e colo do útero, surgiu a premissa de que essa enzima possivelmente estaria envolvida com a evasão tumoral ao sistema imunológico (Uyttenhove *et.al.*, 2003; Nakamura *et.al.*, 2007). Esta hipótese foi fundamentada em modelo murino, onde o crescimento tumoral de células transfectadas com o gene *Indo* (codificador de IDO1 murino) foi revertido pelo 1-metil-triptofano (1-MT), um clássico inibidor farmacológico de IDO (Uyttenhove *et.al.*, 2003). O 1-MT apresenta-se em duas isoformas, L-1MT e D-1MT, além de sua mistura racêmica, DL-1MT. Foi possível demonstrar os efeitos benéficos de inibidores de IDO na terapia do câncer, principalmente quando associados à quimioterapia (Hou *et.al.*, 2007).

Uma questão chave sobre os mecanismos de escape imune do câncer reside na capacidade das células tumorais em editar seu fenótipo via mecanismos supressores de tumor extrínsecos. Sustentado por esse fenômeno, a imunoterapia surgiu como um avanço terapêutico significativo contra a imunossupressão induzida pelo tumor (Kirkwood *et.al.*, 2012). Como IDO1 é um mecanismo endógeno de tolerância imunológica *in vivo*, os inibidores de IDO1 surgiram como moléculas experimentais em ensaios clínicos de oncologia (Prendergast *et.al.*, 2017). De fato, inibidores de IDO1, como epacadostat, navoximod e indoximod (enantiômero D-1MT), estão sob estudos clínicos de fase II ou II/III (Tang *et.al.*, 2016; Hamid *et.al.*, 2017). No entanto, com base nos recentes resultados negativos do ECHO- 301/KEYNOTE-252, fase III, em melanoma metastático (informação do ensaio clínico NCT02752074) (Long *et.al.*, 2018), diversos estudos, particularmente aqueles que usam o inibidor de IDO epacadostat, foram interrompidos. Ainda assim, foi mostrado que diferentes combinações terapêuticas podem subverter a falha de ensaios clínicos, apontando que os inibidores de IDO não devem ser abandonados para a imunoterapia do câncer (informações dos ensaios clínicos: NCT01961115, NCT02077881) (Bahary *et.al.*, 2018; Slingsluff *et.al.*, 2018).

No presente estudo, avaliamos o papel da IDO1 na oncogênese e imunossupressão de tumores associados ao HPV-16, com o objetivo de propor uma nova alternativa

terapêutica. A imunoterapia proposta apresenta duas frentes de tratamento: o 1MT e a vacina terapêutica gDE7. Os inibidores de IDO (1MT, sendo os enantiômeros e mistura racêmica) foram escolhidos para compor nossa abordagem terapêutica com base em seus dados pré-clínicos e clínicos como adjuvantes imunometabólicos de terapias antitumorais (Munn, 2012; Tang *et.al.*, 2016; Prendergast *et.al.*, 2017; Bahary *et.al.*, 2018). A vacina gDE7 (Porchia *et.al.*, 2011; Porchia *et.al.*, 2017) mostrou excelentes efeitos terapêuticos em condições experimentais baseadas em camundongos transplantados com células TC-1, uma linhagem tumoral murina que codifica as oncoproteínas E6 e E7 do HPV-16. Mostramos aqui que a expressão de IDO1 em células imunes e estromais, mas não em células tumorais, diminui o efeito antitumoral da vacina gDE7. Nossos achados destacam o papel da IDO1 como um importante indutor de imunossupressão que pode diminuir a eficiência da imunoterapia. Assim, propomos uma combinação vacinal inovadora, que tem impacto na tradução da ciência básica em intervenções clínicas, trazendo um modelo onde é possível estudar o papel da IDO1 na carcinogênese de tumores associados ao HPV.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A descoberta do eixo regulatório IDO1/AhR/IL-6 ativo em alguns tipos de câncer pode orientar futuras abordagens terapêuticas, onde o presente estudo demonstra que inibidores de IDO1 exibem efeitos sinérgicos quando combinados a uma imunoterapia específica do tumor e, portanto, representa uma nova e promissora perspectiva para o controle de tumores associados ao HPV e possivelmente outros tipos de câncer. Entendemos que uma investigação mais aprofundada de vias de sinalização e microambiente celular possa apoiar de forma mais robusta a proposta de uma estratégia terapêutica para tumores associados ao HPV. Espera-se que tais avanços possam ser transferidos para a sociedade, com aplicação de terapias efetivas e menos invasivas.

Referências*

Altundag O, Altundag K, Gunduz E. Interleukin-6 and C-reactive protein in metastatic renal cell carcinoma. **Journal of Clinical Oncology**, 23(5):1044-5, Feb, 2005.

Araújo EF, Loures FV, Bazan SB, Feriotti C, Pina A, Schanoski AS, Costa TA, Calich VL. Indoleamine 2,3-dioxygenase controls fungal loads and immunity in Paracoccidioidomycosis but is more important to susceptible than resistant hosts. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 8(11):e3330, Nov, 2014.

Araújo LH, Baldotto C, Junior CJ, Katz A, Ferreira CG, Mathias C, Mascarenhas E, Lopes GL, Carvalho H, Tabacof J, Martínez-Mesa J, Viana LS, Cruz MS, Zukin M, De Marchi P, Terra RM, Ribeiro RA, De Lima VCC, Werutsky G, Barrios CH, et.al. Lung Cancer in Brazil. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, 44(1):55-64, Fev, 2018.

Artaza-Irigaray C, Molina-Pineda A, Aguilar-Lemarroy A, Ortiz-Lazareno P, Limón-Toledo LP, Pereira-Suárez AL, Rojo-Contreras W, Jave-Suárez LF. E6/E7 and E6* From HPV18 Upregulate IL-6 Expression Independently of p53 in Keratinocytes. **Frontiers in Immunology**, 10:1676, Jul, 2019.

Bahary N, Wang-Gillam A, Haraldsdottir S, Somer BG, Lee JS, O'Rourke MA, Nayak-Kapoor A, Beatty GL, Liu M, Delman D, Rossi GR, Kennedy EP, Vahanian NN, Link CJ, Garrido-Laguna I. Phase 2 trial of the IDO pathway inhibitor indoximod plus gemcitabine / nab-paclitaxel for the treatment of patients with metastatic pancreas cancer. **Journal of Clinical Oncology**, 36(Suppl. abstr 4015), 4015-4015, Mai, 2018.

Ball HJ, Sanchez-Perez A, Weiser S, Austin CJ, Atelbauer F, Mil J, McQuillan JA, Stocker R, Jemiin LS, Hunt NH. Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase-like protein found in humans and mice. **Gene**, 396(1):203-13, Apr, 2007.

Balsitis S, Dick F, Dyson N, Lambert PF. Critical role for non-pRb targets of human papillomavirus type 16 E7 in cervical carcinogenesis. **Cancer Research**, 66(19):9393-400, Oct, 2006.

Bellone G, Smirne C, Mauri FA, Tonel E, Carbone A, Buffolino A, Dughera L, Robecchi A, Pirisi M, Emanuelli G. Cytokine expression profile in human pancreatic carcinoma cells and in surgical specimens: implications for survival. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, 55(6):684-98, Jun, 2006.

Belluco C, Nitti D, Frantz M, Toppan P, Basso D, Plebani M, Lise M, Jessup JM. Interleukin-6 blood level is associated with circulating carcinoembryonic antigen and prognosis in patients with colorectal cancer. **Annals of Surgical Oncology**, 7(2):133-8, Mar, 2000.

Benson JM, Shepherd DM. Aryl hydrocarbon receptor activation by TCDD reduces inflammation associates with Crohn's disease. **Toxicological Sciences**, 120(1):68-78, Mar, 2011.

Bhatla N, Bereke JS, Cuello Fredes M, Denny LA, Grenman S, Karunaratne K, Kehoe ST, Konishi I, Olawaiye AB, Prat J, Sankaranarayanan R, Brierley J, Mutch D, Querleu D, Cibula D, Quinn M, Botha H, Sigurd L, Rice L, Ruy HS, Ngn H, Maenpaa J, Andrijono A, Purwoto G, Maheshwari A, Bafna UD, Plante M, Natarajan J. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, 145(1):129-135, Apr, 2019.

Bode JG, Nimmegern A, Schmitz J, Schaper F, Schmitt M, Frisch W, Haussinger D, Heinrich PC, Graeve L. LPS and TNFalpha induce SOCS3 mRNA and inhibit IL-6 induced activation of STAT3 in macrophages. **FEBS Letter**, 463(3):365-70, Dec, 1999.

Bolpetti A, Silva JS, Villa LL, Lepique AP. Interleukin-10 production by tumor infiltrating macrophages plays a role in Human Papillomavirus 16 tumor growth. **BMC Immunology**, 11:27, Jun, 2010.

Bosch FX, Broker TR, Forman D, Moscicki AB, Gillison ML, Doorbar J, Stern PL, Stanley M, Arbyn M, Poljak M, Cuzick J, Castle PE, Schiller JT, Markowitz LE, Fisher WA, Canfell K, Denny LA, Franco EL, Steben M, Kane MA, Schiffman M, Meijer CJ, Sankaranarayanan R, Castellsagué X, Kim JJ, Brotons M, Alemany L, Alberto G, Diaz M, de Sanjosé S, et.al. Comprehensive control of human papillomavirus infections and related diseases. **Vaccine**, 31 Suppl. 7:H1-31, Dec, 2013.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jernal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **A Cancer Journal for Clinicians**, 68(6), 394-424, Nov, 2018.

Brisson M, Drolet M. Global elimination of cervical cancer as a public health problem. **The Lancet Oncology**, 20(3):319-21, Mar, 2019.

Britan A, Maffre V, Tone S, Drevet JR. Quantitative and spatial differences in the expression of tryptophan-metabolizing enzymes in mouse epididymis. **Cell and Tissue Research**, 324(2):301-10, May, 2006.

Brochez L, Chevrolet I, Kruse V. The rationale of indoleamine 2,3-dioxygenase inhibition of cancer therapy. **European Journal of Cancer**, 76:167-182, May, 2017.

Bruni L, Barrionuevo-Rosas L, Albero G, Serrano B, Mena M, Gómez D, Muñoz J, Bosch FX, de Sanjosé S. ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). **Human Papillomavirus and Related Diseases in the World. Summary Report**, 70p., Jun, 2017.

Cavia-Saiz M, Rodríguez PM, Ayala BL, García-González M, Coma-Del Corral MJ, Girón, CG. The role of plasma IDO activity as a diagnostic marker of patients with colorectal cancer. **Molecular Biology Report**, 41(4), 2275-9, Abr, 2014.

Chandra J, Miao Y, Romoff N, Frazer IH. Epithelium expressing the E7 oncoprotein of HPV16 attracts immune-modulatory dendritic cells to the skin and suppresses their antigen-processing capacity. **PLoS ONE**, 11(3):e0152886, Mar, 2016.

Chang Q, Bournazou E, Sansone P, Berishaj M, Gao SP, Daly L, Wels J, Theilen T, Granitto S, Zhang X, Cotari J, Alpaugh ML, de Stanchina E, Manova K, Li M, Bonafe M, Ceccarelli C, Taffurelli M, Santini D, Altan-Bonnet G, Kaplan R, Norton L, Nishimoto N, Huszar D, Lyden D, Bromberg J. The IL-6/JAK/STAT3 feed-forward loop drives tumorigenesis and metastasis. **Neoplasia**, 15(7):848-62, Jul, 2013.

Chen IC, Lee KH, Hsu YH, Wang WR, Chen CM, Cheng YW. Expression Pattern and Clinicopathological Relevance of the Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1/Tryptophan 2,3-Dioxygenase Protein in Colorectal Cancer. **Disease Markers**, 2016(1), 1-9, Jul, 2016.

Chen MF, Chen PT, Lu MS, Lin PY, Chen WC, Lee KD. IL-6 expression predicts treatment response and outcome in squamous cell carcinoma of the esophagus. **Molecular Cancer**, 12:26, Apr, 2013.

Cheng YW, Lee H, Shiao MY, Wu TC, Huang TT, Chang YH. Human papillomavirus type 16/18 up-regulates the expression of interleukin-6 and antiapoptotic Mcl-1 in non-small cell lung cancer. **Clinical Cancer Research**, 14(15):4705-12, Aug, 2008.

Chesson HW, Dunne EF, Hariri S, Markowitz LE. The estimated lifetime probability of acquiring human papillomavirus in the United States. **Sexually Transmitted Diseases**, 41(11):660-64, Nov, 2014.

Chu NR, Wu HB, Wu T-C, Boux LJ, Mizzen LA, Siegel MI. Immunotherapy of a human papillomavirus type 16 E7-expressing tumor by administration of fusion protein comprised of Mycobacterium bovis BCG Hsp65 and HPV16 E7. **Cell Stress Chaperones**, 5(5), 401-5, Nov, 2000.

Condamine T, Ramachandran I, Youn JI, Gabilovich DI. Regulation of tumor metastasis by myeloid-derived suppressor cells. **Annual Review of Medicine**, 66(1), 97-110, Jan, 2015.

Cozen W, Gill PS, Ingles AS, Masood R, Martínez-Maza O, Cockburn MG, Gauderman WJ, Pike MC, Bernstein L, Nathwani BN, Salam MT, Danley KL, Wang W, Gage, J, Gundell-Miller S, Mack TM. IL-6 levels and genotype are associated with risk of Young adult Hodgkin lymphoma. **Blood Advances**, 103(8):3216-21, Apr, 2004.

Crow JM. HPV: The global burden. **Nature**, 488(7413):S2-3, Aug, 2012.

Culig Z, Puhr M. Interleukin-6: a multifunctional targetable cytokine in human prostate cancer. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 360(1-2):52-8, Sep, 2012.

Culig Z, Steiner H, Bartsch G, Hobisch A. Interleukin-6 regulation of prostate cancer cell growth. **Journal of Cellular Biochemistry**, 95(3):497-505, Jun, 2005.

Damania B. A Virological Perspective on Cancer. **PLOS Pathogens**, 12(2):e1005326, Feb, 2016.

Damuzzo V, Pinton L, Desantis G, Solito S, Marigo I, Bronte V, Mandruzzato S. Complexity and Challenges in Defining Myeloid-Derived Suppressor Cells. **Cytometry B Clinical Cytometry**, 88(2), 77-91, 2015.

Darrasse-Jeze G, Podsypanina K. How numbers, nature, and immune status of foxp3(+) regulatory T-cells shape the early immunological events in tumor development. **Frontiers in Immunology**, 4:292, Sep, 2013.

de Araújo EF, Feriotti C, Galdino NAL, Preite NW, Calich VLG, Loures FV. The IDO-AhR Axis Controls Th17/Treg Immunity in a Pulmonary Model Fungal Infection. **Frontiers in Immunology**, 8:880, Jul, 2017.

de Martel C, Plummer M, Vignat J, Franceschi S. Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type. **International Journal of Cancer**, 141(4):664-70, Aug, 2017.

De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. **Virology**, 324(1):17-27, Jun, 2004.

Dethlefsen C, Hojfeldt G, Hojman P. The role of intratumoral and systemic IL-6 in breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, 138(3):657-64, Apr, 2013.

Dietrich C, Kaina B. The aryl hydrocarbon receptor (AhR) in the regulation of cell-cell contact and tumor growth. **Carcinogenesis**, 31(8):1319-28, Aug, 2010.

DiNatale BC, Smith K, Krishnegowda G, Amin SG, Perdew GH. Ah receptor antagonismo repress head and neck tumor cell aggressive phenotype. **Molecular Cancer Research**, 10(10):1369-79, Oct, 2012.

Diniz MO, Ferreira LCS. Biotecnologia aplicada ao desenvolvimento de vacinas. **Estudos Avançados**, Brasil, 24(70), 19-30, Out, 2010.

Diniz MO, Ferreira LC. Enhanced anti-tumor effect of a gene gun-delivered DNA vaccine encoding the human papillomavirus type 16 oncoproteins genetically fused to the herpes simplex virus glycoprotein D. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 44(5):421-7, May, 2011.

Diniz MO, Lasaro MO, Ertl HC, Ferreira LC. Immune responses and therapeutic antitumor effects of an experimental DNA vaccine encoding human papillomavirus type 16 oncoproteins genetically fused to herpesvirus glycoprotein D. **Clinical and Vaccine Immunology**, 17(10):1576-83, Oct, 2010.

Doorbar J. The papillomavirus life cycle. **Journal of Clinical Virology**, 32S, S7-S15, Jan, 2005.

Dorff TB, Goldman B, Pinski JK, Mack PC, Lapa PN Jr, Van Veldhuizen PJ Jr, Quinn DI, Vogelzang NJ, Thompson IM Jr, Hussain MH. Clinical and correlative results of SWOG S0354: a phase II trial of CNT0328 (siltuximab), a monoclonal antibody against interleukin-6, in chemotherapy-pretreated patients with castration-resistant prostate cancer. **Clinical Cancer Research**, 16(11):3028-34, Jun, 2010.

DURST M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 80(12):3812-5, Jun, 1983.

Ehrlich AK, Pennington JM, Wang X, Rohlman D, Punj S, Lohr CV, Newman MT, Kolluri SK, Kerkvliet NI. Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor by 10-CI-BBQ Prevents Insulinitis and Effector T Cell Development Independently of Foxp3+ Regulatory T Cells in Nonobese Diabetic Mice. **Journal of Immunology**, 196(1):264-73, Jan, 2016.

Franco E, Villa L, Rohan T, Ferenczy A, Petzl-Erler M, Matlashewski G, Baggio M, Caballero O, Candeias J, Ferreira S, Galan L, Prado J, Rahal P, Ribeiro M, Ruiz A, Santos M, Sichero L, Sobrinho J, Termini L, Désy M, Duarte-Franco E, Robitaille J, Rosseau MC, Schlecht N. Design and methods of the Ludwig-McGill longitudinal study of the natural history of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Brazil. **Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health**, 6(4):223-33, 1999.

Frazer IH. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. **Reviews Immunology**, 4(1):46-54, Jan, 2004.

Feltkamp MC, Smits HL, Vierboom MP, Minnaar RP, de Jongh BM, Drijfhout JW, ter Schegget J, Melief CJ, Kast WM. Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope-containing peptide protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16-transformed cells. **European Journal of Immunology**, 23(9):2242-9, Sep, 1993.

Ferguson-Smith AC, Chen YF, Newman MS, May LT, Sehgal PB, Ruddle FH. Regional localization of the interferon-beta 2/B-cell stimulatory factor 2/hepatocyte

stimulating factor gene to human chromosome 7p15-p21. **Genomics**, 2(3):203-8, Apr, 1988.

Ferns DM, Kema IP, Buist MR, Nijman HW, Kenter GG, Jordanova ES. Indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) metabolic activity is detrimental for cervical cancer patient survival. **Oncoimmunology**, 4(2), e981457, Feb, 2015.

Fisher DT, Appenheimer MM, Evans SS. The two faces of IL-6 in the tumor microenvironment. **Seminars in Immunology**, 26(1):38-47, Feb, 2014.

Fukuno K, Hara T, Tsurumi H, Shibata Y, Mabuchi R, Nakamura N, Kitagawa J, Shimizu M, Ito H, Saito K, Moriwaki H. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in leukemic cells indicates an unfavorable prognosis in acute myeloid leukemia patients with intermediate-risk cytogenetics. **Leukemia & Lymphoma**, 56(5):1398-405, May, 2015.

Fulciniti M, Hideshima T, Vermot-Desroches C, Pozzi S, Nanjappa P, Shen Z, Patel N, Smith ES, Wang W, Prabhala R, Tai YT, Tassone P, Anderson KC, Munshi NC. A high-affinity fully human anti-IL-6 mAb, 1339, for the treatment of multiple myeloma. **Clinical Cancer Research**, 15(23):7144-52, Dec, 2009.

Garcia-Tuñón I, Ricote M, Ruiz A, Fraile B, Paniagua R, Royula M. IL-6, its receptors and its relationship with bcl-2 and bax proteins in infiltrating and in situ human breast carcinoma. **Histopathology**, 47(1):82-9, Jul, 2005.

Garland SM, Steben M, Sings HL, James M, Lu S, Railkar R, Barr E, Haupt RM, Joura EA. Natural history of genital warts: analysis of the placebo arm of 2 randomized phase III trials of a quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) vaccine. **The Journal of infectious diseases**, 199(6):805–814, May, 2009.

Godin-Ethier J, Hanafi LA, Piccirillo CA, Lapointe R. Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in human cancers: clinical and immunologic perspectives. **Clinical Cancer Research**, 17(22):6985-91, Nov, 2011.

Goudot C, Coillard A, Villani AC, Gueguen P, Cros A, Sarkizova S, Tang-Huau TL, Bohec M, Baulande S, Hacohe N, Amigorena S, Segura E. Aryl Hydrocarbon Receptor Controls Monocyte Differentiation into Dendritic Cells versus Macrophages. **Immunity**, 47(3):582-96, Sep, 2017.

Grivennikov SI, Karin M. Inflammatory cytokines in cancer: tumor necrosis factor and interleukin 6 take the stage. **Annals of the Rheumatic Diseases**, 70 Suppl 1:i104-8, Mar, 2011.

Guo Y, Xu F, Lu T, Duan Z, Zhang Z. Interleukin-6 signaling pathway in targeted therapy for cancer. **Cancer Treatment Reviews**, 38(7):904-10, Nov, 2012.

Gutiérrez-Vázquez C, Quintana FJ. Regulation of the Immune Response by the Aryl Hydrocarbon Receptor. **Immunity**, 48(1):19-33, Jan, 2018.

Hagensee ME, Yaegashi N, Galloway DA. Self-assembly of human papillomavirus type 1 capsids by expression of the L1 protein alone or by coexpression of the L1 and L2 capsid proteins. **Journal of Virology**, 67(1):315-22, Jan, 1993.

Hagi T, Nakamura T, Iino T, Matsubara T, Asanuma K, Matsumine A, Sudo A. The diagnostic and prognostic value of interleukin-6 in patients with soft tissue sarcomas. **Scientific Reports**, 7(1):9640, Aug, 2017.

Hahn ME. Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. **Chemico-Biological Interactions**, 141(1-2):131-60, Sep, 2002.

Hammes LS, Tekmal RR, Naud P, Edelweiss MI, Kirma N, Valente PT, Syrjanen KJ, Cunha-Filho JS. Macrophages, inflammation and risk of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) progression – clinicopathological correlation. **Gynecologic Oncology**, 105(1):157-65, Apr, 2007.

Hamid O, Bauer TM, Spira AI, Olszanski AJ, Patel SP, Wasser JS, Smith DC, Balmanoukian AS, Aggarwal C, Schmidt EV, Zhao Y, Gowda H, Gangadhar TC. Epcadostat plus pembrolizumab in patients with SCCHN: preliminary phase I/II results from ECHO-202/KEYNOTE-037. **Journal of Clinical Oncology**, 35(15S), 6010, Mai, 2017.

Hartwig S, Baldauf JJ, Dominiak-Felden G, Simondon F, Alemany L, de Sanjosé S, Castellsagué X. Estimation of the epidemiological burden of HPV-related anogenital cancers, precancerous lesions, and genital warts in women and men in Europe: Potential additional benefit of a nine-valent second generation HPV vaccine compared to first generation HPV vaccines. **Papillomavirus Research**, 1:90-100, Dec, 2015.

Hasan UA, Bates E, Takeshita F, Biliato A, Accardi R, Bouvard V, Mansour M, Vincent I, Gissmann L, Iftner T, Sideri M, Stubenrauch F, Tommasino M. TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16. **The Journal of Immunology**, 178(5), 3186-97, Mar, 2007.

Hascitha J, Priya R, Jayavelu S, Dhandapani H, Selvaluxmy G, Sunder Singh S, Rajkumar T. Analysis of Kynurenine/Tryptophan ratio and expression of IDO1 and 2 mRNA in tumour tissue of cervical cancer patients. **Clinical Biochemistry**, 49(12):919-24, Aug, 2016.

Hauben E, Gregori S, Draghici E, Migliavacca B, Olivieri S, Woisetschlager M, Roncarolo MG. Activation of the aryl hydrocarbon receptor promotes allograft-specific tolerance direct and dendritic cell-mediated effects on regulatory T cells. **Blood**, 112(4):1214-22, Aug, 2008.

Heeren AM, Van Dijk I, Berry DRAI, Khelil M, Ferns D, Kole J, Musters RJP, Thijssen VL, MOM CH, Kenter GG, Bleeker MCG, De Gruijl TD, Jordanova ES. Indoleamine 2,3-dioxygenase expression pattern in the tumor microenvironment predicts clinical outcome in early stage cervical cancer. **Frontiers in Immunology**, 9:1598, Jul, 2018.

Hodge DR, Hurt EM, Farrar WL. The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer. **European Journal of Cancer**, 41(16):2502-12, Nov, 2005.

Holmgaard RB, Zamarin D, Li Y, Gasmi B, Munn DH, Allison JP, Merghoub T, Wolchok JD. Tumorexpressed IDO recruits and activates MDSCs in a treg-dependent manner. **Cell Reports**, 13(2), 412–24, Out, 2015.

Hong J, Hueckelhoven A, Wang L, Schmitt A, Wuchter P, Tabarkiewicz J, Kleist C, Bieback K, Ho AD, Schmitt M. Indoleamine 2,3-dioxygenase mediates inhibition of virus-specific CD8(+) T cell proliferation by human mesenchymal stromal cells. **Cytherapy**, 18(5):621-9, May, 2016.

Hornýák L, Dobos N, Koncz G, Karányi Z, Páll D, Szabó Z, Halmos G, Székvolgyi L. The Role of Indoleamine-2,3-Dioxygenase in Cancer Development, Diagnostics, and Therapy. **Frontiers in Immunology**, 9:151, Jan, 2018.

Hou DY, Muller AJ, Sharma MD, DuHadaway J, Banerjee T, Johnson M, Mellor AL, Prendergast GC, Munn DH. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells by stereoisomers of 1-methyl-tryptophan correlates with antitumor responses. **Cancer Research**, 67(2), 792-801, Jan, 2007.

HPVcenter – The Human Papillomavirus Reference Center. Disponível em: <http://www.hpvcenter.se> . Acesso em: 20/01/2020.

Hu Y, Cong X, Chen L, Qi J, Wu X, Zhou M, Yoo D, Li F, Sun W, Wu J, Zhao X, Chen Z, Yu J, Du Y, Wang J. Synergy of TLR3 and 7 ligands significantly enhances function of DCs to present inactivated PRRSV antigen through TRIF/MyD88-NF-κB signaling pathway. **Scientific Reports**, 6:23977, Apr, 2016.

Huang Y, Wu L, Zuo J, Li N, An J, Hu J, Huang M. The role of HPV genotypes and persistence in follow-up of cervical intraepithelial neoplasia after treatment. **Journal of Clinical Oncology**, 29(15):1561, May, 2011.

IARC-Working-Group. Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018. **International Agency for Research on Cancer**, 263, Sep, 2018.

INCA – Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância – Rio de Janeiro, 2018.

Inaba T, Ino K, Kajiyama H, Shibata K, Yamamoto E, Kondo S, Umezu T, Nawa A, Takikawa O, Kikkawa F. Indoleamine 2,3-dioxygenase expression predicts impaired survival of invasive cervical cancer patients treated with radical hysterectomy. **Gynecologic Oncology**, 117(3):423-8, Jun, 2010.

Ino K, Yamamoto E, Shibata K, Kajiyama H, Yoshida N, Terauchi M, Nawa A, Nagasaka T, Takikawa O, Kikkawa F. Inverse correlation between tumoral indoleamine 2,3-dioxygenase expression and tumor-infiltrating lymphocytes in endometrial cancer: its association with disease progression and survival. **Clinical Cancer Research**, 14(8), 2310-7, Abr, 2008.

Jenkins RW, Barbie DA, Flaherty KT. Mechanisms of resistance to immune checkpoint inhibitors. **British Journal of Cancer**, 118(1):9-16, Jan, 2018.

Jourdan M, Veyrune JL, De Vos J, Redal N, Couderc G, Klein B. A major role for Mcl-1 antiapoptotic protein in the IL-6-induced survival of human myeloma cells. **Oncogene**, 22(19):2950-9, May, 2003.

Kang TH, Mao C, Lee SY, Chen A, Lee J, Kim TW. Chemotherapy acts as an adjuvant to convert the tumor microenvironment into a highly permissive state for vaccination-induced antitumor immunity. **Cancer Research**, 73(8), 2493–2505, Abr, 2013.

Katz JB, Muller AJ, Prendergast GC. Indoleamine 2,3-dioxygenase in T-cell tolerance and tumoral immune escape. **Immunological Reviews**, 222:206-21, Apr, 2008.

King NJ, Thomas SR. Molecules in focus: indoleamine 2,3-dioxygenase. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 39(12):2167-72, 2007.

Kirkwood JM, Butterfield LH, Tarhini AA, Zarour H, Kalinski P, Ferrone S. Immunotherapy of cancer in 2012. **CA: A Cancer Journal of Clinicians**, 62(5), 309–35, Set, 2012.

Kobayashi A, Weinberg V, Darragh T, Smith-McCune K. Evolving immunosuppressive microenvironment during human cervical carcinogenesis. **Mucosal Immunology**, 1(5):412-20, Sep, 2008.

Kreimer AR, Schiffman M, Herrero R, Hildesheim A, González P, Burk RD, Porras C, Sherman ME, Demuth F, Cheung L, Bratti C, Cecilia Rodríguez A. Long-term risk of recurrent cervical human papillomavirus infection and precancer and cancer following excisional treatment. **International Journal of Cancer**, 131(1):211-8, Jul, 2012.

Lawrence BP, Denison MS, Novak H, Vonderstrasse BA, Harrer N, Neruda W, Reichel C, Woisetschlager M. Activation of the aryl hydrocarbon receptor is essential for mediating the anti-inflammatory effects of a novel low-molecular-weight compound. **Blood**, 112(4):1158-65, Aug, 2008.

Lee SJ, Yang A, Wu TC, Hung CF. Immunotherapy for human papillomavirus-associated disease and cervical cancer: review of clinical and translational research. **Journal of Gynecologic Oncology**, 27(5), e51, Set, 2016.

Lepique AP, Daghestanli KR, Cuccovia IM, Villa LL. HPV16 tumor associated macrophages suppress antitumor T cell responses. **Clinical Cancer Research**, 15(13):4391-400, Jul, 2009.

Lewis HC, Chinnadurai R, Bosinger SE, Galipeau J. The IDO inhibitor 1-methyl tryptophan activates the aryl hydrocarbon receptor response in mesenchymal stromal cells. **Oncotarget**, 8(54):91914-27, Aug, 2017.

Li J, Chen S, Ge J, Lu F, Ren S, Zhao Z, Pu X, Chen X, Sun J, Gu Y. A novel therapeutic vaccine composed of a rearranged human papillomavirus type 16 E6/E7 fusion protein and Fms-like tyrosine kinase-3 ligand induces CD8⁺ T cell responses and antitumor effect. **Vaccine**, 35(47), 6459-6467, Nov, 2017.

Li Y, Backesjo CM, Haldosén LA, Lindgren U. IL-6 receptor expression and IL-6 effects change during osteoblast differentiation. **Cytokine**, 43(2):165-73, Aug, 2008.

Libera LSD, Alves GNS, Souza HG, Carvalho MAS. Human Papillomavirus infection evaluation in cytopathological exams. **Brazilian Journal of Clinical Analyses**, 48(2), 138-43, Jan, 2016.

Lin KY, Guarnieri FG, Staveley-O'Carroll KF, Levitsky HI, August JT, Pardoll DM, Wu TC. Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. **Cancer Research**, 56(1), 21-6, Jan, 1996.

Lin Y, Gong X, Mousseau R. Barriers of Female Breast, Colorectal, and Cervical Cancer Screening Among American Indians – Where to Intervene?. **AIMS Public Health**, 3(4), 891-906, Out, 2016.

Linhares AC, Lilla LL. Vaccines against rotavirus and human papillomavirus (HPV). **Jornal de Pediatria**, 82(3): Suppl 0, Jul, 2006.

Litzenburger UM, Opitz CA, Sahm F, Rauschenbach KJ, Trump S, Winter M, Ott M, Ochs K, Lutz C, Liu X, Anastasov N, Lehmann I, Höfer T, von Deimling A, Wick W, Platten M. Constitutive IDO expression in human cancer is sustained by an autocrine signaling loop involving IL-6, STAT3 and the AHR. **Oncotarget**, 5(4), 1038-51, Feb, 2014.

Liu Y, Liang X, Yin C, Lv J, Tang K, Ma J, Ji T, Zhang H, Dong W, Jin X, Chen D, Li Y, Zhang S, Xie HQ, Zhao B, Zhao T, Lu J, Hu ZW, Cao X, Qin FX, Huang B. Blockade of IDO-kynurenine-AhR metabolic circuitry abrogates IFN- γ -induced immunologic dormancy of tumor-repopulating cells. **Nature Communications**, 8:15207, May, 2017.

Lob S, Konigsrainer A, Rammensee HG, Opelz G, Terness P. Inhibitors of indoleamine-2,3-dioxygenase for cancer therapy: can we see the wood for the trees?. **Nature Reviews Cancer**, 9(6):445-52, Jun, 2009.

Long GV, Dummer R, Hamid O, Gajewski T, Caglevic C, Dalle S, Arance A, Carlino MS, Grob JJ, Kim TM, Demidov LV, Robert C, Larkin JMG, Anderson J, Maleski JE, Jones MM, Diede SJ, Mitchell TC. Epcadostat (E) plus pembrolizumab (P) vs. pembrolizumab alone in patients (pts) with unresectable or metastatic melanoma: results of the phase 3 ECHO-301/KEYNOTE-252 study. **Journal of Clinical Oncology**, 36(15), 108-108, Mai, 2018.

Lowy DR, Schiller JT. Prophylactic human papillomavirus vaccines. **The Journal of Clinical Investigation**, 116(5), 1167-73, Mai, 2006.

Maccio A, Madeddu C. The role of interleukin-6 in the evolution of ovarian cancer: clinical and prognostic implications – a review. **Journal of Molecular Medicine**, 91(12):1355-68, Dec, 2013.

Mammas IN, Spandidos DA. Paediatric virology as a new educational initiative: An interview with nobelist professor of virology Harald zur Hausen. **Experimental and Therapeutic Medicine**, 14(4):3329-31, Oct, 2017.

Masterson L, Lechner M, Loewenbein S, Mohammed H, Davies-Husband C, Fenton T, Sudhoff H, Jani P, Goon P, Sterling J. CD8⁺ T cell response to human papillomavirus 16 E7 is able to predict survival outcome in oropharyngeal cancer. **European Journal of Cancer**, 67, 141-151, Nov, 2016.

Mauer J, Denson JL, Bruning JC. Versatile functions for IL-6 in metabolism and cancer. **Trends of Immunology**, 36(2):92-101, Feb, 2015.

McBride AA, Warburton A. The role of integration in oncogenic progression of HPV-associated cancers. **PLOS Pathology**, 13(4):e1006211, Apr, 2017.

Meininger D, Zalameda L, Liu Y, Stepan LP, Borges L, McCarter JD, Sutherland CL. Purification and kinetic characterization of human indoleamine 2,3-dioxygenase 1 and 2 (IDO1 and IDO2) and Discovery of selective IDO1 inhibitors. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics**, 1814(12):1947-54, Dec, 2011.

Metz R, Duhadaway JB, Kamasani U, Laury-Kleintop L, Muller AJ, Predergast GC. Novel tryptophan catabolic enzyme IDO2 is the preferred biochemical target of the antitumor indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitory compound D-1-methyl-tryptophan. **Cancer Research**, 67(15):7082-7, Aug, 2007.

Mihara M, Hashizume M, Yoshida H, Suzuki M, Shiina M. UI-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. **Clinical Science**, 122(4):143-59, Feb, 2012.

Ministério da Saúde. Estudo epidemiológico sobre prevalência nacional de infecção pelo HPV. 120 p, 2019. Disponível em: <http://saude.gov.br/saude-de-a-z/hpv> . Acesso em: 15/12/2019.

Mittal D, Kassianos AJ, Tran LS, Bergot A-S, Gosmann C, Hofmann J, Blumenthal A, Leggatt GR, Frazer IH. Indoleamine 2,3-dioxygenase activity contributes to local immune suppression in the skin expressing human papillomavirus oncoprotein E7. **Journal of Investigative Dermatology**, 133(12), 2686–94, Dez, 2013.

Miura T, Mitsunaga S, Ikeda M, Shimizu S, Ohno I, Takahashi H, Furuse J, Inagaki M, Higashi S, Kato H, Terao K, Ochiai A. Characterization of patients with advanced pancreatic cancer and high serum interleukin-6 levels. **Pancreas**, 44(5):756-63, Jul, 2015.

Monie A, Tsen SWD, Hung CF, Wu TC. Therapeutic HPV DNA vaccines. **Expert Review of Vaccines**, 8(9), 1221-1235, Set, 2009.

Moreno AC, Clara RO, Coimbra JB, Júlio AR, Albuquerque RC, Oliveira EM, Maria-Engler SS, Campa A. The expanding roles of 1-methyl-tryptophan (1-MT): in addition to inhibiting kynurenine production, 1-MT activates the synthesis of melatonin in skin cells. **FEBS Journal**, 280(19):4782-92, Oct, 2013.

Moreno ACR, Prochia BFMM, Pagni RL, Souza PDC, Pegoraro R, Rodrigues KB, Barros TB, Aps LRMM, de Araújo EF, Calich VLG, Ferreira LCS. The Combined Use of Melatonin and an Indoleamine 2,3-Dioxygenase-1 Inhibitor Enhances Vaccine-Induced Protective Cellular Immunity to HPV16-Associated tumor. **Frontiers in Immunology**, 9:1914, Aug, 2018.

Muller AJ, DuHadaway JB, Donover OS, Sutano-Ward E, Prendergast GC. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy. **Nature Medicine**, 11(3):312-9, Mar, 2005.

Muñoz N, Bosch FX, De Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJF, Meijer CJLM. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. **New England Journal of Medicine**, 348(6):518–527, Feb, 2003.

Munn DH. Indoleamine 2,3-dioxygenase, Tregs and cancer. **Current Medical Chemistry**, 18(15):2240-6, 2011.

Munn DH. Blocking IDO activity to enhance anti-tumor immunity. **Frontiers in Bioscience**, E4, 734–45, Jan, 2012.

Munn DH, Mellor AL. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. **Journal of Clinical Investigation**, 117(5):1147-54, May, 2007.

Nagasaki T, Hara M, Nakanishi H, Takahashi H, Sato M, Takeyama H. Interleukin-6 release by colon cancer-associated fibroblasts is critical for tumor angiogenesis: anti-interleukin-6 receptor antibody suppressed angiogenesis and inhibited tumor-stroma interaction. **British Journal of Cancer**, 110(2):469-78, Jan, 2014.

Nakamura T, Shima T, Saeki A, Hidaka T, Nakashima A, Takikawa O, Saito S. Expression of indoleamine 2, 3-dioxygenase and the recruitment of Foxp3-expressing regulatory T cells in the development and progression of uterine cervical cancer. **Cancer Science**, 98(6):874-81, 2007.

Nakamura Y, Mashima Y, Kameyama K, Mukai M, Oguchi Y. Detection of human papillomavirus infection in squamous tumours of the conjunctiva and lacrimal sac

by immunohistochemistry, in situ hybridisation, and polymerase chain reaction. **Brazilian Journal of Ophthalmology**, 81(4):308-13, Apr, 1997.

Narita Y, Kitamura H, Wakita D, Sumida K, Masuko K, Terada S, Nakano K, Nishimura T. The key role of IL-6-arginase cascade for inducing dendritic cell-dependent CD4(+) T cell dysfunction in tumor-bearing mice. **Journal of Immunology**, 190(2):812-20, Jan, 2013.

Nishikawa H, Sakaguchi S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. **Current Opin in Immunology**, 27(1):1-7, 2014.

Oh K, Lee OY, Shon SY, Nam O, Ryu PM, Seo MW, Lee DS. A mutual activation loop between breast cancer cells and myeloid-derived suppressor cells facilitates spontaneous metastasis through IL-6 trans-signaling in a murine model. **Breast Cancer Research**, 15(5):R79, 2013.

Ohno Y, Toyoshima Y, Yurino H, Monma N, Xiang H, Sumida K, Kaneumi S, Terada S, Hashimoto S, Ieko K, Homma S, Kawamura H, Takahashi N, Taketomi A, Kitamura H. Lack of interleukin-6 in the tumor microenvironment augments type-1 immunity and increases the efficacy of cancer immunotherapy. **Cancer Science**, 108(10):1959-66, Oct, 2017.

Okamoto A, Nikaido T, Ochiai K, Takakura S, Saito M, Aoki Y, Ishii N, Yanaihara N, Yamada K, Takikawa O, Kawaguchi R, Isonichi S, Tanaka T, Urashima M. Indoleamine 2,3-dioxygenase serves as a marker of poor prognosis in gene expression profiles of serous ovarian cancer cells. **Clinical Cancer Research**, 11(16):6030-9, 2005.

Opitz CA, Litztenburger UM, Sahm F, Ott M, Tritschler I, Trump S, Schumacher T, Jestaedt L, Schrenk D, Weller M, Jugold M, Guillemin GJ, Miller CL, Lutz C, Radwimmer B, Lehmann I, von Deimling A, Wick W, Platten M. Na endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. **Nature**, 478(7368):197-203, Oct, 2011.

Paul W. IL-6: a multifunctional regulator of immunity and inflammation. **Japanese Journal of Cancer Research**, 82(12):1458-9, Dec, 1991.

Platten M, von Knebel Doeberitz N, Oezen I, Wick W, Ochs K. Cancer Immunotherapy by Targeting IDO1/TDOO and Their Downstream Effectors. **Frontiers in Immunology**, 5:673, Jan, 2015.

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. **The Lancet Global Health**, 4(9):e609-16, Sep, 2016.

Poggi A, Musso A, Dapino I, Zocchi MR. Mechanisms of tumor escape from immune system: role of mesenchymal stromal cells. **Immunology Letters**, 159(1-2):55-72, 2014.

Porchia BF, Diniz MO, Cariri FA, Santana VC, Amorim JH, Balan A, Braga CJ, Ferreira LC. Purified herpes simplex type 1 glycoprotein D (gD) genetically fused with the type 16 human papillomavirus E7 oncoprotein enhances antigen-specific CD8+ T cell responses and confers protective antitumor immunity. **Molecular Pharmaceutics**, 8(6):2320-30, 2011.

Porchia BFMM, Moreno ACR, Ramos RN, Diniz MO, de Andrade LHTM, Rosa DS, Barbuto JAM, Boscardin SB, Ferreira LCS. Herpes simplex virus glycoprotein D

targets a specific dendritic cell subset and improves the performance of vaccines to human papillomavirus-associated tumors. **Molecular Cancer Therapeutics**, 16:1922–33, 2017.

Prendergast GC, Malachowski WP, DuHadaway JB, Muller AJ. Discovery of IDO1 inhibitors: from bench to bedside. **Cancer Research**, 77:6795–811, 2017.

Prendergast GC, Smith C, Thomas S, Mandik-Nayak L, Laury-Kleintop L, Metz R, Muller AJ. Indoleamine 2,3-dioxygenase pathways of pathogenic inflammation and immune escape in cancer. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, 63(7):721-35, Jul 2014.

Punj S, Kopparapu P, Jang HS, Philips JL, Pennington J, Rohlman D, O'Donnell E, Iversen PL, Kolluri SK, Kerkvliet NI. Benzimidazoisoquinolines: a new class of rapidly metabolized aryl hydrocarbon receptor (AhR) ligands that induce AhR-dependent Tregs and prevent murine graft-versus-host disease. **PloS One**, 9(2):e88726, Feb, 2014.

Ricciuti B, Leonardi GC, Puccetti P, Fallarino F, Bianconi V, Sahebkar A, Baglivo S, Chiari R, Pirro M. Targeting indoleamine-2,3-dioxygenase in cancer: Scientific rationale and clinical evidence. **Pharmacology & Therapeutics**, 196:105-116, Apr, 2019.

Rodrigues CP, Ferreira AC, Pinho MP, de Moraes CJ, Bergami-Santos PC, Barbuto JA. Tolerogenic IDO(+) Dendritic Cells Are Induced by PD-1-Expressing Mast Cells. **Frontiers in Immunology**, 7:9, Jan, 2016.

Roman LD, Wilczynski S, Muderspach LI, Burnett AF, O'Meara A, Brinkman JA, KAst WM, Facio G, Felix JC, Aldana M, Weber JS. A phase II study of Hsp-7 (SGN-00101) in women with high-grade cervical intraepithelial neoplasia. **Gynecologic Oncology**, 106(3):558-66, Sep, 2007.

Sales NS, Silva JR, Aps LRMM, Silva MO, Porchia BFMM, Ferreira LCS, Diniz MO. In vivo electroporation enhances vaccine-mediated therapeutic control of human papilloma virus-associated tumors by the activation of multifunctional and effector memory CD8⁺ T cells. **Vaccine**, 35(52):7240-49, Dec, 2017.

Santos M de O. Incidência, Mortalidade e Morbidade Hospitalar por Câncer em Crianças, Adolescentes e Adultos Jovens no Brasil: Informações dos Registros de Câncer e do Sistema de Mortalidade. **Revista Brasileira de Cancerologia** [Internet], 2019. Disponível em: <https://rbc.inca.gov.br/revista/index.php/revista/article/view/56>. Acesso em: 15/12/19.

Sato N, Saga Y, Mizukami H, Wang D, Takahashi S, Nonaka H, Fujiwara H, Takei Y, Machida S, Takikawa O, Ozawa K, Suzuki M. Downregulation of indoleamine-2,3-dioxygenase in cervical cancer cells suppresses tumor growth by promoting natural killer cell accumulation. **Oncology Reports**, 28(5):1574-8, Nov, 2012.

Scheffner M, Werness BA, Huibregtse J. The E6 Oncoprotein Encoded by Human Papillomavirus Types 16 and 18 Promotes the Degradation of p53. **Cell**, 63(6):1129-36, Dec, 1990.

Schlecht NF, Trevisan A, Duarte-Franco E, Rohan TE, Ferenczy A, Villa LL, Franco EL. Viral load as a predictor of the risk of cervical intraepithelial neoplasia. **International Journal of Cancer**, 103(4):519-24, Feb 2003.

Schiffman M, Doorbar J, Wentzensen N, De Sanjosé S, Fakhry C, Monk BJ, Stanley MA, Franceschi S. Carcinogenic human papillomavirus infection. **Nature Reviews Disease Primers**, 2:16086, Dec, 2016.

Scudellari M. HPV: Sex, cancer and a virus. **Nature**, 503(7476):330-2, Nov, 2013.

Sharma P, Allison JP. The future of immune checkpoint therapy. **Science**, 348(6230):56–61, Apr, 2015.

Shibata Y, Hara T, Nagano J, Nakamura N, Ohno T, Nimomiya S, Ito H, Tanaka T, Saito K, Seishima M, Moriwaki H, Tsurumi H. The Role of Indoleamine 2,3-Dioxygenase in Diethylnitrosamine-Induced Liver Carcinogenesis. **PLoS One**, 11(1):e0146279, Jan, 2016.

Shimizu T, Nomiyama S, Hirata F, Hayaishi O. Indoleamine 2,3-dioxygenase. Purification and some properties. **Journal of Biological Chemistry**, 253(13):4700-6, Jul, 1978.

Shinde R, Hezaveh K, Halaby MJ, Kloetgen A, Chakravarthy A, da Silva Medina T, Deol R, Manion KP, Baglaenko Y, Eldh M, Lamorte S, Wallace D, Chodiseti SB, Ravishankar B, Liu H, Chaudhary K, Munn DH, Tsirigos A, Madaio M, Gabrielsson S, Touma Z, Wither J, De Carvalho DD, McGaha TL. Apoptotic cell-induced AhR activity is required for immunological tolerance and suppression of systemic lupus erythematosus in mice and humans. **Nature Immunology**, 19(6):571-82, Jun, 2018.

Shinde R, McGaha TL. The Aryl Hydrocarbon Receptor: Connecting Immunity to the Microenvironment. **Trends in Immunology**, 39(12):1005-20, Dec, 2018.

Shukla S, Mahata S, Shishodia G, Pandey A, Tyagi A, Vishnoi K, Basir SF, Das BC, Bharti AC. Functional regulatory role of STAT3 in HPV16-mediated cervical carcinogenesis. **PLoS One**, 8(7):e67849, Jul, 2013.

Sichero L, Giuliano AR, Villa LL. Human Papillomavirus and Genital Disease in Men: What We Have Learned from the HIM Study. **Acta Cytologica**, 63(2):109-17, 2019.

Silva JR, Sales NS, Silva MO, Aps LRMM, Moreno ACR, Rodrigues EG, Ferreira LCS, Diniz MO. Expression of a soluble IL-10 receptor enhances the therapeutic effects of a papillomavirus-associated antitumor vaccine in a murine model. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, 68(5):753-63, May, 2019.

Simones T, Shepherd DM. Consequences of AhR activation in steady-state dendritic cells. **Toxicological Sciences**, 119(2):293-307, Feb, 2011.

Singh U, Shevra CR, Singh S, Singh N, Kumar S, Rai M. Interleukin-6 and interleukin-4 levels in multiple myeloma and correlation interleukin-6 with β 2 microglobulin and serum creatinine. **Clinical Cancer Investigation Journal**, 4(2):211-15, Mar, 2015.

Skeate JG, Woodham AW, Einstein MH, Da Silva DM, Kast WM. Current therapeutic vaccination and immunotherapy strategies for HPV-related diseases. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, 12(6):1418-29, Jun, 2016.

Slingluff CL, Fling S, Mauldin IS, Ernstoff MS, Hanks BA, Delman KA, Lawson DH, Gastman B, Kaiser JC, Cheever MA. Pilot trial of an indoleamine 2,3-dioxygenase-

1 (IDO1) inhibitor plus a multi-peptide melanoma vaccine in patients with advanced melanoma. **Journal of Clinical Oncology**, 36(Suppl. abstr 3033), 2018.

Smith C, Chang MY, Parker KH, Beury DW, DuHadaway JB, Flick HE, Boulden J, Sutanto-Ward E, Soler AP, Laury-Kleintop LD, Mandik-Nayak L, Metz R, Ostrand-Rosenberg S, Prendergast GC, Muller AJ. IDO is a nodal pathogenic driver of lung cancer and metastasis development. **Cancer Discovery**, 2(8):722-35, Aug, 2012.

Songur N, Kuru B, Kalkan F, Ozdilekcan C, Cakmak H, Hizel N. Serum interleukin-6 levels correlate with malnutrition and survival in patients with advanced non-small cell lung cancer. **Tumori**, 90(2):196-200, Mar, 2004.

Speeckaert R, Vermaelen K, van Geel N, Autier P, Lamberg J, Haspeslagh M, van Gele M, Thielemans K, Neyns B, Roche N, Verbeke N, Deron P, Speeckaert M, Brochez L. Indoleamine 2,3-dioxygenase, a new prognostic marker in sentinella lymph nodes of melanoma patients. **European Journal of Cancer**, 48(13):2004-11, 2012.

Stevanovic S, Draper LM, Langan MM, Campbell TE, Kwong ML, Wunderlich JR, Dudley ME, Yang JC, Sherry RM, Kammula US, Restifo NP, Rosenberg AS, Hinrichs CS. Complete regression of metastatic cervical cancer after treatment with human papillomavirus-targeted tumor-infiltrating T cells. **Journal of Clinical Oncology**, 33(14):1543-50, May, 2015.

Stone SC, Rossetti RA, Lima AM, Lepique AP. HPV associated tumor cells control tumor microenvironment and leukocytosis in experimental models. **Immunity, Inflammation and Disease**, 2(2):63-75, Aug, 2014.

Szakacs G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Genthe C, Gottesman MM. Targeting multidrug resistance in cancer. **Nat Rev Drug Discov**, 5:219-34, Mar, 2006.

Takamatsu M, Hirata A, Ohtaki H, Hoshi M, Ando T, Ito H, Hatano Y, Tomita H, Kuno T, Saito K, Seishima M, Hara A. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 expression alters immune response in colon tumor microenvironment in mice. **Cancer Science**, 106(8):1008-15, Aug, 2015.

Tang SC, Montero A, Munn D, Link C, Vahanian N, Kennedy E, Soliman H. A phase 2 randomized trial of the IDO pathway inhibitor indoximod in combination with taxane based chemotherapy for metastatic breast cancer: Preliminary data. **Cancer Research**, 76(4 Suppl. abstr P2-11-09), Feb, 2016.

Tanizak Y, Kobayashi A, Toujima S, Shiro M, Mizoguchi M, Mabuchi Y, Yagi S, Minami S, Takikawa O, Ino K. Indoleamine 2,3-dioxygenase promotes peritoneal metastasis of ovarian cancer by inducing an immunosuppressive environment. **Cancer Science**, 105(8):966-73, Jun, 2014.

Tartour E, Gey A, Sastre-Garau X, Pannetier C, Mosseri V, Kourilsky P, Fridman WH. Analysis of interleukin 6 gene expression in cervical neoplasia using a quantitative polymerase chain reaction assay: evidence for enhanced interleukin 6 gene expression in invasive carcinoma. **Cancer Research**, 54(23):6243-8, Dec, 1994.

Tatsumi K, Higuchi T, Fujiwara H, Nakayama T, Egawa H, Itoh K, Fujii S, Fujita J. Induction of tryptophan 2,3-dioxygenase in the mouse endometrium during implantation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 274(1):166-70, Jul, 2000.

Taylor MW, Feng GS. Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. **FASEB Journal**, 5(11):2516-22, Aug, 1991.

Theate I, van Baren N, Pilotte L, Moulin P, Larrieu P, Renaud J-C, Hervé C, Gutierrez-Roelens I, Marbaix E, Sempoux C, Van den Eynde BJ. Extensive profiling of the expression of the indoleamine 2,3-dioxygenase 1 protein in normal and tumoral human tissues. **Cancer Immunology Research**, 3(2):161–72, Feb, 2015.

Tota JE, Chevarie-Davis M, Richardson LA, Devries M, Franco EL. Epidemiology and burden of HPV infection and related diseases: implications for prevention strategies. **Preventive Medicine**, 53 Suppl 1:S12-S21, Oct, 2011.

Trimble CL, Morrow MP, Kraynyak KA, Shen X, Dallas M, Yan J, Edwards L, Parker RL, Denny L, Giffear M, Brown AS, Marcozzi-Pierce K, Shah D, Slager AM, Sylvester AJ, Khan A, Broderick KE, Juba RJ, Herring TA, Boyer J, Lee J, Sardesai NY, Weiner DB, Bagarazzi ML. Safety, efficacy, and immunogenicity of VGX-3100, a therapeutic synthetic DNA vaccine targeting human papillomavirus 16 and 18 E6 and E7 proteins for cervical intraepithelial neoplasia 2/3: A randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2b trial. **The Lancet**, 10008(386):2078-88, Sep, 2015.

Tsuda N, Watari H, Ushijima K. Chemotherapy and molecular targeting therapy for recurrent cervical cancer. **Chinese Journal of Cancer Research**, 28:241–53, Apr, 2016.

Uyttenhove C, Pilotte L, Theate I, Stroobant V, Colau D, Parmentier N, Boon T, Van den Eynde BJ. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. **Nature Medicine**, 9(10):1269-74, Oct, 2003.

van Baren N, Van den Eynde BJ. Tryptophan-degrading enzymes in tumoral immune resistance. **Frontiers in Immunology**, 6:34, Feb, 2015.

Van Doorslaer K, Chen Z, Bernard HU, Chan PKS, DeSalle R, Dillner J, Forslund O, Haga T, McBride AA, Villa LL, Burk RD, Ictv Report Consortium. ICTV Virus Taxonomy Profile: Papillomaviridae. **Journal of General Virology**, 99(8):989-90, Aug, 2018.

Venancio PA, Consolaro MEL, Derchain SF, Boccardo E, Villa LL, Maria-Engler SS, Campa A, Discacciati MG. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophan 2,3-dioxygenase expression in HPV infection, SILs, and cervical cancer. **Cancer Cytopathology**, 127(9):586-97, Sep, 2019.

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

Villa LL. Prophylactic HPV vaccines: reducing burden of HPV-related diseases. **Vaccine**, 24(1):23-28, Mar, 2006.

Vink MA, Bogaards JÁ, Van Kemenade FJ, De Melker HE, Meijer CJLM, Berkhof J. Clinical progression of high-grade cervical intraepithelial neoplasia:

Estimating the time to preclinical cervical cancer from doubly censored national registry data. **American Journal of Epidemiology**, 178(7):1161–1169, Jul, 2013.

Waldner MJ, Foersch S, Neurath MF. Interleukin-6 – a key regulator of colorectal cancer development. **International Journal of Biological Sciences**, 8(9):1248-53, 2012.

Wakeham K, Kavanagh K. The burden of HPV-associated anogenital cancers. **Current Oncology Reports**, 16(9):402, Sep, 2014.

Wei LH, Kuo ML, Chen CA, Cheng WF, Cheng SP, Hsieh FJ, Hsieh CY. Interleukin-6 in cervical cancer: the relationship with vascular endothelial growth factor. **Gynecologic Oncology**, 82(1):49-56, Jul, 2001.

Wei LH, Kuo ML, Chen CA, Chou CH, Lai KB, Lee CN, Hsieh CY. Interleukin-6 promotes cervical tumor growth by VEGF-dependent angiogenesis via a STAT3 pathway. **Oncogene**, 22(10):1517-27, Mar, 2003.

Whiteside TL. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. **Oncogene**, 27(1):5904-5912, Oct, 2008.

William T, Creasman MD. Preinvasive Disease of the Cervix. **Clinical Gynecologic Oncology**, 34(1):1, Jan, 2012

Wirthgen E, Hoeflich A. Endotoxin-Induced Tryptophan Degradation along the Kynurenine Pathway: The Role of Indoleamine 2,3-Dioxygenase and Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Immunosuppressive Effects in Endotoxin Tolerance and Cancer and Its Implications for Immunoparalysis. **Journal of Amino Acids**, 2015:973548, Dec, 2015.

Witkiewicz AK, Costantino CL, Metz R, Muller AJ, Prendergast GC, Yeo CJ, Brody JR. Genotyping and expression analysis of IDO2 in human pancreatic cancer: a novel, active target. **Journal of the American College of Surgeons**, 208(5):781-9, May, 2009.

Woodman CB, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. **Nature Reviews Cancer**, 7(1):11-22, Jan, 2007.

World Health Organization. WHO guidelines for treatment of cervical intraepithelial neoplasia 2-3 and adenocarcinoma in situ. **WHO Guidelines**, 2014.

World Health Organization. Guide to introducing HPV vaccine into national immunization programmes. **WHO Guidelines**, 104, Dec, 2016.

World Health Organization. HPV vaccine introduction clearinghouse. In: Immunization, vaccines and biologicals [Internet]. Geneva: **World Health Organization**, 2018.

Wu CT, Chen MF, Chen WC, Hsieh CC. The role of IL-6 in the radiation response of prostate cancer. **Radiation Oncology**, 8:159, Jun, 2013.

Xue P, Fu J, Zhou Y. The Aryl Hydrocarbon Receptor and Tumor Immunity. **Frontiers in Immunology**, 9:286, Feb, 2018.

Yamada T, Horimoto H, Kameyama T, Hayakawa S, Yamato H, Dazai M, Takada A, Kida H, Bott D, Zhou AC, Hutin D, Watts TH, Asaka M, Matthews J, Takaoka A. Constitutive aryl hydrocarbon receptor signaling constrains type I interferon-mediated antiviral innate defense. **Nature Immunology**, 17(6):687-94, Jun, 2016.

Yeoh GC, Ernst M, Rose-John S, Akhurst B, Payne C, Long S, Alexandre W, Croker B, Grail D, Matthews. **Hepatology**, 45(2):486-94, Feb, 2007.

Yu J, Sun J, Wang SE, Li H, Cao S, Cong Y, Liu J, Ren X. Upregulated expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in primary breast cancer correlates with increase of infiltrated regulatory T cells in situ and lymph node metastasis. **Journal of Immunology Research**, 2011:469135, 2011.

Zakrzewska I, Poznanski J. [Changes of sérum il-6 and CRP after chemotherapy in patients with ovarian carcinoma. **Polski merkuriusz lekarski**, 11(63):210-3, Sep, 2001.

Zhai L, Tumban E. Gardasil-9: A global survey of projected efficacy. **Antiviral Research**, 130:101-9, Jun, 2016.

Zhao X, Subramanian S. Oncogenic pathways that affect antitumor immune response and immune checkpoint blockade therapy. **Pharmacology & Therapeutics**, 181:76-84, Jan, 2018.

Zhou C, Tuong ZK, Frazer IH. Papillomavirus Immune Evasion Strategies Target the Infected Cell and the Local Immune System. **Frontiers in Oncology**, 9:682, Aug, 2019.

Zou M, Zhang X, Xu C. IL-6-induced metastasis modulators p-STAT3, MMP-2 and MMP-9 are targets of 3,3'-diindolylmethane in ovarian cancer cells. **Cellular Oncology**, 39(1):47-57, Feb, 2016.

zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. **Virology**, 384(2):260-5, Feb, 2009.

zur Hausen H, De Villiers EM, Gissmann L. Papillomavirus infections and human genital cancer. **Gynecologic Oncology**, 12(2-1):124-8, Oct, 1981.