

KARINE BITENCOURT RODRIGUES

Imunoterapia ativa baseada na utilização de células dendríticas ativadas para o controle de tumores associados ao HPV-16 em modelo murino

Dissertação apresentada ao Programa de PósGraduação em Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira

Co-orientadora: Dra. Bruna F. M. M. Porchia Ribeiro

Versão Corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca no ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2019

RESUMO

RODRIGUES, K. B. **Imunoterapia ativa baseada na utilização de células dendríticas ativadas para o controle de tumores associados ao HPV-16 em modelo murino.** 2019. 83f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2019.

O câncer cervical ou câncer do colo do útero é causado pela infecção persistente pelo papilomavírus humano (HPV), principalmente pelos genótipos de alto risco, como o HPV-16 e o HPV-18. Apesar dos tratamentos disponíveis, a doença ainda é considerada um problema de saúde pública e novas abordagens para o tratamento de lesões pré-malignas e tumores cervicais se fazem necessárias. Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de uma estratégia imunoterapêutica baseada na administração de células dendríticas (DCs), diferenciadas *in vitro* a partir de células precursoras da medula óssea (BM-DCs), para o controle de tumores associados ao HPV-16. BM-DCs derivadas de células de camundongos *naive*, ou com tumor, foram padronizadas quanto ao processo de diferenciação e ativação *in vitro* com a proteína gDE7 e outros componentes imunomodulatórios, como citocinas e agonistas da resposta imune inata. A proteína gDE7 é o resultado da fusão genética da glicoproteína D (gD) do Herpes simplex vírus-1 (HSV-1) e da oncoproteína E7 do HPV-16 e possibilita o direcionamento de antígenos e ativação de DCs. Após a confirmação do efeito responsivo das BM-DCs sensibilizadas com a gDE7, animais de linhagem C57BL/6 desafiados com células da linhagem TC-1 foram tratados com 3 doses de BM-DCs (1×10^6 /animal) sensibilizadas com a gDE7 e poly (I:C) por via intravenosa (i.v.) ou subcutânea (s.c). Foi observado controle parcial do volume tumoral nos grupos imunizados com as células ativadas com a gDE7 na presença ou ausência do poly (I:C). A administração pela via i.v. resultou em maior proteção antitumoral com 80% de animais livres de tumor e aumento de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos ativados no sangue periférico e no baço dos animais tratados. Os animais tratados apresentaram aumento na produção de IFN- γ por células T de memória efetora. Além disto, a imunoterapia baseada nessa estratégia favoreceu o influxo de células NKs no baço e resultou em proteção em modelo de recidivas, simuladas por meio de repetições de implantes de células tumorais.. Esses dados embasam o desenvolvimento de uma nova abordagem imunoterapêutica voltada para o tratamento de tumores induzidos pelo HPV em condições clínicas.

Palavras-chave: Câncer. Imunoterapia. Células Dendríticas.

ABSTRACT

RODRIGUES, K.B. **Active immunotherapy based on the use of activated dendritic cells to control HPV-16-associated tumors in a murine model.** 2019. 83p. Masters thesis (Biotechnology). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Cervical cancer is caused by persistent human papillomavirus (HPV) infection, mainly by highrisk genotypes, such as HPV-16 and HPV-18. Despite the availability of treatments, the disease is still considered a public health problem and new therapeutic approaches aimed at treating premalignant lesions and cervical tumors are needed. In this context, the present work aims to develop an immunotherapeutic strategy based on the administration of dendritic cells (DCs) derived from *in vitro* differentiated bone marrow precursor cells (BM-DCs) for the control of HPV16 associated tumors. BM-DCs derived from naïve mice, or tumor bearing mice, were standardized with regard to the differentiation and activation *in vitro* protocol using the gDE7 protein and other immunomodulatory components, such as cytokines and innate immune response agonists. The gDE7 protein is the result of the genetic fusion between the Herpes simplex virus-1 (HSV-1) glycoprotein D (gD) with the HPV-16 E7 oncoprotein and enables antigen targeting and activation of DCs. Following confirmation of the responsive effects of gDE7-sensitized BM-DCs, TC-1 C57BL/ 6 mice were challenged with tumor cells of the TC-1 strain and subsequently treated with 3 doses of gDE7-sensitized BM-DCs (1×10^6 / animal) in combination with poly (I:C) by the intravenous (i.v.) or subcutaneous (s.c.) route. Partial tumor growth control was observed in mouse groups immunized with gDE7-activated cells both in the presence or absence of poly (I:C). Administration of cells via the i.v. route resulted in enhanced anti-tumor effects with 80% tumorfree animals and increased numbers of activated CD8⁺ E7-specific T lymphocytes in peripheral blood and spleen. The treated animals showed enhanced IFN- γ production by effector memory T cells. In addition, immunotherapy based on this strategy promoted the influx of NKs cells into the spleen and conferred protection in a tumor relapse model generated following repeated tumor cell implants. These data support the development of a new immunotherapeutic approach to treat different HPV-induced tumors under clinical conditions.

Keywords: Cancer. Immunotherapy. Dendritic cells.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

Desde o início do século XX, o câncer se destaca como um dos maiores problemas de saúde pública devido à crescente incidência de casos e mortalidades no mundo (1). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), em uma pesquisa realizada pela Agência Internacional para Pesquisa do Câncer (IARC), cerca de 9,6 milhões de mortes relacionadas ao câncer ocorreram em 2018, representando um aumento no número de casos em comparação aos anos anteriores (2). Estudos mostram que, em nível global, uma a cada seis mortes está relacionada a esta doença, e aproximadamente 70% das mortes por câncer ocorrem em países de baixa e média renda, devido ao diagnóstico tardio e à acessibilidade aos tratamentos (2,3).

Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), o Brasil deve registrar aproximadamente 600 mil novos casos de câncer por ano entre 2018 e 2019 (4). A incidência dos tipos de câncer no país varia de acordo com a região e apresentam cerca de 300 mil novos casos em homens e 282 mil em mulheres. Dentre os tipos de câncer, o câncer cervical se destaca com cerca de 16.370 novos casos para o ano de 2019, o mais incidente entre mulheres na região Norte e o segundo nas regiões Nordeste e Centro-Oeste (5). Nas regiões Sul e Sudeste ocupa a quarta posição. Essa variação na incidência se deve à disponibilidade de programas de prevenção e controle mais efetivos em diferentes regiões do país (4,5).

O câncer cervical é causado pela infecção persistente por genótipos oncogênicos do papilomavirus humano (HPV), principalmente o HPV-16 e o HPV-18, subtipos considerados de alto risco (6,7). A primeira relação entre o HPV e o câncer cervical foi descrita em 1970 por Harald Zur Hausen (8). Sabe-se que as infecções pelo vírus podem desencadear desde a formação de verrugas até o desenvolvimento de câncer (9). Apesar do câncer cervical ser claramente relacionada ao vírus, há evidências que relacionam a infecção pelo vírus a outras neoplasias (10,11).

No Brasil, em 2018 a prevalência do HPV na população feminina foi de 54,6% enquanto que na masculina foi de 51,8% (12). As infecções persistentes pelo vírus podem danificar o epitélio cervical induzindo NICs (*Cervical Intraepithelial Neoplasia*) ou lesões intraepiteliais escamosas (SIL), que podem não ser detectadas pelo exame de Papanicolau oferecido pelo Ministério da Saúde (3,4). A persistência dessas lesões é associado à persistência da infecção e da

integração do vírus ao DNA do hospedeiro (9). Desde 2010 o HPV é considerado o agente etiológico do câncer cervical, presente em 99% dos casos clínicos, com crescentes evidências que relacionam o vírus a cânceres como de ânus, pênis e vagina (6,10).

1.2 Papillomavírus Humano (HPV) e o desenvolvimento de câncer

O HPV é um vírus de DNA circular dupla fita, desprovido de envelope, com tropismo para regiões epiteliais e de mucosa, transmitidos sexualmente por contato direto de pele ou mucosas infectadas (9,13). Existem mais de 200 genótipos do HPV descritos, dentre eles 40 possuem afinidade pelo epitélio anogenital e cerca de 12 são considerados carcinogênicos (14). Os tipos 16 e 18, considerados de alto risco, se destacam como os principais agentes etiológicos para o câncer cervical e são responsáveis por mais de 80% dos tumores induzidos por HPV (2,15).

O genoma do vírus é composto por genes de expressão na fase tardia (L1 e L2) e inicial (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) (16). A L1 é a maior proteína do capsídeo viral e principal proteína estrutural do vírus, possui a região mais conservada do genoma, e por isto, é utilizada como antígeno de detecção do vírus, e na obtenção de vírus-like particles (VLPs) para a produção de vacinas profiláticas contra a infecção por alguns genótipos do vírus (16,17). As proteínas L1 e L2 facilitam a entrada na camada basal dos queratinócitos e a proteína L2 transporta o DNA viral ao núcleo celular, auxiliando a integração do genoma do vírus na célula hospedeira (9,16).

Após a integração do DNA viral, há supressão da regulação das proteínas E2, E4 e E5 no interior da célula (9). Essas proteínas desempenham funções no controle da transcrição gênica viral, modificação da matriz intracelular, liberação e maturação de partículas virais, e na atividade de transformação por meio da estimulação mitogênica (16,18). A inativação de E2, conseqüentemente reprime a transcrição de E6 e E7, que interagem com as proteínas p53 e pRB, respectivamente (9,19). Essas oncoproteínas representam o potencial oncogênico do HPV devido ao importante papel na alteração do ciclo celular, levando à imortalização das células hospedeiras (20). Estudos mostram que a progressão tumoral inicia depois que o genoma viral se integra ao genoma celular, ocasião em que a célula infectada passa a expressar de forma constitutiva as oncoproteínas E6 e E7 do vírus (9,16,20). O papel destas oncoproteínas na progressão tumoral é

relevante para as pesquisas que buscam o desenvolvimento de vacinas terapêuticas contra tumores associados ao HPV, pois são antígenos que representam alvos vacinais expressos somente em células infectadas, sejam nas lesões pré-malignas como nas células tumorais.

1.3 Vacinas profiláticas, medidas de prevenção e tratamentos convencionais

As vacinas profiláticas contra o HPV têm como alvo as proteínas L1 e L2 presentes no capsídeo do vírus (21,22). As duas proteínas possuem epítomos reconhecidos por anticorpos neutralizantes capazes de bloquear a entrada do vírus na célula do hospedeiro, reduzindo a incidência de câncer a longo prazo (9,23). Existem três vacinas licenciadas e comercialmente disponíveis: a Cervarix ® (Glaxo Smith&Kline), vacina bivalente que protege contra a infecção por HPV-16 e HPV-18, a Gardasil ® (Merck Sharp&Dohme), vacina quadrivalente que cobre os genótipos 6, 11, 16 e 18 do HPV e a Gardasil 9 ® (Merck Sharp&Dohme), versão mais recente que cobre 9 genótipos virais de HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58 (23–25). Essas vacinas foram desenvolvidas a partir de técnicas de DNA recombinante e utilizam a proteína L1 do capsídeo viral produzida em sistemas de expressão eucarioto e que formam *virus-like particles* (VLP), partículas não infectantes, semelhantes ao vírus (22,23). Estudos demonstram que essas vacinas são altamente efetivas na prevenção de lesões precursoras de câncer cervical e apresentam alta imunogenicidade em ensaios clínicos, impedindo a infecção pelo vírus (25,26). Contudo, as vacinas profiláticas apresentam maior benefício para indivíduos que ainda não foram infectados pelo vírus (27). Devido à baixa cobertura vacinal e o elevado número de pessoas infectadas, a incidência de câncer cervical continua a ser um problema de saúde por muitos anos (4).

No Brasil, o controle do câncer cervical é prioridade em saúde pública e integra o plano de ações estratégicas para o enfrentamento das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) (5). A prevenção e diminuição da incidência deste e outros tipos de câncer induzidos pelo HPV se baseia no fornecimento da vacina Gardasil pelo Programa Nacional de Imunização, recomendado para meninas com idade entre 9 e 13 anos e meninos entre 11 e 14 anos (4,28). Outra estratégia do Ministério da Saúde é a recomendação do exame citopatológico em mulheres assintomáticas com idades entre 25 e 64 anos (4,29). Por meio de exames preventivos é possível detectar e

monitorar lesões pré-malignas ou tumores em estágios iniciais, o que leva ao diagnóstico precoce e a tratamentos mais efetivos da doença (4,30).

Dentre as estratégias convencionais para o combate de tumores induzidos por HPV estão a cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou a combinação dessas (2,4,31). Apesar de serem tratamentos resolutivos proporcionando redução ou destruição do tumor essas alternativas são invasivas e provocam efeitos colaterais que reduzem a qualidade de vida dos pacientes (32–34). Além disso, não agem especificamente nas células tumorais, causando morte ou remoção de tecidos saudáveis (35). Dessa forma, a busca por tratamentos que sejam menos agressivos e que atinjam de forma mais específica as células tumorais tem aumentado nos últimos anos.

1.4 Estratégias Terapêuticas

As vacinas terapêuticas são projetadas para inibir ou controlar o crescimento de tumores induzidos pelo HPV por meio da ativação de respostas imunológicas (36). Tumores induzidos por HPV expressam constitutivamente as oncoproteínas E6 e E7, antígenos alvo codificados pelo vírus (11,37). Essa característica permite a elaboração de vacinas terapêuticas contra esses tumores, baseadas na indução de respostas imunológica contra essas oncoproteínas (38). A expressão desses antígenos é fundamental para a manutenção do estado neoplásico, por isso há baixas chances de escape imunológico por perda de antígenos (39). Além disso, são proteínas não-próprias ao hospedeiro, logo, os riscos de indução de auto-imunidade são baixos (16,38). Desta forma, estudos com as proteínas E6 e E7 são comumente empregados no desenvolvimento de vacinas para o controle de tumores induzidos por HPV (20,40,41).

As oncoproteínas E6 e E7 modulam o sistema imunológico de forma que as células tumorais tornem-se pouco imunogênicas (39). Esse fenômeno é um dos principais desafios para o desenvolvimento de vacinas terapêuticas eficazes (36,38). As respostas imunológicas envolvidas na eliminação de células tumorais são baseadas em células T CD8⁺ com colaboração de células T CD4⁺ (42,43). Nesse contexto, diversas plataformas de vacinas têm sido investigadas, dentre elas encontram-se vacinas baseadas em proteínas, DNA, células ou abordagens combinadas (44,45).

As vacinas de DNA são importantes na indução de respostas imuno-específicas e não se integram e replicam no indivíduo imunizado (36,46). Essas vacinas são compostas por plasmídeos de origem bacteriana aptos a codificar antígenos sob o controle de fortes promotores ativos apenas em células de mamífero (36). Células transfectadas por vetores plasmidiais são capazes de expressar as proteínas codificadas e apresentá-las no contexto de MHC de classe I ou II, o que promove, conseqüentemente, a ativação de células apresentadoras de antígenos (APCs) e linfócitos T capazes de gerar respostas citotóxicas (46). Nesse sentido, têm sido estudadas diversas estratégias de vacinas de DNA contra tumores associados ao HPV baseadas em plasmídeos que codificam os genes E6 e E7 do HPV.

Estudos realizados por Alvarez et al (2016) avaliaram uma vacina de DNA que codifica a E7 mutada e fusionada à proteína HSP70 de *Mycobacterium tuberculosis* (pNGVL4a-sig / E7 (detox) / HSP70) com reforço de uma outra vacina anti-tumoral (TA-HPV/HPVE6/E7) (47). Essa combinação induziu respostas imunológicas E7-específicas de células T CD8⁺. Em outro estudo clínico, a vacina VGX-3100, plasmídeo sintético que codifica as proteínas E6 e E7 do HPV-16 e 18, testada em pacientes com NIC2/3, resultou na regressão tumoral em 48% dos pacientes tratados (48,49).

Em paralelo a estas estratégias, a produção de proteínas recombinantes por meio de sistemas de expressão heteróloga, bactérias, leveduras, células de mamíferos e insetos é também usada como fonte para antígenos incorporados em formulações vacinais (36,44). Trata-se da abordagem de maior sucesso entre as vacinas de subunidades e que desperta interesse tanto pela segurança do uso como pela possibilidade de retorno financeiro, como no caso das vacinas profiláticas contra infecções por HPV (23,50). Por apresentar todos os epítomos potenciais para o processamento do antígeno e ativação do sistema imunológico, as vacinas baseadas em proteínas recombinantes apresentam vantagens sobre vacinas baseadas em peptídeos (36,51). Contudo, a ativação de respostas citotóxicas é, em geral, deficiente, seja com o uso de proteínas purificadas ou peptídeos (50). Como alternativa para melhorar a imunogenicidade, as proteínas alvo são frequentemente fusionadas a outras proteínas ou combinadas a adjuvantes que proporcionam aumento da imunogenicidade humoral e celular das formulações (36,52).

Neste contexto, estratégias baseadas na proteína E7 fusionada à hsp65 de *Mycobacterium bovis* BCG foram utilizadas como plataforma no controle de tumores associados à infecção pelo

HPV-16. Como resultados, houve proteção em camundongos contra tumores induzidos após transplante com células TC-1 que expressam as proteínas E6 e E7 do HPV-16 (53,54). Essa estratégia foi testada em modelo clínico nas fases I e II e demonstrou tolerância e capacidade de regressão de lesões celulares associadas ao HPV-16 (55,56). No entanto, nem todos os pacientes avaliados demonstraram imunogenicidade à vacina nem apresentaram melhorias clínicas, sendo o efeito parcial observado em doença pré-invasiva (55,57).

Neste contexto, foram desenvolvidas duas formas de vacinas terapêuticas no Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas (LDV): uma baseada em vacina de DNA (58,59) e outra em vacina de proteína recombinante purificada (60). As duas vacinas baseiam-se na expressão de uma proteína híbrida resultado da fusão genética da glicoproteína D (gD) do Herpes simplex vírus – 1 (HSV-1) com a oncoproteína E7 do HPV-16, denominada gDE7 (58,60). Essa fusão conferiu aumento da imunogenicidade do antígeno E7 por meio de ativação de sinais co-estimulatórios e redução de efeitos co-inibitórios em linfócitos T e B (61,62). A estratégia que utiliza a proteína recombinante gDE7 foi coadministrada com o adjuvante poly (I; C) e foi verificado que esta abordagem promoveu proteção antitumoral terapêutica completa em camundongos transplantados com a linhagem tumoral TC-1 e a ativação de linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN- γ (61). Além disso, a vacina de DNA quando administrada por eletroporação, potencializou os efeitos antitumorais, levando à ativação de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos, com característica polifuncional, e controle da expansão de células imunossupressoras (63). Em outro trabalho, a combinação da vacina pgDE7h e pIL-10R permitiu o controle de tumores em estágios de crescimento mais avançados (64).

Em continuidade, a proteção antitumoral terapêutica mediada por duas doses da vacina gDE7 associada ao adjuvante Poly(I:C), conferiu proteção antitumoral terapêutica completa e duradoura em animais desafiados com células tumorais (TC-1) (61,62). Esta estratégia induziu um perfil de resposta T CD8⁺ polifuncional E7-específico com atividade citotóxica e com fenótipo de memória efetora. Além disso, controlou a expansão de células T regulatórias e células mieloides supressoras induzidas pelo microambiente tumoral. Em especial, foi demonstrado que os efeitos mediados pela gD na vacina, envolvem um mecanismo de direcionamento para uma população específica de células dendríticas (DCs), especializadas na apresentação cruzada de antígenos para linfócitos T CD8⁺ *in vitro* (61). 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. No entanto, é necessário gerarmos mais evidências que demonstrem a eficácia desta estratégia terapêutica, e que reforcem e embasem estudos para o direcionamento do tratamento para a fase clínica.

1.4.1 Imunoterapia baseada em células dendríticas

Nos últimos anos, uma nova estratégia voltada para o estímulo do sistema imunológico no combate ao câncer tem se destacado, a imunoterapia (modalidade de vacina terapêutica) (65). As células tumorais expressam antígenos em sua superfície, mas o reconhecimento pelo sistema imunológico nem sempre se mostra capaz de controlar o crescimento tumoral (66,67). A imunoterapia ajuda o sistema imunológico a reconhecer antígenos expressos pelas células tumorais (38,66). Existem dois tipos de imunoterapia: a passiva que envolve a utilização de anticorpos monoclonais que reconhecem moléculas de *checkpoint* em células do sistema imune, ou de células T efectoras específicas; e a ativa que utiliza antígenos que estimulam o sistema imune de tal forma que as células tumorais passam a ser reconhecidas e eliminadas seletivamente (68,69). Esta segunda abordagem também é frequentemente denominada de vacinas anti-câncer terapêuticas (51,69).

A eficácia de vacinas terapêuticas está relacionada ao potencial de ativação de células apresentadoras de antígeno (APCs), como por exemplo, as DCs (70). Descritas pela primeira vez em 1968, por *Paul Langerhans*, as DCs têm sido utilizadas como ferramentas para ampliar a resposta imunológica específica antitumoral (71). As DCs são produzidas pela medula óssea, a partir de células hematopoiéticas e atuam na interface da resposta imune inata e adaptativa (70,72). São APCs profissionais que interagem com linfócitos T e desencadeiam respostas que vão desde a tolerância até a eliminação do antígeno (73). São fundamentais na iniciação, programação e regulação da resposta imunológica (74). Quando comparadas a outras APCs, apresentam características únicas na capacidade de regulação da imunidade e tolerância (75). São células altamente capazes de captar e diferenciar antígenos a partir de receptores do tipo *Toll-like receptors* (TLRs), processar e apresentar epitopos no contexto de moléculas de MHC de classe I e/ou de classe II (72,76). No estado imaturo, as DCs atuam como sentinelas, especializadas na captura do antígeno (77). Esse reconhecimento, desencadeia o aumento da expressão de moléculas coestimulatórias, como CD80, CD86 e CD40, que resultam em modificações

morfológicas nas DCs, e conduzem a perda da capacidade fagocítica, essenciais para a aquisição de um fenótipo imunoestimulador (72,78). Nesta etapa, as DCs são aptas a induzir respostas imune através da apresentação antígenos aos linfócitos T e B *naive* (38,76). Quando ativadas, as DCs apresentam antígenos de natureza endógena para linfócitos T CD8⁺ via MHC-I enquanto que antígenos extracelulares são apresentados preferencialmente para linfócitos T CD4⁺ via MHC-II (76). Outra característica das DCs é a habilidade de efetuar apresentação cruzada de antígenos extracelulares por meio de moléculas de MHC-I aos linfócitos T CD8⁺ (79).

No microambiente tumoral, os efeitos imunossupressores mediados pelas células tumorais impedem que DCs realizem seu papel na resposta imune (75). Alguns destes efeitos correspondem à expansão de populações supressoras, como as de linfócitos T reguladores e de células mielóides supressoras (MDSCs) e a produção de citocinas imunossupressoras (IL-10 e TGF-β) (72,75). Como consequência, a atividade das DCs fica inibida e as células tumorais se tornam resistentes a respostas imunológicas, eventos que resultam no escape do tumor à vigilância imunológica (38,39). Nesse contexto, estratégias imunoterapêuticas baseadas em DCs ativadas *in vitro* são promissoras, pois tornam possível a restauração das funções do sistema imune e a indução de respostas antitumorais (38). Contudo, alguns fatores cruciais são necessários para o desenvolvimento de imunoterapias baseadas em DCs: 1- exposição ao antígeno; 2- expressão de moléculas coestimulatórias como CD80, CD86 e CD40, que permitam a interação com a molécula CD28 do linfócito T; 3- produção de citocinas e quimiocinas que promovam diferenciação e proliferação de linfócitos T (77,80). De modo geral, o resultado esperado da imunoterapia baseada em DCs consiste na diminuição do estado de tolerância às células tumorais e o desencadeamento de respostas mediadas por linfócitos T efetores, resultando em um efeito antitumoral eficiente e memória imunológica (38,81).

As DCs caracterizam-se por expressarem moléculas MHC de classe II, CD11c e ausência de expressão do CD14 (78). Essas células interagem com células *Natural Killer* (NKs), da imunidade inata, e promovem a ativação de NKs produtoras de IFN-γ com atividade tumoricida (82). Em relação à interação com a imunidade adquirida, a interação de DCs com linfócitos pode assumir diferentes padrões na produção e secreção de citocinas (77,79). Esses padrões são representados, por exemplo, pelos perfis Th1 e Th2 (83). No microambiente tumoral, a presença da citocina IL-

12 e de IFN- γ induzem o padrão Th1 de resposta, enquanto a IL-4 é a principal citocina indutora do perfil Th2 (72). A IL-10 quando produzida por DCs, favorece o surgimento de linfócitos T regulatórios caracterizados pela expressão de FoxP3 e produção de citocinas supressoras, como TGF- β (75). Além disso, DCs podem ter influencia nas respostas mediadas por linfócitos T citotóxicos (CTLs) (81). Ao expressar MHC de classe I, as DCs possuem a habilidade de apresentar tanto antígenos endógenos quanto exógenos, fenômeno conhecido como apresentação cruzada (79,80). Esta habilidade permite que DCs participem também da ativação de linfócitos T CD8⁺ com fenótipo citotóxico (CTLs), que conseqüentemente destroem células tumorais que forem reconhecidas (79,84).

Estudos prévios demonstraram a eficiência de DCs para o tratamento de diversos tipos de tumores (84,85). Segundo Verma et al (2016), o uso de BM-DCs ativadas com um lisado de células tumorais (TC-1) induziram respostas antitumorais terapêuticas capazes de promover regressão de tumores em modelos de câncer cervical e de melanoma em camundongos (86). Outros trabalhos baseados no uso de DCs híbridas tem sido utilizada como imunoterapia contra o câncer. Pinho et al (2016), desenvolveram células híbridas a partir da fusão de DCs derivadas de monócitos (MoDCs) com células tumorais, e avaliaram a capacidade destas células em induzir uma resposta imunológica específica. As células híbridas foram capazes de gerar maior expressão de moléculas coestimulatórias, e por conseqüência induzir maior proliferação de células T específicas ao antígeno e produtoras de IFN- γ (87). Outros trabalhos baseados no uso de DCs comprovam a eficiência das DCs ativadas como imunoterapia ativa contra tumores em modelos de melanoma, pâncreas, câncer de pulmão e próstata (88–90). Estudos clínicos também já demonstraram que a imunoterapia baseada em DCs diferenciadas de monócitos (Mo-DCs) é uma alternativa utilizada para estimular o sistema imune a obter respostas antitumorais eficazes contra câncer de cervical e melanoma (10,91,92). Em conclusão, diversos estudos demonstraram que a vacinação baseada em DCs ativadas *in vitro* induz respostas imunológicas capazes de controlar diversos tipos tumores em modelos murinos e em pacientes com câncer.

4 CONCLUSÕES

O trabalho feito levou à conclusão de etapas importantes do projeto inicialmente proposto, a saber:

- Foi possível padronizar os protocolos de diferenciação e ativação *in vitro* das BM-DCs;
- O rendimento obtido de BM-DCs foi satisfatório tornando possível o desenvolvimento de uma imunoterapia baseada nessas células;
- A proteína gDE7 foi capaz de induzir um fenótipo ativado nas BM-DCs, tanto em células provenientes de camundongos *naive* como em células derivadas de animais com tumor. Fenômeno observado por meio das modificações morfológicas e expressão de moléculas coestimulatórias de superfície, como também pela produção de TNF- α ;
- Células provenientes de camundongos *naive* que receberam a gDE7, ou gDE7 com pIC como estímulo, não apresentaram aumento de expressão da molécula PD-L1, o que favorece a montagem de uma resposta imunológica citotóxica específica;
- BM-DCs sensibilizadas *in vitro* com a gDE7, ou gDE7 com pIC, foram capazes de realizar apresentação de antígenos para linfócitos T CD8⁺, promovendo ativação e proliferação destas células;
- Animais imunizados pela via i.v. com doses de BM-DCs sensibilizadas *in vitro* com a gDE7, ou gDE7 com pIC, apresentaram melhor controle do crescimento tumoral e aumento de sobrevivência, quando comparados aos animais imunizados por via s.c.;
- As BM-DCs estimuladas com a gDE7 associada ao pIC conferiram aos animais tratados uma proteção antitumoral completa de 80% e 100% de sobrevivência durante o período de observação dos animais transplantados com células TC-1;
- A utilização da via i.v. para a entrega da vacina baseada em BM-DCs induziu estado efetor de linfócitos T com aumento da expressão da citocina IFN- γ por linfócitos T CD8⁺ E7 específicos e T CD4⁺;
- A estratégia vacinal administrada pela via i.v. estimuladas *in vitro* com a gDE7, ou gDE7 com pIC, induziu linfócitos T CD8⁺ E7-específicos produtores das citocinas IFN- γ , IL-2 ou TNF- α . Além de induzir células T de memória efetora produtoras de IFN- γ ;
- Os dados apresentados neste trabalho permitem afirmar que a estratégia vacinal baseada em

BM-DCs mostra-se eficiente no controle de tumores associados ao HPV-16. Esses dados embasam a aplicação de uma nova abordagem imunoterapêutica voltada para o tratamento de diferentes tumores induzidos pelo HPV em condições clínicas.

REFERÊNCIAS*

1. Araújo Neto LA, Teixeira LA. De doença da civilização a problema de saúde pública: câncer, sociedade e medicina brasileira no século XX. Bol do Mus Para Emílio Goeldi Ciências Humanas [Internet]. janeiro de 2017;12(1):173–88. Available at: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1981-81222017000100173&lng=pt&tlng=pt
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin [Internet]. novembro de 2018;68(6):394–424. Available at: <http://doi.wiley.com/10.3322/caac.21492>
3. Araujo LH, Baldotto C, Castro Jr G de, Katz A, Ferreira CG, Mathias C, et al. Lung cancer in Brazil. J Bras Pneumol [Internet]. fevereiro de 2018;44(1):55–64. Available at: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-37132018000100055&lng=en&tlng=en
4. INCA. Estimativa 2018. Incidência de câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. 2017. 130 p.
5. 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. Rev Bras Cancerol [Internet]. 15 de fevereiro de 2019;64(3):439–40. Available at: <https://rbc.inca.gov.br/revista/index.php/revista/article/view/56>
6. Brianti P, Flammoneis E De, Mercuri SR. Review of HPV-related diseases and cancers. 2017;80–5.
7. Hammer A, Rositch A, Qeadan F, Gravitt PE, Blaakaer J. cancer : A systematic review and meta-analysis. 2016;2803:2795–803.
8. Nour NM. Collective action and Women’s agency: A Background paper. Gender equality and development. World Bank. 2009;2(4):240–4.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from:

http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

9. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol*. 2005;32:7–15.
10. Prigge E, Doeberitz MVK, Reuschenbach M. Clinical relevance and implications of HPV-induced neoplasia in different anatomical locations. *Mutat Res Mutat Res* [Internet]. 2016; Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.06.005>
11. Wakeham K, Kavanagh K. The Burden of HPV-Associated Anogenital Cancers. 2014;1–11.
12. Ministério da Saúde. Estudo epidemiológico sobre a prevalência nacional de infecção pelo hpv. 2019. 120 p.
13. Dunne EF. Human Papillomavirus. In: *Netter's Infectious Diseases* [Internet]. Elsevier; 2012. p. 327–34. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781437701265000574>
14. Sanchez GI, Bravo LE, Hernandez-Suarez G, Tous S, Alemany L, de Sanjose S, et al. Secular trends of HPV genotypes in invasive cervical cancer in Cali, Colombia 1950–1999. *Cancer Epidemiol* [Internet]. fevereiro de 2016;40:173–8. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1877782115002866>
15. Hammer A, Rositch A, Qeadan F, Gravitt PE, Blaakaer J. Age-specific prevalence of HPV16/18 genotypes in cervical cancer: A systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer* [Internet]. 15 de junho de 2016;138(12):2795–803. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.29959>
16. Dillner J. Mapping of linear epitopes of human papillomavirus type 16: The E1, E2, E4, E5, E6 and E7 open reading frames. *Int J Cancer*. 1990;46(4):703–11.
17. Hagensee ME, Yaegashi N, Galloway DA. Self-Assembly of Human Papillomavirus Type 1 Capsids by of the L1 and L2 Capsid Proteins. *Assembly*. 1993;67(1):315–22.
18. Zhang L, Zhou F, Zhao K-N. Molecular Approaches Target to Immunotherapy for HPV-Associated Cancers. *Curr Cancer Drug Targets* [Internet]. 30 de junho de 2017;17(6). Available at: <http://www.eurekaselect.com/148407/article>

19. Steinbach A, Riemer AB. Immune evasion mechanisms of human papillomavirus: An update. *Int J Cancer* [Internet]. 15 de janeiro de 2018;142(2):224–9. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.31027>
20. Hoppe-Seyler K, Bossler F, Braun JA, Herrmann AL, Hoppe-Seyler F. The HPV E6/E7 Oncogenes: Key Factors for Viral Carcinogenesis and Therapeutic Targets. *Trends Microbiol* [Internet]. fevereiro de 2018;26(2):158–68. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X17301774>
21. Harper DM, DeMars LR. HPV vaccines – A review of the first decade. *Gynecol Oncol* [Internet]. julho de 2017;146(1):196–204. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0090825817307746>
22. Schiller JT, Müller M. Next generation prophylactic human papillomavirus vaccines. *Lancet Oncol* [Internet]. maio de 2015;16(5):e217–25. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1470204514711799>
23. Lowy DR. Prophylactic human papillomavirus vaccines. *J Clin Invest* [Internet]. 1 de maio de 2006;116(5):1167–73. Available at: <http://www.jci.org/cgi/doi/10.1172/JCI28607>
24. Monie A, Hung C-F, Roden R, Wu T-C. Cervarix: a vaccine for the prevention of HPV 16, 18-associated cervical cancer. *Biologics* [Internet]. março de 2008;2(1):97–105. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19707432>
25. Zhai L, Tumban E. Gardasil-9: A global survey of projected efficacy. *Antiviral Res* [Internet]. junho de 2016;130:101–9. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166354216300377>
26. Einstein MH, Baron M, Levin MJ, Chatterjee A, Edwards RP, Zepp F, et al. Comparison of the immunogenicity and safety of CervarixTM and Gardasil[®] human papillomavirus (HPV) cervical cancer vaccines in healthy women aged 18–45 years. *Hum Vaccin* [Internet]. 27 de outubro de 2009;5(10):705–19. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/hv.5.10.9518>
27. Stanley M, Pinto LA, Trimble C. Human Papillomavirus Vaccines – Immune Responses.

- Vaccine [Internet]. novembro de 2012;30:F83–7. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X12007244>
28. World Health Organization. Introducing Hpv Vaccine Into National. 2016;104. Available at: www.who.int/immunization/documents
 29. Poerschke de Quevedo J, Inácio M, Moro Wieczorkiewicz A, Invernizzi N. A política de vacinação contra o HPV no Brasil: a comunicação pública oficial e midiática face à emergência de controvérsias. *Rev Tecnol e Soc.* 2016;12(24).
 30. LARISSE SILVA DALLA LIBERA, GRACYELY NABRATYLVA DE SOUSA ALVES, HAYNSLAINE GABRIEL E SOUZA, MARIA ADRIANA SANTOS CARVALHO.
Avaliação da infecção pelo Papiloma Vírus Humano (HPV) em exames citopatológicos
Human Papillomavirus infection evaluation in cytopathological exams. *Rbac* [Internet]. 2016;48(2):138–81. Available at: http://www.rbac.org.br/wp-content/uploads/2016/06/ARTIGO-7_RBAC-48-2-2016-ref.-257.pdf
 31. Santesso N, Mustafa RA, Schünemann HJ, Arbyn M, Blumenthal PD, Cain J, et al. World Health Organization Guidelines for treatment of cervical intraepithelial neoplasia 2-3 and screen-and-treat strategies to prevent cervical cancer. *Int J Gynecol Obstet* [Internet]. março de 2016;132(3):252–8. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1016/j.ijgo.2015.07.038>
 32. A. Viviane, O. Namie, B. E. Qualidade de vida de pacientes com câncer hematológico em tratamento quimioterápico. *Rev da Esc Enferm da USP.* 2013;47(2):355–61.
 33. Sawada NO, Dias AM, Zago MMF. O efeito da radioterapia sobre a qualidade de vida dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço. *Rev Bras Cancerol* [Internet]. 2006;52(4):323–9. Available at: <http://ieeexplore.ieee.org/document/7318381/>
 34. Young D, Xiao CC, Murphy B, Moore M, Fakhry C, Day TA. Increase in head and neck cancer in younger patients due to human papillomavirus (HPV). *ORAL Oncol* [Internet]. 2015;1:10–3. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2015.03.015>
 35. Marth C, Landoni F, Mahner S, McCormack M, Gonzalez-Martin A, Colombo N. Cervical cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Ann*

- Oncol [Internet]. julho de 2017;28(suppl_4):iv72–83. Available at: <https://academic.oup.com/annonc/article-lookup/doi/10.1093/annonc/mdx220>
36. Diniz M de O, Ferreira LC de S. Biotecnologia aplicada ao desenvolvimento de vacinas. *Estud Avançados* [Internet]. 2010;24(70):19–30. Available at: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-40142010000300003&lng=pt&tlng=pt
 37. Zhai K, Ding J, Shi H. HPV and lung cancer risk: A meta-analysis. *J Clin Virol* [Internet]. 2014;1–7. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2014.09.014>
 38. Skeate JG, Woodham AW, Einstein MH, Da Silva DM, Kast WM. Current therapeutic vaccination and immunotherapy strategies for HPV-related diseases. *Hum Vaccin Immunother* [Internet]. 2 de junho de 2016;12(6):1418–29. Available at: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21645515.2015.1136039>
 39. Zhou C, Tuong ZK, Frazer IH. Papillomavirus Immune Evasion Strategies Target the Infected Cell and the Local Immune System. 2019;9(August).
 40. Moller M, Viscidi RP, Sun Y, Guerrero E, Hill PM, Shah F, et al. Antibodies to HPV-16 E6 and E7 proteins as markers for HPV-16-associated invasive cervical cancer. *Virology*. 1992;187(2):508–14.
 41. Comprehensive L, Signaling C, Author C, Zacatenco SP, Madero GA. The E6 Oncoprotein from HPV16 Enhances the Canonical Wnt/ β -catenin Pathway in Skin Epidermis. 2011;(55).
 42. Masterson L, Lechner M, Loewenbein S, Mohammed H, Davies-Husband C, Fenton T, et al. CD8 + T cell response to human papillomavirus 16 E7 is able to predict survival outcome in oropharyngeal cancer. *Eur J Cancer* [Internet]. novembro de 2016;67:141–51. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959804916323851>
 43. Stevanović S, Draper LM, Langan MM, Campbell TE, Kwong ML, Wunderlich JR, et al. Complete Regression of Metastatic Cervical Cancer After Treatment With Human Papillomavirus–Targeted Tumor-Infiltrating T Cells. *J Clin Oncol* [Internet]. 10 de maio de 2015;33(14):1543–50. Available at: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2014.58.9093>

44. Yang A, Farmer E, Wu TC, Hung C-F. Perspectives for therapeutic HPV vaccine development. *J Biomed Sci* [Internet]. 4 de dezembro de 2016;23(1):75. Available at: <http://jbiomedsci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12929-016-0293-9>
45. Morrison J, Lasserson T. HPV vaccination: balancing facts. *Cochrane Database Syst Rev* [Internet]. 29 de junho de 2018; Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.ED000126>
46. Lin K, Roosinovich E, Ma B, Hung C-F, Wu T-C. Therapeutic HPV DNA vaccines. *Immunol Res* [Internet]. 12 de julho de 2010;47(1–3):86–112. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s12026-009-8141-6>
47. Alvarez RD, Huh WK, Bae S, Lamb LS, Conner MG, Boyer J, et al. A pilot study of pNGVL4a-CRT/E7(detox) for the treatment of patients with HPV16 + cervical intraepithelial neoplasia 2/3 (CIN2/3). *Gynecol Oncol* [Internet]. fevereiro de 2016;140(2):245–52. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0090825815301980>
48. Morrow MP, Kraynyak KA, Sylvester AJ, Shen X, Amante D, Sakata L, et al. Augmentation of cellular and humoral immune responses to HPV16 and HPV18 E6 and E7 antigens by VGX-3100. *Mol Ther - Oncolytics* [Internet]. 2016;3:16025. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2372770516300626>
49. Trimble CL, Morrow MP, Kraynyak KA, Shen X, Dallas M, Yan J, et al. 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. *Lancet* [Internet]. novembro de 2015;386(10008):2078–88. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673615002391>
50. Nascimento IP, Leite LCC. Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies. *Brazilian J Med Biol Res* [Internet]. dezembro de 2012;45(12):1102–11.

Available at:

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100879X2012001200001&lng=en&tlng=en

51. Woodland DL. Novel vaccine approaches. *Viral Immunol.* 2013;26(1):1–2.
52. Li J, Chen S, Ge J, Lu F, Ren S, Zhao Z, et al. 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* [Internet]. 2017;35(47):6459–67. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.09.003>
53. Herrera Ramírez JC, De la Mora AC, De la Mora Valle A, Lopez-Valencia G, Hurtado RMB, Rentería Evangelista TB, et al. Immunopathological evaluation of recombinant mycobacterial antigen Hsp65 expressed in *Lactococcus lactis* as a novel vaccine candidate. *Iran J Vet Res* [Internet]. 2017;18(3):197–202. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29163649>
54. 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* [Internet]. 2000;5(5):401. Available at: [http://cest.allenpress.com/perlserv/?request=getabstract&doi=10.1379%2F1466-1268\(2000\)005%3C0401%3AIOAHPT%3E2.0.CO%3B2](http://cest.allenpress.com/perlserv/?request=getabstract&doi=10.1379%2F1466-1268(2000)005%3C0401%3AIOAHPT%3E2.0.CO%3B2)
55. Vici P, Pizzuti L, Mariani L, Zampa G, Santini D, Di Lauro L, et al. Targeting immune response with therapeutic vaccines in premalignant lesions and cervical cancer: hope or reality from clinical studies. *Expert Rev Vaccines* [Internet]. 2 de outubro de 2016;15(10):1327–36. Available at: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14760584.2016.1176533>
56. Roman LD, Wilczynski S, Muderspach LI, Burnett AF, O’Meara A, Brinkman JA, et al. A phase II study of Hsp-7 (SGN-00101) in women with high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol* [Internet]. setembro de 2007;106(3):558–66. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S009082580700340X>

57. Lee S-J, Yang A, Wu T-C, Hung C-F. Immunotherapy for human papillomavirus-associated disease and cervical cancer: review of clinical and translational research. *J Gynecol Oncol* [Internet]. 2016;27(5). Available at: <http://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.3802/jgo.2016.27.e51>
58. Diniz MO, Lasaro MO, Ertl HC, Ferreira LCS. Immune Responses and Therapeutic Antitumor Effects of an Experimental DNA Vaccine Encoding Human Papillomavirus Type 16 Oncoproteins Genetically Fused to Herpesvirus Glycoprotein D. *Clin Vaccine Immunol* [Internet]. 1 de outubro de 2010;17(10):1576–83. Available at: <http://cvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/CVI.00264-10>
59. Diniz MO, Ferreira LCS. 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 J Med Biol Res* [Internet]. maio de 2011;44(5):421–7. Available at: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100879X2011000500007&lng=en&tlng=en
60. Porchia BFMM, Diniz MO, Cariri FAMO, Santana VC, Amorim JH, Balan A, et al. 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. 2011;2320–30.
61. Porchia BFMM, Moreno ACR, Ramos RN, Diniz MO, de Andrade LHTM, Rosa DS, et al. Herpes Simplex Virus Glycoprotein D Targets a Specific Dendritic Cell Subset and Improves the Performance of Vaccines to Human Papillomavirus-Associated Tumors. *Mol Cancer Ther* [Internet]. setembro de 2017;16(9):1922–33. Available at: <http://mct.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1535-7163.MCT-17-0071>
62. Porchia BFMM, Diniz MO, Cariri FAMO, Santana VC, Amorim JH, Balan A, et al. Purified Herpes Simplex Type 1 Glycoprotein D (gD) Genetically Fused with the Type 16

Human Papillomavirus E7 Oncoprotein Enhances Antigen-Specific CD8 + T Cell Responses and

Confers Protective Antitumor Immunity. *Mol Pharm* [Internet]. 5 de dezembro de 2011;8(6):2320–30. Available at: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/mp200194s>

63. SALES NS et al. 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*. 2017;35(52):7240–9.
64. Silva JR, Sales NS, Silva MO, Aps LRMM, Moreno ACR, Rodrigues EG, et al. Expression of a soluble IL-10 receptor enhances the therapeutic effects of a papillomavirus-associated antitumor vaccine in a murine model. *Cancer Immunol Immunother* [Internet]. 26 de maio de 2019;68(5):753–63. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00262-018-02297-2>
65. Yang Y. Cancer immunotherapy: harnessing the immune system to battle cancer. *J Clin Invest* [Internet]. 1 de setembro de 2015;125(9):3335–7. Available at: <https://www.jci.org/articles/view/83871>
66. Schumacher TN, Schreiber RD. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science* (80-) [Internet]. 3 de abril de 2015;348(6230):69–74. Available at: <http://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.aaa4971>
67. Samstein RM, Lee C-H, Shoushtari AN, Hellmann MD, Shen R, Janjigian YY, et al. Tumor mutational load predicts survival after immunotherapy across multiple cancer types. *Nat Genet* [Internet]. 2019;51(2):202–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30643254>
68. Ribas A, Wolchok JD. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science* (80-) [Internet]. 23 de março de 2018;359(6382):1350–5. Available at: <http://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.aar4060>
69. Klebanoff CA, Rosenberg SA, Restifo NP. Prospects for gene-engineered T cell immunotherapy for solid cancers. *Nat Med* [Internet]. 6 de janeiro de 2016;22(1):26–36. Available at: <http://www.nature.com/articles/nm.4015>

70. Le Gall CM, Weiden J, Eggermont LJ, Figdor CG. Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Nat Mater* [Internet]. 23 de junho de 2018;17(6):474–5. Available at: <http://www.nature.com/articles/s41563-018-0093-6>
71. Romani N, Clausen BE, Stoitzner P. Langerhans cells and more: langerin-expressing dendritic cell subsets in the skin. *Immunol Rev* [Internet]. março de 2010;234(1):120–41. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.0105-2896.2009.00886.x>
72. Constantino J, Gomes C, Falcão A, Neves BM, Cruz MT. Dendritic cell-based immunotherapy: a basic review and recent advances. *Immunol Res* [Internet]. 28 de agosto de 2017;65(4):798–810. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s12026-017-8931-1>
73. BANCHEREAU, Jacques; STEINMAN RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;392(6673):245.
74. Granot T, Senda T, Carpenter DJ, Matsuoka N, Weiner J, Gordon CL, et al. Dendritic Cells Display Subset and Tissue-Specific Maturation Dynamics over Human Life. *Immunity* [Internet]. março de 2017;46(3):504–15. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S107476131730081X>
75. RUTELLA, Sergio; DANESE, Silvio; LEONE G. Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age. *Blood*. 2006;108(5):1435–40.
76. Segura E. Review of Mouse and Human Dendritic Cell Subsets. In 2016. p. 3–15. Available at: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-3606-9_1
77. Gardner A, Ruffell B. Dendritic Cells and Cancer Immunity. *Trends Immunol* [Internet]. dezembro de 2016;37(12):855–65. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471490616301405>
78. GRAUER O et al. Analysis of maturation states of rat bone marrow-derived dendritic cells using an improved culture technique. *Histochem Cell Biol*. 2002;117(4):351–62.
79. Segura E, Amigorena S. Cross-Presentation in Mouse and Human Dendritic Cells. In 2015. p. 1–31. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065277615000292>

80. Pitt JM, André F, Amigorena S, Soria J-C, Eggermont A, Kroemer G, et al. Dendritic cell-derived exosomes for cancer therapy. *J Clin Invest* [Internet]. 1 de abril de 2016;126(4):1224–32. Available at: <https://www.jci.org/articles/view/81137>
81. Garg AD, Coulie PG, Van den Eynde BJ, Agostinis P. Integrating Next-Generation Dendritic Cell Vaccines into the Current Cancer Immunotherapy Landscape. *Trends Immunol* [Internet]. agosto de 2017;38(8):577–93. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471490617300947>
82. Deauvieu F, Ollion V, Doffin A-C, Achard C, Fonteneau J-F, Verronese E, et al. Human natural killer cells promote cross-presentation of tumor cell-derived antigens by dendritic cells. *Int J Cancer* [Internet]. 1 de março de 2015;136(5):1085–94. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.29087>
83. Topalian SL, Taube JM, Anders RA, Pardoll DM. Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 15 de maio de 2016;16(5):275–87. Available at: <http://www.nature.com/articles/nrc.2016.36>
84. Patente TA, Pinho MP, Oliveira AA, Evangelista GCM, Bergami-Santos PC, Barbuto JAM. Human Dendritic Cells: Their Heterogeneity and Clinical Application Potential in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol* [Internet]. 21 de janeiro de 2019;9. Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.03176/full>
85. Santin AD, Bellone S, Palmieri M, Ravaggi A, Romani C, Tassi R, et al. HPV16/18 E7pulsed dendritic cell vaccination in cervical cancer patients with recurrent disease refractory to standard treatment modalities. *Gynecol Oncol*. 2006;100(3):469–78.
86. Verma V, Kim Y, Lee M-C, Lee J-T, Cho S, Park I-K, et al. Activated dendritic cells delivered in tissue compatible biomatrices induce in-situ anti-tumor CTL responses leading to tumor regression. *Oncotarget* [Internet]. 28 de junho de 2016;7(26). Available at: <http://www.oncotarget.com/fulltext/9529>
87. Pinho MP, Sundarasetty BS, Bergami-Santos PC, Steponavicius-Cruz K, Ferreira AK, Stripecke R, et al. Dendritic-tumor cell hybrids induce tumor-specific immune responses more effectively than the simple mixture of dendritic and tumor cells. *Cytotherapy*

[Internet]. abril de 2016;18(4):570–80. Available at:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1465324916000165>

88. Boudewijns S, Bloemendal M, Gerritsen WR, de Vries IJM, Schreiber G. Dendritic cell vaccination in melanoma patients: From promising results to future perspectives. *Hum Vaccin Immunother* [Internet]. 2 de outubro de 2016;12(10):2523–8. Available at:
<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21645515.2016.1197453>
89. Tryggestad AMA, Axcróna K, Bigalke I, Inderberg-Suso EM, Skorstad G, Axcróna U, et al. Abstract 2235: Clinical results of a Phase I/II trial of adjuvant therapeutic vaccination in high risk resected prostate cancer patients using autologous dendritic cells loaded with mRNA from primary prostate cancer tissue, hTERT and survivin. In: *Clinical Research (Excluding Clinical Trials)* [Internet]. American Association for Cancer Research; 2016. p. 2235–2235. Available at:
<http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/15387445.AM2016-2235>
90. Zhang L, Xu Y, Shen J, He F, Zhang D, Chen Z, et al. Feasibility study of DCs/CIKs combined with thoracic radiotherapy for patients with locally advanced or metastatic nonsmall-cell lung cancer. *Radiat Oncol* [Internet]. 21 de dezembro de 2016;11(1):60. Available at: <http://ro-journal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13014-016-0635-5>
91. Schuler PJ, Harasymczuk M, Visus C, DeLeo A, Trivedi S, Lei Y, et al. Phase I Dendritic Cell p53 Peptide Vaccine for Head and Neck Cancer. *Clin Cancer Res* [Internet]. 1 de maio de 2014;20(9):2433–44. Available at:
<http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-13-2617>
92. Wilgenhof S, Corthals J, Heirman C, van Baren N, Lucas S, Kvistborg P, et al. Phase II Study of Autologous Monocyte-Derived mRNA Electroporated Dendritic Cells (TriMixDCMEL) Plus Ipilimumab in Patients With Pretreated Advanced Melanoma. *J Clin Oncol* [Internet]. 20 de abril de 2016;34(12):1330–8. Available at:
<http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2015.63.4121>
93. Lin K, Guarnieri FG, Carroll KFS, Pardoll DM, Wu T, Levitsky HI, et al. *Advances in Brief*

- Treatment of Established Tumors with a Novel Vaccine That Enhances Major Histocompatibility Class II Presentation of Tumor Antigen'. 1996;(410):21–7.
94. Inaba BK, Turley S; Yamaide F; Iyoda T; Mahnke K.; Inaba M et al. Efficient Presentation of Phagocytosed Cellular Fragments on the Major Histocompatibility Complex Class II Product Dendritic Cells. 1998;11:188.
 95. ROSAS, Marcela; GORDON, Siomon; TAYLOR PR. Characterisation of the expression and function of the GM-CSF receptor α -chain in mice. Eur J Immunol. 2007;37(9):2518–28.
 96. Labeur MS, Roters B, Pers B, Mehling A, Luger TA, Schwarz T, et al. Generation of tumor immunity by bone marrow-derived dendritic cells correlates with dendritic cell maturation stage. J Immunol [Internet]. 1999;162(1):168–75. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9886383>
 97. MU C-Yo et al. High expression of PD-L1 in lung cancer may contribute to poor prognosis and tumor cells immune escape through suppressing tumor infiltrating dendritic cells maturation. Med Oncol. 2011;28(3):682–8.
 98. Bortoncello BP, Almeida FB, Peres A. Células Natural Killer e seu Potencial na Imunoterapia Contra o Câncer. Ciência em Mov - Biociências e Saúde [Internet]. 31 de dezembro de 2013;15(30):17–25. Available at: <http://www.bibliotekevirtual.org/index.php/2013-02-07-03-02-35/2013-02-07-03-03-11/264-cmbs/v15n30/2037-v15n30a02.html>
 99. Waldhauer I, Steinle A. NK cells and cancer immunosurveillance. Oncogene [Internet]. 6 de outubro de 2008;27(45):5932–43. Available at: <http://www.nature.com/articles/onc2008267>
 100. Bowers WE. Differentiation of dendritic cells in cultures of rat bone marrow cells. J Exp Med [Internet]. 1 de abril de 1986;163(4):872–83. Available at: <http://www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.163.4.872>
 101. Sallusto F. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and

- downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* [Internet]. 1 de abril de 1994;179(4):1109–18. Available at: <http://www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.179.4.1109>
102. Lutz MB, Suri RM, Niimi M, Ogilvie ALJ, Kukutsch NA, Röbner S, et al. Immature dendritic cells generated with low doses of GM-CSF in the absence of IL-4 are maturation resistant and prolong allograft survival in vivo. *Eur J Immunol* [Internet]. julho de 2000;30(7):1813–22. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/1521-4141%28200007%2930%3A7%3C1813%3A%3AAID-IMMU1813%3E3.0.CO%3B2-8>
 103. Helft J, Böttcher J, Chakravarty P, Zelenay S, Huotari J, Schraml BU, et al. GM-CSF Mouse Bone Marrow Cultures Comprise a Heterogeneous Population of CD11c+MHCII+ Macrophages and Dendritic Cells. *Immunity* [Internet]. junho de 2015;42(6):1197–211. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761315002162>
 104. De Smedt T. Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo. *J Exp Med* [Internet]. 1 de outubro de 1996;184(4):1413–24. Available at: <http://www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.184.4.1413>
 105. Conti BJ, Santiago KB, Sforcin JM. Células dendríticas : mini-revisão Dendritic cells : a short review. *Biosaúde*. 2014;16:28–33.
 106. Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 17 de setembro de 2002;99(19):12293–7. Available at: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.192461099>
 107. Santos GJL, Pinheiro DCSN. Ethnopharmacological aspects of therapy associated with antitumor activity. *Rev Bras Hig e Sanidade Anim* [Internet]. 2016;10. Available at: <http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/1981-2965.20160042>
 108. Tacke PJ, de Vries IJM, Torensma R, Figdor CG. Dendritic-cell immunotherapy: from ex vivo loading to in vivo targeting. *Nat Rev Immunol* [Internet]. outubro de 2007;7(10):790–802. Available at: <http://www.nature.com/articles/nri2173>

109. Cox MC, Castiello L, Mattei M, Santodonato L, D'Agostino G, Muraro E, et al. Clinical and Antitumor Immune Responses in Relapsed/Refractory Follicular Lymphoma Patients after Intranodal Injections of IFN α -Dendritic Cells and Rituximab: a Phase I Clinical Trial. *Clin Cancer Res* [Internet]. 1 de setembro de 2019;25(17):5231–41. Available at: <http://clincancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1078-0432.CCR-19-0709>
110. Zafar S, Parviainen S, Siurala M, Hemminki O, Havunen R, Tähtinen S, et al. Intravenously usable fully serotype 3 oncolytic adenovirus coding for CD40L as an enabler of dendritic cell therapy. *Oncoimmunology* [Internet]. 24 de fevereiro de 2017;6(2):e1265717. Available at: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/2162402X.2016.1265717>
111. Hemminki O, Diaconu I, Cerullo V, Pesonen SK, Kanerva A, Joensuu T, et al. Ad3-hTERTE1A, a Fully Serotype 3 Oncolytic Adenovirus, in Patients With Chemotherapy Refractory Cancer. *Mol Ther* [Internet]. setembro de 2012;20(9):1821–30. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1525001616321712>
112. Hirooka Y, Kawashima H, Ohno E, Ishikawa T, Kamigaki T, Goto S, et al. Comprehensive immunotherapy combined with intratumoral injection of zoledronate-pulsed dendritic cells, intravenous adoptive activated T lymphocyte and gemcitabine in unresectable locally advanced pancreatic carcinoma: a phase I/II trial. *Oncotarget* [Internet]. 5 de janeiro de 2018;9(2). Available at: <http://www.oncotarget.com/fulltext/22974>
113. de Araújo-Souza PS, Hanschke SCH, Viola JPB. Epigenetic Control of Interferon-Gamma Expression in CD8 T Cells. *J Immunol Res* [Internet]. 2015;2015:1–7. Available at: <http://www.hindawi.com/journals/jir/2015/849573/>
114. Balsamo M, Zambello R, Teramo A, Pedrazzi M, Sparatore B, Scordamaglia F, et al. Analysis of NK cell/DC interaction in NK-type lymphoproliferative disease of granular lymphocytes (LDGL): role of DNAM-1 and NKp30. *Exp Hematol* [Internet]. outubro de 2009;37(10):1167–75. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301472X09002513>

115. Anguille S, Van Acker HH, Van den Bergh J, Willemen Y, Goossens H, Van Tendeloo VF, et al. Interleukin-15 Dendritic Cells Harness NK Cell Cytotoxic Effector Function in a Contact- and IL-15-Dependent Manner. Lapteva N, organizador. PLoS One [Internet]. 7 de maio de 2015;10(5):e0123340. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0123340>
116. Silva VTM. Brachytherapy in Pelvic Recurrent Carcinoma of the Uterine Cervix: Clinical Response, Survival and Toxicity Campinas 2018 [Internet]. UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS; 2018. Available at: http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/332736/1/Silva_ViniciusTolotiMoschini_Da_M.pdf
117. Halim TYF, Hwang YY, Scanlon ST, Zaghouani H, Garbi N, Fallon PG, et al. Group 2 innate lymphoid cells license dendritic cells to potentiate memory TH2 cell responses. Nat Immunol [Internet]. 2 de janeiro de 2016;17(1):57–64. Available at: <http://www.nature.com/articles/ni.3294>