

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
CURSO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

GUILHERME FORMOSO PELEGRIN

**CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO ANTITUMORAL DA COMBINAÇÃO DO mRNA
CODIFICANTE PARA ANTI-CTLA-4 COM UMA VACINA DE DNA ESPECÍFICA
PARA TUMORES ASSOCIADOS AO HPV-16**

**RIBEIRÃO PRETO
2022**

GUILHERME FORMOSO PELEGRIN

**CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO ANTITUMORAL DA COMBINAÇÃO DO mRNA
CODIFICANTE PARA ANTI-CTLA-4 COM UMA VACINA DE DNA ESPECÍFICA
PARA TUMORES ASSOCIADOS AO HPV-16**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biomédicas.

Orientador: Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira

Co-orientação: Dra. Jamile Ramos da Silva

RIBEIRÃO PRETO
2022

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
CURSO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

GUILHERME FORMOSO PELEGRIN

**CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO ANTITUMORAL DA COMBINAÇÃO DO mRNA
CODIFICANTE PARA ANTI-CTLA-4 COM UMA VACINA DE DNA ESPECÍFICA
PARA TUMORES ASSOCIADOS AO HPV-16**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biomédicas.

Orientador: Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira

Co-orientação: Dra. Jamile Ramos da Silva

Aprovado em: ____ de _____ de _____

Examinador (a): Nome: _____
 Instituição: _____
 Assinatura: _____

Examinador (a): Nome: _____
 Instituição: _____
 Assinatura: _____

Examinador (a): Nome: _____
 Instituição: _____
 Assinatura: _____

Autorizo a reprodução e divulgação total deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

A inclusão deste trabalho na Biblioteca Digital foi aprovada pela Comissão Coordenadora do Curso em sua 63^a Sessão Extraordinária, realizada em 06/06/2022.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha gratidão primeiramente a toda minha família, a qual, por meio da união de suas individualidades, muitas vezes opostas e complementares, forneceu as condições necessárias para que eu pudesse me tornar quem sou hoje.

Aos meus pais, Carlos e Rita, agradeço a escolha de me gerar, a dedicação e o tempo para cuidar de um filho, o amor, o carinho e os esforços para que nada nunca nos faltasse em casa. Sou grato também por sempre valorizarem a educação e o respeito. Ao meu irmão e melhor amigo Álvaro, agradeço a amizade, o amor, os conselhos e o apoio em tudo que faço.

Aos meus avós paternos, João e Marília, e maternos, Francisco e Maria Aparecida, agradeço imensamente, além do amor e carinho sempre dados, o incentivo aos estudos. Desde a minha alfabetização em casa até o suporte financeiro para eu conseguir estudar em outras cidades, vocês foram e são essenciais em cada parte desse processo. Sou muito grato também à minha terceira avó de coração, Jacy, que, mesmo em sua simplicidade, foi a pessoa que mais me incentivou a ser cientista desde criança.

Aos meus tios, tias e primos, e todos os demais familiares que contribuíram com a minha formação enquanto indivíduo agradeço o apoio ao longo desses anos e os bons momentos em família que passamos juntos.

Ao meu orientador, Prof. Luís Carlos, agradeço a oportunidade e a confiança em meu trabalho, além de todo o suporte ao longo do desenvolvimento desse projeto. Sou grato também à Carol por ter sido uma das primeiras pessoas a me acolher e apresentar o LDV e por também acreditar em todo o potencial que eu tinha enquanto aluno.

À Jamile, minha co-orientadora e pessoa com quem eu mais convivi ao longo desse um ano e meio, sou eternamente grato por tudo que me ensinou e pelos bons momentos que passamos juntos, dentro e fora do laboratório. Agradeço por compadecer dos meus dramas, auxiliar quando eu entrava em desespero, corrigir meus textos e, principalmente, confiar no meu trabalho e no meu potencial enquanto cientista.

Ao meu amado grupo HPV sou extremamente grato pelo acolhimento desde o início, pelo auxílio e parceria durante os meus experimentos, e por todos os ensinamentos que cada uma de vocês acrescentou em minha vida: Bruna, Carol, Giovanna, Jamile, Luana, Karine, Mariângela e Naty.

Aos demais integrantes e colegas do LDV agradeço toda a parceria, amizade e ensinamentos: Aléxia, Fernanda, Lennon, Mariana, Mônica, Profª. Rita, Robert, Samantha e Samuel.

Ao Eduardo Gimenes agradeço todo o suporte técnico e logístico ao longo da execução deste trabalho e à Maria do Carmo agradeço por todo o cuidado com nosso ambiente de trabalho e preparo de nossos materiais.

Agradeço à equipe da Instalação Animal do ICB II todo o trabalho, organização e limpeza durante a manutenção dos animais em experimentação. Sou grato também a todos os funcionários do ICB II pela dedicação e eficiência na execução tão essencial de suas funções.

Ao Prof. Norbet Pardi e sua equipe agradeço a parceria com nosso grupo de pesquisa e o fornecimento da formulação baseada em RNA mensageiro utilizada no atual trabalho.

Sou grato também à Universidade de São Paulo e a todos os docentes e funcionários que foram essenciais para a minha formação. Aos meus amigos e colegas que conheci ao longo desses quatro anos e meio de graduação agradeço de coração todos os bons momentos juntos, o apoio, o acolhimento, as risadas, a parceria nos milhares de seminários e os rolês inesquecíveis.

Agradeço também ao CNPq pelo financiamento desta e demais pesquisas de diversos cientistas brasileiros.

A todos vocês que, direta ou indiretamente, contribuíram para a conclusão deste trabalho, e àqueles que eu eventualmente possa ter me esquecido de mencionar, deixo aqui expressa minha total gratidão!

Este trabalho foi realizado sob a orientação do Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira, a co-orientação da Dra. Jamile Ramos da Silva, e desenvolvido no Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas (LDV), no Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, nº de processo: 139027/2021-1).

“*se
nem
for
terra*

*se
trans
for
mar*”

Paulo Leminski (1944 - 1989)*

* LEMINSKI, Paulo. **Toda Poesia**. 1. ed. São Paulo: Editora Companhia das Letras, 2013.

RESUMO

No Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas (LDV) foram elaboradas diferentes vacinas terapêuticas para o controle de tumores associados ao papilomavírus humano (HPV). A utilização de anticorpos monoclonais (mAbs) direcionados a alvos específicos (*checkpoints*) para o controle da imunidade celular representa uma outra estratégia para a imunoterapia de diferentes tipos de tumores. Trabalhos anteriores demonstraram que bloqueadores de *checkpoints* (por exemplo, mAb anti-CTLA-4) podem contribuir para o controle de tumores induzidos por HPV. Nesse trabalho, foi avaliado o efeito antitumoral da combinação de uma imunoterapia baseada em RNA mensageiro (mRNA) encapsulado em nanopartícula lipídica (LNP) como método de expressão de mAbs anti-CTLA-4, em associação com uma vacina de DNA (pgDE7h) voltada para o controle de tumores induzidos pelo HPV-16, principal tipo de HPV envolvido com a indução de tumores. Inicialmente, foi caracterizada a cinética de expressão de CTLA-4 em linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ esplênicos e intratumoriais de camundongos tratados ou não com a vacina pgDE7h. A frequência desses tipos celulares foi semelhante nos dois grupos experimentais. Em seguida, foram testados diferentes regimes vacinais envolvendo a combinação da vacina de DNA (pgDE7h) com o mRNA-LNP mAb anti-CTLA-4. Avaliou-se o intervalo de tempo entre a vacinação e o tratamento com o mRNA, assim como variação das doses de ambos os tratamentos. Além disso, compararamos a proteção terapêutica induzida pela vacina pgDE7h quanto com o mRNA-LNP mAb anti-CTLA-4 ou o mAb anti-CTLA-4 purificado. No modelo experimental utilizado e na condição terapêutica testada, foi possível observar que a coadministração do mRNA-LNP anti-CTLA-4 com a vacina pgDE7h está associada à piora de alguns parâmetros avaliados, como porcentagens de proteção antitumoral, sobrevivência e frequência de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos produtores de IFN- γ no sangue periférico. Diferentes variáveis podem estar associadas aos resultados observados, como os níveis de expressão de mAb anti-CTLA-4 *in vivo* e sua farmacocinética. Os resultados obtidos mostram que a inibição de CTLA-4 precisa ser melhor caracterizada para avaliar se é possível obter algum benefício da sua combinação com imunoterapias destinadas ao tratamento de tumores associados ao HPV, especificamente a vacina desenvolvida pelo LDV. Nossa estudo abre perspectivas para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para o controle de tumores induzidos por HPV e contribuem para a validação de tratamentos baseados no uso de mRNA-LNP.

Palavras-chave: câncer; HPV; vacinas; imunoterapia; mRNA; mAb anti-CTLA-4.

ABSTRACT

At the Vaccine Development Laboratory (LDV) different therapeutic vaccines were developed for the control of tumors associated with human papillomavirus (HPV). The use of monoclonal antibodies (mAbs) directed to specific targets (checkpoints) for the control of cellular immunity represents another strategy for the immunotherapy of different types of tumors. Previous work has shown that checkpoint blockers (e.g. anti-CTLA-4 mAb) can contribute to the control of HPV-induced tumors. In this work, we evaluated the antitumor effect of the combination of an immunotherapy based on messenger RNA (mRNA) encapsulated in lipid nanoparticle (LNP) as a method of expression of anti-CTLA-4 mAbs, in combination with a DNA vaccine (pgDE7h) aimed at the control of tumors induced by HPV-16, the main type of HPV involved in tumor induction. Initially, the kinetics of CTLA-4 expression in splenic and intratumoral CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes of mice treated or not with pgDE7h vaccine was characterized. The frequency of these cell types was similar in the two experimental groups. Then, different vaccine regimens involving the combination of the DNA vaccine (pgDE7h) with the mRNA-LNP anti-CTLA-4 mAb were tested. The time interval between vaccination and mRNA treatment was evaluated, as well as the variation of the doses of both treatments. In addition, we compared the therapeutic protection induced by the pgDE7h vaccine associated with either anti-CTLA-4 mRNA-LNP mAb or purified anti-CTLA-4 mAb. In the experimental model used and in the therapeutic condition tested, it was possible to observe that the co-administration of anti-CTLA-4 mRNA-LNP with the pgDE7h vaccine is associated with the worsening of some parameters evaluated, such as percentages of antitumor protection, survival and frequency of CD8⁺ E7-specific IFN- γ producers T lymphocytes in peripheral blood. Different variables may be associated with the observed results, such as the expression levels of anti-CTLA-4 mAb *in vivo* and its pharmacokinetics. The results obtained show that CTLA-4 inhibition needs to be better characterized to assess whether it is possible to obtain any benefit from its combination with immunotherapies intended for the treatment of HPV-associated tumors, specifically the vaccine developed by LDV. Our study opens perspectives for the development of new therapeutic approaches for the control of HPV-induced tumors and contributes to the validation of treatments based on the use of mRNA-LNP.

Key-words: cancer; HPV; vaccines; immunotherapy; mRNA; anti-CTLA-4 mAb.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema de formulações vacinais e rotas de entrega	30
Figura 2 – Caracterização da expressão de CTLA-4 em linfócitos de camundongos C57BL/6 ..	
34	
Figura 3 – Controle de qualidade da vacina pgDE7h.....	35
Figura 4 – <i>Dot blot</i> de sobrenadante de cultura de células HEK 293T após transfecção com mRNA-LNP anti-CTLA-4.....	36
Figura 5 – Avaliação da presença de <i>Mycoplasma</i> em cultura de células TC-1.	37
Figura 6 – Ensaio de proteção terapêutica em camundongos C57BL/6 desafiados com células TC-1 imunizados com a vacina pgDE7h em associação com o mRNA-LNP codificante para anti-CTLA-4	38
Figura 7 – Ensaio de marcação intracelular de IFN- γ em linfócitos T CD8 ⁺ E7-específicos presentes no sangue periféricos dos camundongos C57BL/6 imunizados com a associação de pgDE7h ao mRNA-LNP anti-CTLA-4	40
Figura 8 – Ensaio de proteção terapêutica em camundongos C57BL/6 desafiados com células TC-1 imunizados com a vacina pgDE7h em três diferentes doses	42
Figura 9 – Ensaio de proteção terapêutica em camundongos C57BL/6 desafiados com células TC-1 imunizados com 5 μ g vacina pgDE7h em associação com o mRNA-LNP codificante para anti-CTLA-4 em três diferentes doses.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

ACK	<i>ammonium-chloride-potassium</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i> (grupo de diferenciação)
CO ₂	dióxido de carbono
CTLA-4	<i>cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4</i> (proteína associada ao linfócito T citotóxico 4)
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
E	<i>early protein</i> (proteína de expressão precoce)
EUA	Estados Unidos da América
gD	glicoproteína D
HPV	<i>human papilloma virus</i> (vírus do papiloma humano)
HSV	<i>herpes simplex virus</i> (vírus herpes simplex)
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i> (Agência Internacional de Pesquisa em Câncer)
IFN-γ	interferon-γ
i.m.	intramuscular
i.p.	intraperitoneal
IVT	<i>in vitro transcription</i> (transcrição <i>in vitro</i>)

L	<i>late protein</i> (proteína de expressão tardia)
LB	Luria-Bertani
LNP	<i>lipid nanoparticle</i> (nanopartícula lipídica)
m1ΨTP	N1-metil-pseudouridina 5'- trifosfato
mAb	<i>monoclonal antibody</i> (anticorpo monoclonal)
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> (complexo principal de histocompatibilidade)
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico mensageiro)
NaCl	cloreto de sódio
OMS	Organização Mundial da Saúde
p53	antígeno celular de tumor p53
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (tampão fosfato-salino)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
pH	potencial hidrogeniônico
pRb	proteína retinoblastoma
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SFB	soro fetal bovino

TCR	receptor de célula T
UTP	uridina trifosfato
VLP	<i>virus like particle</i> (partícula semelhantes a vírus)

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
®	marca registrada
US\$	dólares americanos
mM	milimolar (10^{-3} mol x litro ⁻¹)
U	unidade
mL	mililitro (10^{-3} litro)
°C	graus Celsius
RCF	força centrífuga relativa
µL	microlitro (10^{-6} litro)
x	vezes
pmol	picomol (10^{-12} mol)
V	volt
kbp	pares de quilobase (10^3 pares de base)
bp	pares de base
RPM	rotações por minuto
L	litro

μg micrograma (10^{-6} grama)

h hora

mm milímetro (10^{-3} metro)

pg picograma (10^{-12} grama)

ms milissegundo (10^{-3} segundo)

mg miligramma (10^{-3} grama)

kg quilograma (10^3 grama)

ng nanograma (10^{-9} grama)

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	19
1.1.	O VÍRUS DO PAPILOMA HUMANO (HPV).....	19
1.2.	EPIDEMIOLOGIA E RELAÇÃO COM CÂNCER	19
1.3.	MECANISMOS DE ONCOGÊNESE DO HPV	20
1.4.	ESTRATÉGIAS PROFILÁTICAS E TRATAMENTOS ONCOLÓGICOS DISPONÍVEIS.....	21
1.5.	VACINAS TERAPÊUTICAS CONTRA TUMORES INDUZIDOS POR HPV	22
1.6.	MOLÉCULAS DE <i>CHECKPOINT</i> IMUNOLÓGICO: RELAÇÃO ENTRE CTLA-4 E CÂNCER.....	23
1.7.	USO DA PLATAFORMA mRNA-LNP NO CONTEXTO IMUNOTERAPÊUTICO	
	24	
2.	OBJETIVOS	25
2.1.	OBJETIVO GERAL.....	25
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3.	MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1.	ANIMAIS	26
3.2.	LINHAGEM CELULAR.....	26
3.3.	PCR PARA DETECÇÃO DE CONTAMINAÇÃO POR <i>Mycoplasma</i>	26
3.4.	FORMULAÇÃO VACINAL	27
3.5.	ENSAIO DE CARACTERIZAÇÃO DA TRADUÇÃO <i>IN VITRO</i> DO mRNA-LNP	28
3.6.	DESAFIO COM CÉLULAS TUMORAIS E IMUNIZAÇÃO	29
3.7.	CARACTERIZAÇÃO DA CINÉTICA DE EXPRESSÃO DE CTLA-4 EM LINFÓCITOS	30
3.8.	ENSAIO DE MARCAÇÃO INTRACELULAR DE IFN- γ EM LINFÓCITOS T CD8 $^{+}$	
	31	
3.9.	TRATAMENTO ESTATÍSTICO	32
4.	RESULTADOS	33

4.1.	CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CTLA-4 EM LINFÓCITOS MURINOS	33
4.2.	CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO ANTITUMORAL DA COMBINAÇÃO DA VACINA pgDE7H COM O mRNA-LNP CODIFICANTE PARA ANTI-CLTA-4 ...	34
4.2.1.	Produção e caracterização da vacina pgDE7h	34
4.2.2.	Avaliação da tradução <i>in vitro</i> do mRNA-LNP anti-CTLA-4	35
4.2.3.	Testagem das células TC-1 quanto à presença de <i>Mycoplasma</i>	36
4.2.4.	Avaliação do efeito antitumoral terapêutico mediado pela combinação da vacina pgDE7h com o mRNA-LNP codificante para anti-CTLA-4.....	37
4.2.5.	Avaliação do efeito antitumoral terapêutico mediado por diferentes doses da vacina pgDE7h	41
4.2.6.	Avaliação do efeito antitumoral terapêutico mediado pela combinação da vacina pgDE7h com o mRNA-LNP codificante para anti-CTLA-4 em diferentes doses ou com o mAb anti-CLTA-4	43
5.	DISCUSSÃO	46
6.	CONCLUSÃO.....	50
	REFERÊNCIAS	51
	ANEXO A - CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)	58
	ANEXO B – COLABORAÇÃO EM ARTIGO CIENTÍFICO	59

1. INTRODUÇÃO

1.1. O VÍRUS DO PAPILOMA HUMANO (HPV)

Os vírus do papiloma humano (HPVs) representam uma vasta família de vírus não envelopados, com DNA circular de fita dupla, capazes de infectar epitélios pavimentosos estratificados, como a pele e as mucosas (Graham, 2017). Atualmente, já foram identificados mais de 200 genótipos diferentes de HPV, sendo um subgrupo de aproximadamente 40 genótipos responsável por infecções sexualmente transmissíveis, as quais podem acometer toda a região anogenital, boca e orofaringe de homens e mulheres (Bzhalava *et al.*, 2015; Stanley, 2010).

Em geral, o genoma do HPV contém aproximadamente 7.800 pares de base e está organizado em genes que codificam oito proteínas distintas: seis de expressão precoce (E) e duas de expressão tardia (L). As proteínas E1 e E2 são responsáveis por modular a transcrição e replicação viral; já E5, E6 e E7 possuem capacidade de regular o crescimento celular e promover evasão ao sistema imune; enquanto a proteína E4, cujo gene se sobrepõe à fase de leitura do gene da proteína E2, tem a função de reorganizar o citoesqueleto. Por fim, as proteínas tardias L1 e L2 compõem a estrutura do capsídeo viral (Van Doorslaer *et al.*, 2012; zur Hausen, 2002; Danos *et al.*, 1982).

1.2. EPIDEMIOLOGIA E RELAÇÃO COM CÂNCER

O HPV é responsável pela infecção sexualmente transmissível mais frequente no mundo, sendo estimado que mais de 80% da população mundial será infectada pelo vírus em algum momento da vida (Winer e Koutsky, 2004). Embora a maioria das infecções por HPV sejam eliminadas naturalmente pelo sistema imunológico do indivíduo em até dois anos, foi constatado que, em cerca de 10% a 20% das mulheres infectadas, a infecção se torna persistente (Moscicki *et al.*, 1998).

Há mais de três décadas, foi identificada a associação entre a infecção crônica por alguns tipos de HPV, principalmente HPV-16 e HPV-18, e o desenvolvimento de cânceres no trato anogenital (zur Hausen, 1991). Posteriormente, foi demonstrado que a infecção por HPV é uma condição necessária para o surgimento do câncer cervical, já que está presente em mais de 99% dos casos (Walboomers *et al.*, 1999). Baseado nisso, foi feita uma classificação para os diferentes tipos de HPV segundo seu potencial carcinogênico, dividindo-os entre HPVs de

alto risco (hrHPV), em que se incluem HPV-16 e HPV-18 (associados a 70% dos casos de tumores cervicais), e baixo risco (lrHPV), por exemplo, HPV-6 e HPV-11 (Burd, 2003; Stanley, 2010).

Segundo o Observatório Global do Câncer (IARC/OMS), em 2020, foram registrados mais de 600 mil novos casos de câncer cervical e quase 342 mil mortes por esse câncer mundialmente. Somente no Brasil, no período de 2012 a 2016, foram perdidas em média 5,5 mil vidas anualmente por câncer de colo de útero (Tallon *et al.*, 2020). Além desse tipo específico de câncer, a infecção persistente por HPV está associada ao surgimento de 88% dos cânceres de ânus e 25% dos cânceres de orofaringe no mundo em homens e mulheres (Bruni *et al.*, 2019). Esses dados confirmam que, ainda hoje, novas terapias precisam ser desenvolvidas para reduzir a mortalidade por cânceres associados ao HPV e oferecer qualidade de vida para os pacientes.

1.3. MECANISMOS DE ONCOGÊNESE DO HPV

Uma vez no interior celular, o genoma do vírus pode permanecer na sua forma episomal ou integrar-se ao da célula hospedeira, fenômeno observado em 83% dos casos de câncer cervical positivo para HPV (Burk *et al.*, 2017). Durante o processo de integração genômica, é frequente ocorrer a inativação do gene E2, responsável por reprimir os genes E6 e E7, o que leva ao aumento da expressão dessas duas proteínas na célula hospedeira (Pal e Kundu, 2020). Nos tumores associados à infecção por esse vírus, as proteínas E6 e E7 foram identificadas como as principais responsáveis por induzir a imortalização de queratinócitos humanos e inibir sua diferenciação (Klingelhutz e Roman, 2012).

Esse fenômeno ocorre por meio da interação dessas proteínas virais com proteínas da célula hospedeira envolvidas na regulação do ciclo celular. A proteína E7, por exemplo, é capaz de interagir com a proteína retinoblastoma (pRb), um importante supressor de tumor que regula a entrada da célula na fase S do ciclo celular, e induzir sua degradação pela via ubiquitina-proteassoma (Boyer *et al.*, 1996; Dyson *et al.*, 1989). Já a proteína E6 tem como alvo molecular outra proteína supressora de tumor, a p53, responsável por regular genes envolvidos no processo de apoptose e controle do ciclo celular. A interação entre essas duas proteínas leva à degradação da p53 pela via proteassomal (Green e Kroemer, 2009; Scheffner *et al.*, 1990). Embora isso não seja suficiente para promover a transformação celular, são criadas condições favoráveis para a ocorrência desse evento, uma vez que as células infectadas passam a se proliferar mais intensamente e com menos controle. Ao longo do

tempo, isso as torna mais suscetíveis a acumularem mutações e seguirem no processo de carcinogênese (McLaughlin-Drubin e Münger 2009).

1.4. ESTRATÉGIAS PROFILÁTICAS E TRATAMENTOS ONCOLÓGICOS DISPONÍVEIS

Com o surgimento de mais evidências da relação entre HPV e o desenvolvimento de câncer, ainda na década de 1990, vacinas profiláticas começaram a ser pesquisadas e desenvolvidas. As primeiras vacinas comercialmente disponíveis foram a Cervarix® (GlaxoSmithKline Biologicals) contra HPV-16 e HPV-18 e a Gardasil® (Merck) contra os mesmos dois tipos adicionados de HPV-6 e HPV-11. As duas vacinas são baseadas em partículas semelhantes ao vírus (VLPs) contendo a proteína L1 recombinante do capsídeo viral de cada genótipo-alvo de HPV, induzindo alta proteção contra a infecção (Schiller e Lowy, 2012). Já existe também uma vacina de segunda geração, a Gardasil® 9, composta por VLPs de proteína L1 dos mesmos quatro genótipos da Gardasil® acrescida de mais cinco: HPV-31, HPV-33, HPV-45, HPV-52 e HPV-58, prevenindo até 90% dos casos de câncer cervical (Zhai e Tumban, 2016).

No entanto, apesar de as vacinas profiláticas garantirem uma alta proteção contra a infecção inicial, elas não são eficazes em auxiliar a eliminação de infecções pré-existentes (Hildesheim *et al.*, 2016; Hildesheim *et al.*, 2007). Isso porque a proteína L1 do capsídeo viral não é expressa em níveis detectáveis nas células epiteliais basais nem em células de tumores cervicais, impedindo seu reconhecimento pelos elementos do sistema imune (Hung *et al.*, 2008). Portanto, uma vez estabelecida a infecção e, eventualmente, desenvolvidos lesões ou tumores, são necessárias intervenções médicas.

Na clínica, os tratamentos comumente disponíveis para tumores associados ao HPV, independente do sítio anatômico, baseiam-se na combinação de intervenções cirúrgicas, radioterapia e quimioterapia, variando de acordo com o estágio e a gravidade da lesão cancerosa (Hong *et al.*, 2010; Janicek e Averette, 2001; Symer e Yeo, 2018). Entretanto, pacientes com câncer em estágio avançado e aqueles com lesões recorrentes podem não se beneficiar dos tratamentos convencionais, resultando em baixas taxas de sobrevida e impactos negativos na qualidade de vida (Hu e Ma, 2018; Nguyen *et al.*, 2002).

1.5. VACINAS TERAPÊUTICAS CONTRA TUMORES INDUZIDOS POR HPV

Diante desse cenário, as vacinas terapêuticas têm ganhado destaque por terem alvos moleculares mais específicos, reprogramando respostas imunológicas do próprio paciente contra o tumor, o que pode contribuir para minimizar efeitos adversos e aumentar a eficácia terapêutica (Peralta-Zaragoza *et al.*, 2012). A fim de promover um efeito antitumoral eficiente, essas vacinas devem ser capazes de desencadear respostas imunológicas celulares baseadas na apresentação de抗ígenos por células dendríticas e ativação de linfócitos T CD8⁺ (Huang *et al.*, 2010).

Os principais alvos moleculares para tumores induzidos por HPV para o desenvolvimento de vacinas terapêuticas são as proteínas E6 e E7, expressas constitutivamente tanto nas lesões pré-malignas quanto nas invasivas, além de estarem ausentes em células saudáveis (Hancock *et al.*, 2018). Segundo essa ideia, nosso grupo tem estudado os efeitos terapêuticos de vacinas de DNA em modelo murino de câncer induzido por HPV-16, utilizando o plasmídeo codificante para uma proteína híbrida (pDE7h), formada pela fusão da glicoproteína D (gD) do Vírus Herpes Simplex do tipo 1 (HSV-1) à proteína E7 do HPV-16 como antígeno vacinal. Estudos anteriores do nosso grupo já revelaram que a vacina composta pelo plasmídeo pgDE7h é capaz de ativar linfócitos T CD8⁺ E7-específicos e gerar proteção antitumoral em camundongos transplantados com as células TC-1 que expressam as oncoproteínas E6 e E7 do HPV-16 (Diniz *et al.*, 2010; Diniz *et al.*, 2013; Lasaro *et al.*, 2005). Além disso, quando a administração é associada à eletroporação *in vivo*, obtém-se um efeito terapêutico maior (Sales *et al.*, 2017).

As vacinas de DNA têm como vantagens sua segurança, facilidade de produção e purificação, e a capacidade de apresentação de抗ígenos via MHC de classes I e II (Lee *et al.*, 2016). Contudo, essa plataforma vacinal costuma apresentar uma baixa imunogenicidade, sendo necessário investigar novas formas de aumentar as respostas imunológicas desencadeadas (Ma *et al.*, 2012).

1.6. MOLÉCULAS DE *CHECKPOINT* IMUNOLÓGICO: RELAÇÃO ENTRE CTLA-4 E CÂNCER

O microambiente tumoral é caracterizado por um perfil imunossupressor, o que pode impactar negativamente a eficácia de vacinas terapêuticas, visto que a ativação dos linfócitos está prejudicada (Chen e Mellman, 2013). Um importante mecanismo de evasão ao sistema imune é a subversão dos *checkpoints* imunológicos, isto é, o conjunto de vias inibitórias que mantêm a autotolerância e modulam negativamente a resposta imune. Por outro lado, em situações fisiológicas normais, os *checkpoints* imunológicos atuam de forma a evitar danos excessivos aos tecidos do organismo, mas favorecem a sobrevivência das células cancerosas (Pardoll, 2012).

Uma das moléculas de *checkpoint* melhor descrita dentro desse processo é a proteína associada ao linfócito T citotóxico 4 (CTLA-4), expressa na superfície de linfócitos T ativados e responsável por evitar uma superestimulação do receptor de células T (TCR) (Marin-acevedo *et al.*, 2021). Essa atenuação da sinalização do TCR ocorre por meio da competição do CTLA-4 com a molécula coestimulatória CD28 pelos mesmos ligantes: CD80 e CD86, presentes nas células apresentadoras de抗ígenos (Wei *et al.*, 2018). No entanto, a afinidade do CTLA-4 pelos ligantes é maior quando comparada à afinidade do CD28 (Linsley *et al.*, 1994).

Nesse sentido, novas terapias anticâncer têm sido desenvolvidas visando bloquear tais alvos moleculares por meio de anticorpos monoclonais (mAb), de forma a aumentar a ativação de linfócitos T (Seidel *et al.*, 2018). Em modelo murino de câncer oral positivo para HPV-16, a imunoterapia com mAbs bloqueadores de PD-1 e CTLA-4 garantiu a sobrevivência de mais de 93% dos camundongos com tumores na língua por 100 dias (Dorta-Estremera *et al.*, 2019). Na clínica, o primeiro mAb anti-CTLA-4 aprovado foi o ipilimumabe, o qual apresentou resultados promissores ao aumentar a sobrevida de pacientes com melanoma metastático (Hodi *et al.*, 2010; Ledford, 2011). Entretanto, um dos fatores que dificulta a utilização dos mAbs em larga escala nos tratamentos médicos ainda é o alto custo (Fellner, 2012).

1.7. USO DA PLATAFORMA mRNA-LNP NO CONTEXTO IMUNOTERAPÊUTICO

Uma estratégia que pode ser utilizada para contornar tais dificuldades é a terapia com RNA mensageiro (mRNA). Desde o início da década de 1990, mRNAs transcritos *in vitro* (IVT mRNAs) têm sido estudados pelo seu potencial terapêutico em diversas áreas, como reposição de proteínas, desenvolvimento de vacinas contra câncer e doenças infecciosas (Sahin *et al.*, 2014). Com essa tecnologia, em vez de produzir e purificar em escala industrial proteínas complexas como os mAbs, é possível administrar apenas um mRNA codificante para essas moléculas, de forma que o organismo do próprio paciente utilize a informação genética e sintetize-as (Van Hoecke e Roose, 2019). Além disso, a síntese de mRNA *in vitro* tem um alto rendimento, o que permite uma produção rápida a um custo relativamente baixo (Pardi *et al.*, 2018). A evidência mais recente desse fato foram as vacinas de mRNA contra a COVID-19, produzidas pela Pfizer-BioNTech e Moderna, cujos preços não passam de US\$ 30,00 por dose (Jennings, 2020).

A estrutura dos IVT mRNAs, em geral, é composta por alguns elementos básicos: regiões não traduzidas (UTRs) 5' e 3', região codificante, cauda poli(A) e cap 5'. Todos esses componentes juntos agem de forma a aumentar a estabilidade da molécula e permitir a expressão da proteína de interesse (Sahin *et al.*, 2014). No entanto, somente essas estruturas não são suficientes para garantir o efeito esperado do mRNA *in vivo*. Torna-se necessário assegurar que a molécula de mRNA chegue íntegra e funcional nas suas células-alvo. Nesse sentido, o uso de nanopartículas lipídicas (LNPs) como método de entrega tem demonstrado resultados promissores *in vivo* e em testes clínicos, sendo inclusive empregadas nas formulações de algumas vacinas contra a Covid-19 (Alameh *et al.*, 2021; Polack *et al.*, 2020; Saunders *et al.*, 2021). Isso se deve à capacidade das LNPs de promoverem a captação do mRNA pela célula-alvo e oferecerem proteção contra endonucleases extracelulares e endossomais (Oberli *et al.*, 2017). As LNPs são estruturas de diâmetro inferior a 100 nm compostas por diferentes tipos de lipídios: estruturais, catiônicos ionizáveis, PEGuilados (isto é, ligados a polietilenoglicol (PEG)) e colesterol, os quais envolvem o mRNA (Cullis e Hope, 2017).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a associação de anti-CTLA-4 codificado por mRNA (mRNA-LNP) na potencialização da eficácia terapêutica da vacina pgDE7h contra tumores induzidos por HPV em modelo experimental.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar a cinética de expressão de CTLA-4 em linfócitos de animais portadores de tumor, tratados ou não com a vacina pgDE7h;
- b) Estabelecer um regime vacinal de combinação da terapia com anti-CTLA-4 mRNA-LNP associado com a vacina pgDE7h em modelo de tumores já estabelecidos;
- c) Analisar a resposta imunológica associada à proteção antitumoral induzida pela combinação terapêutica;
- d) Comparar o uso do anti-CTLA-4 codificado pelo mRNA-LNP com o anticorpo monoclonal (proteína) associado à vacina pgDE7h na proteção antitumoral utilizando o modelo de tumores induzidos por HPV-16.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Foram utilizados camundongos C57BL/6 fêmeas, de 7 a 9 semanas, oriundos do Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP (FMUSP), os quais foram mantidos no biotério dos Departamentos de Parasitologia e Microbiologia do ICB-USP e manipulados segundo as normas estabelecidas pela comissão de ética (CEUA).

3.2. LINHAGEM CELULAR

A linhagem de células tumorais TC-1 (cedida pelo Dr. T.C. Wu, Universidade Johns Hopkins, EUA) foi gerada a partir de células epiteliais pulmonares de camundongos C57BL/6 transformadas com os oncogenes E6 e E7 do HPV-16 e c-Ha-Ras (Lin *et al.*, 1996). Essas células TC-1 foram cultivadas com meio RMPI suplementado com 10 mM tampão HEPES, 50 U/mL penicilina/estreptomicina, 10% de soro fetal bovino (SFB) e mantidas a 37°C e 5% de CO₂.

3.3. PCR PARA DETECCÃO DE CONTAMINAÇÃO POR *Mycoplasma*

Foi coletada uma alíquota de 1 mL de células TC-1 previamente tripsinizadas e ressuspensas em 5 mL de meio RPMI. O material foi centrifugado a 13000 RCF por 5 minutos, e o sedimento foi lavado com 200 µL tampão fosfato-salino (PBS) 1x. Novamente o material foi centrifugado a 13000 RCF por 5 minutos e o sedimento foi ressuspenso em 20 µL de PBS 1x. Em seguida, a amostra foi fervida em banho-maria a 100°C por 10 minutos e resfriada em gelo por mais 10 minutos para lisar as células. Após mais uma centrifugação a 13000 RCF por 5 minutos, o sobrenadante foi coletado em um tubo limpo. Alíquotas de 1 µL do sobrenadante, controle positivo (lisado de células positivas para *Mycoplasma*) ou controle negativo (lisado de células negativas para *Mycoplasma*) foram misturadas a 10 pmol de primers forward (5'TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC3') e reverse (5'GGGAGCAAACAGGATTAGATAACCCT3'), DreamTaq PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific) e água ultrapura em quantidade suficiente para 25 µL. Em seguida, foi realizada a reação em cadeia da polimerase (PCR) em termociclador (Eppendorf) com aquecimento inicial a 94°C por 5 minutos; 34 ciclos de aquecimento a 94°C por 30 segundos, resfriamento

a 57,7°C por 30 segundos e reaquecimento a 72°C por 30 segundos; manutenção de temperatura a 72°C por 10 minutos e finalização da reação a 4°C por tempo indeterminado. Após a completude do PCR, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8% (FastBio) 90 V por 30 minutos, junto dos marcadores 1 kbp e 100 bp (Thermo Scientific). Por fim, o gel foi analisado utilizando fotodocumentador (Bio Rad).

3.4. VACINA

A sequência de DNA codificante para a proteína E7 do HPV-16 fusionada à proteína gD do HSV-1 (pgDE7h) possui códons otimizados para o sistema de expressão proteica humano e foi clonada no vetor pUMVC3 (Aldevron), o qual possui o promotor de citomegalovírus (CMV) e gene de resistência à canamicina. Foi preparado um inóculo de *Escherichia coli* DH5 α transformada com o vetor em 50 mL de meio Luria-Bertani (LB) autoclavado suplementado com canamicina (50 μ L/mL) e crescido *overnight* sob agitação de 220 RPM a 37°C. No dia seguinte, o inóculo crescido na razão de 1:100 e canamicina na razão de 1:1000 foram adicionados a 2L de meio LB autoclavado, e novamente foi permitido o crescimento *overnight* sob agitação de 220 RPM a 37°C. Após o crescimento, o volume final foi centrifugado a 6000 RCF a 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi utilizado para a purificação do plasmídeo com Plasmid Mega Kit (QIAGEN), seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. Em seguida, uma alíquota de 400 ng do plasmídeo purificado foi duplamente digerida com as enzimas *PstI* e *BglII* em O Buffer (Thermo Scientific) a 37°C por 4 horas e o material foi submetido a eletroforese em gel de agarose 0,8% (FastBio). O gel foi analisado em fotodocumentador (Bio Rad) em busca dos fragmentos correspondentes a pgDE7h (1,5 kbp) e o vetor pUMVC3 vazio (4,5 kbp).

Os mRNA IVT codificante para o mAb anti-CTLA-4 e para luciferase (controle), ambos encapsulados em LNP, foram cedidos pelo professor Norbert Pardi da Universidade da Pensilvânia (EUA), cujo grupo de pesquisa possui grande expertise na produção de vacinas baseadas em mRNA. Os mRNAs são do tipo convencional e não replicativo, sintetizados com modificação nucleosídica a partir da substituição de 100% das uridinas (UTP) pela N1-metil-pseudouridina 5'-trifosfato (pseudouridina - m1 Ψ TP). Essa estratégia foi adotada com base em estudos demonstrando que a incorporação da m1 Ψ é capaz de diminuir a imunogenicidade intrínseca do mRNA e aumentar sua tradução (Karikó *et al.*, 2008). As preparações foram mantidas congeladas a -80°C (**Figura 1**).

3.5. ENSAIO DE CARACTERIZAÇÃO DA TRADUÇÃO *IN VITRO* DO mRNA-LNP

Células da linhagem HEK 293T foram cultivadas em garrafas plásticas (Corning) com meio DMEM High Glucose (Gibco) suplementado com 50 U/mL penicilina/estreptomicina, 10% SFB Ultra-low IgG (Gibco) e mantidas a 37°C e 5% de CO₂ até a terceira passagem. Em seguida, as células foram plaqueadas na concentração de 2,5 x 10⁵ células/poço em três placas de cultura de 12 poços (Corning), permitindo seu crescimento por 24h nas mesmas condições anteriores. No dia seguinte, o meio de cultura foi descartado e foi adicionado um novo meio DMEM High Glucose (Gibco) suplementado com 50 U/mL penicilina/estreptomicina e 2% SFB Ultra-low IgG (Gibco). Depois de 1h em estufa, foi realizada a transfecção das células, adicionando o mRNA-LNP anti-CTLA-4 nas concentrações de 3 µg/poço e 1 µg/poço e o mRNA-LNP luciferase na concentração de 3 µg/poço (controle), diluídos em 50 µL/poço do mesmo meio de cultura. Após 12h, 24h e 48h, os sobrenadantes de cada placa foram coletados e mantidos a -20°C até análise.

Tendo em vista que a quantidade de anticorpo produzida seria provavelmente pequena, os sobrenadantes foram liofilizados e ressuspensos em um volume 10x menor, a fim de aumentar a concentração da proteína-alvo e facilitar sua detecção. Em seguida, foi realizado um *dot blot*, adicionando 15 µL de sobrenadante de cada amostra (em 5 adições de 3 µL, aguardando a secagem quase completa do volume adicionado anteriormente) a uma membrana de nitrocelulose Amersham® Protran® (GE Healthcare Life Sciences). Da mesma forma, foi feita uma escala utilizando o mAb anti-CTLA-4 na forma proteica (CellXBio®) nas quantidades de 1000 pg a 100 pg, permitindo estimar a quantidade de mAb obtida a partir da transfecção e servindo de controle positivo do experimento. Na sequência, a membrana foi bloqueada em PBS 1x com Tween® a 0,05% (PBS-T) e leite desnatado em pó a 3% por 12h a 4°C. Após esse período, a membrana foi lavada três vezes por 5 minutos com PBS-T e incubada por 1h com anticorpo anti-*mouse* conjugado com peroxidase diluído em PBS-T com leite a 3% em temperatura ambiente. Por fim, a membrana foi lavada novamente três vezes por 5 minutos com PBS-T, revelada com o kit Amersham® ECL Select® (GE Healthcare Life Sciences) e analisada em fotodocumentador (Bio Rad).

3.6. DESAFIO COM CÉLULAS TUMORAIS E IMUNIZAÇÃO

No dia do desafio, as células TC-1 foram tratadas com tripsina, lavadas duas vezes e ressuspensas em RMPI sem soro. Os camundongos foram desafiados por via subcutânea, na região dorsolateral, com 1×10^5 células TC-1 suspensas em 100 µL de meio. Quando o tumor atingiu cerca de 2 mm de diâmetro (aproximadamente 7 dias após o desafio), foi iniciada a imunoterapia, com a pgDE7h combinada ou não ao mRNA-LNP anti-CTLA-4.

A vacina pgDE7h foi administrada nas doses de 100 µg, 50 µg, 25 µg ou 5 µg (de acordo com o grupo experimental), diluídas em um volume final de 50 µL de PBS 1x, pela via intramuscular no músculo tibial anterior direito, seguido de eletroporação *in vivo* por meio da aplicação de dois pulsos de permeabilização (130 V, 450 ms) seguidos de quatro pulsos de transferência (70 V, 450 ms), utilizando o equipamento NEPA 21 e o eletrodo CUY560-5-0.5 (NepaGene) conforme descrito previamente (Sales *et al.*, 2017). Para tanto, os animais foram previamente anestesiados com uma mistura de cetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) por via intraperitoneal. A imunoterapia mRNA-LNP codificante para anti-CTLA-4 ou o mRNA-LNP luciferase (controle) foram administrados nas doses de 5 µg, 10 µg ou 20 µg, diluídas em um volume final de 50 µL de PBS 1x, por via intramuscular no músculo tibial anterior esquerdo nos intervalos de 0 e 7 dias, ou 7 e 14 dias após a imunização com pgDE7h, de acordo com o grupo experimental. O mAb anti-CTLA-4 (BioXCell®) foi administrado na dose de 50 µg em um volume final de 100 µL de solução salina a 0,9% NaCl por via intraperitoneal (**Figura 1**).

Os animais foram acompanhados por um período mínimo de 60 dias para a avaliação de sobrevida e animais livres de tumores. Os tumores, quando presentes, foram medidos com o auxílio de um paquímetro, e os animais que apresentaram tumores maiores que 15 mm de diâmetro, sinais visíveis de dor e/ou perda de peso significativa foram eutanasiados com sobredose de cetamina (300 mg/kg) e xilazina (30 mg/kg).

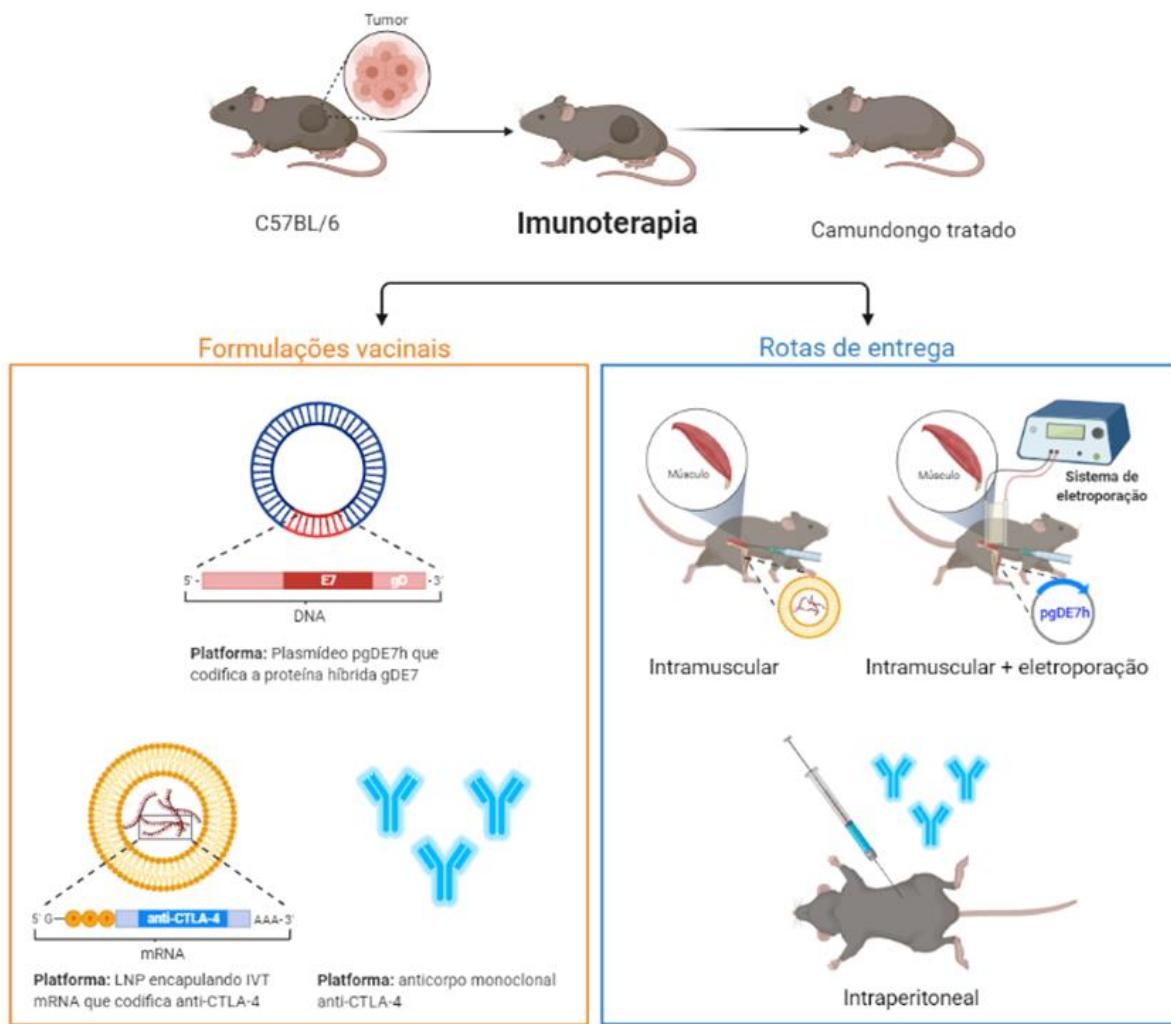


Figura 1. Esquema de formulações vacinais e rotas de administração.

3.7. CARACTERIZAÇÃO DA CINÉTICA DE EXPRESSÃO DE CTLA-4 EM LINFÓCITOS

No dia 0 (D0), os camundongos foram desafiados por via subcutânea, na região dorsolateral, com 1×10^5 células TC-1 suspensas em 100 µL de RPMI embebidas em Matrigel. Sete dias após o desafio, os animais foram imunizados com a vacina pgDE7h em dose única de 100 µg pela via intramuscular no músculo tibial anterior direito, seguido de eletroporação *in vivo*, conforme descrito anteriormente. Nos dias 7 (D7), 11 (D11), 17 (D17) e 24 (D24) após o desafio com as células tumorais, os animais foram eutanasiados, e o baço e o tumor foram retirados para a avaliação da expressão de CTLA-4 na população de linfócitos. Para isso, os baços foram tratados com tampão de lise ACK para eliminar as hemárias, por 5 minutos, centrifugados a 400 RCF por 5 minutos e as células foram ressuspensas em meio

RPMI suplementado com 2% de SFB. Já os tumores foram macerados e digeridos pela enzima colagenase (Roche) na concentração de 1 mg/mL por 1h a 37°C. Na sequência, as células foram lavadas e filtradas em filtro de 70 µm (Easy strainer Greiner Bio One) e ressuspensas em PBS 1x suplementado com SFB a 2%. As células totais foram imuno-fenotipadas com anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 e anti-CTLA-4. A expressão dos marcadores celulares foi avaliada por citometria de fluxo utilizando o aparelho Fortessa® (BD Biosciences).

3.8. ENSAIO DE MARCAÇÃO INTRACELULAR DE IFN- γ EM LINFÓCITOS T CD8 $^{+}$

Para a marcação de IFN- γ intracelular foram utilizadas células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de camundongos imunizados 7, 14, 21 e 28 dias após a administração da vacina pgDE7h. Para eliminar as hemácias, o sangue foi tratado por 5 minutos com tampão de lise ACK (BioSource International) em gelo e então centrifugado a 400 RCF por 5 minutos. Em seguida, as células foram estimuladas por 12 horas a 37°C e 5% CO₂ na presença de Brefeldin A (GolgiPlug; BD Biosciences), anti-CD28 purificado (1 µg/mL) e com o peptídeo sintético E7-específico MHC-I (Kb)-restrito (aminoácidos 49-57; RAHYNIVTF) que corresponde ao epítopo CD8 $^{+}$ imunodominante em animais C57BL/6 na concentração de 1,5 µg/mL. Células não estimuladas com o peptídeo ou estimuladas com PMA na concentração de 10 ng/mL e ionomicina na concentração de 1 µg/mL foram utilizadas como amostras negativas e positivas respectivamente. Após este período, as células foram incubadas por 30 minutos a 4°C com marcador de viabilidade celular LIVE/DEAD Fixable Aqua Stain (Invitrogen) e anticorpo anti-CD8 conjugado com fluoresceína (FITC) (BD Biosciences). Após permeabilização com Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) por 20 minutos a 4°C, as células foram tratadas com anticorpo anti-IFN- γ conjugado à ficoeritrina (PE) (BD Biosciences) por 30 minutos a 4°C. As células foram ressuspensas em PBS 1x suplementado com SFB a 2% e examinadas por citometria de fluxo utilizando o aparelho Fortessa® (BD Biosciences). Os dados foram analisados com o auxílio do programa FlowJo para a determinação das porcentagens de células INF- γ $^{+}$ /CD8 $^{+}$ sobre o total de células CD8 $^{+}$.

3.9. TRATAMENTO ESTATÍSTICO

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* GraphPad Prism versão 8.0. Os diferentes regimes vacinais foram avaliados por meio de *two-way ANOVA* com análises múltiplas seguidas do pós-teste de Bonferroni. As curvas de sobrevivência e de animais livres de tumor foram analisadas pelo teste Log-rank seguido de pós-teste Mantel-Cox. Todos os testes realizados foram bicaudais, e o nível de significância foi estabelecido tal que $p < 0,05$ (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) com um intervalo de confiança de 95%. Os métodos utilizados e o nível de significância estatística de cada experimento estão descritos na legenda das figuras apropriadas.

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CTLA-4 EM LINFÓCITOS MURINOS

A fim de determinar qual seria o melhor *timepoint* para iniciar a imunoterapia associada ao mRNA-LNP codificante para o mAb anti-CTLA-4, foi realizada uma cinética de expressão de CTLA-4 nos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ presentes no baço (**Figura 2A**) e no tumor (**Figura 2B**) dos camundongos desafiados com 1×10^5 células TC-1, vacinados com 100 µg de pgDE7h e comparadas ao grupo de animais não vacinados (PBS). Como demonstrado na **figura 2 A-B**, podemos observar que os animais vacinados com a pgDE7h apresentaram uma maior frequência de linfócitos T CD4⁺-CTLA4⁺ e CD8⁺-CTLA4⁺ esplênicos e intratumorais 17 dias após a imunização, porém os valores decaíram ao longo do tempo. Embora com um padrão de cinética similar, o fenômeno se mostrou mais intenso com os linfócitos T CD4⁺CTLA4⁺, tanto no baço quanto no tumor dos animais (**Figura 2 A-B**). Por outro lado, nos animais do grupo PBS, as frequências de linfócitos T CD4⁺-CTLA4⁺ e CD8⁺-CTLA4⁺ variaram ao longo do tempo. Não foram observadas diferenças estatísticas entre o grupo tratado com PBS (controle) e o com pgDE7h, sugerindo que a vacina não afetou a expressão de CTLA-4 nos linfócitos desses animais (**Figura 2 A-B**).

Com base nesses resultados, foi decidido administrar o mRNA-LNP codificante para o mAb anti-CTLA-4 em dois pares de *timepoints* diferentes: 0 e 7 dias após a imunização com a vacina de DNA pgDE7h, ou 7 e 14 dias após a imunização. Em relação ao dia do desafio, esses *timepoints* correspondem a aproximadamente 7-14 ou 14-21 dias, coerente ao que foi observado nas curvas de cinética da expressão de CTLA-4 nos linfócitos dos animais desafiados (**Figura 2 A-B**).

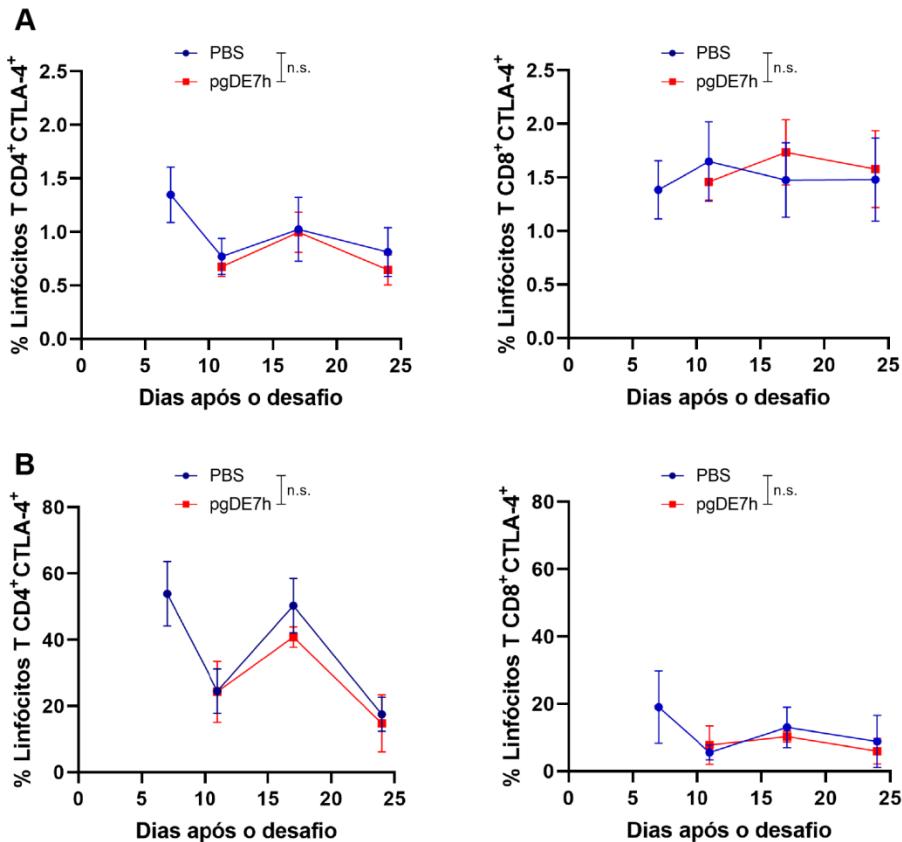


Figura 2. Caracterização da expressão de CTLA-4 em linfócitos de camundongos C57BL/6. Frequência média (%) de linfócitos T CD4⁺CTLA4⁺ e CD8⁺CTLA4⁺ presentes no (A) baço ou no (B) tumor de camundongos C57BL/6 desafiados com 1×10^5 células TC-1, tratados com PBS (controle) ou 100 µg da vacina pgDE7h por via intramuscular seguida de eletroporação. (Teste t de Student pareado). (n=8). (n.s.) diferença estatística não significativa ($p > 0,05$).

4.2. CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO ANTITUMORAL DA COMBINAÇÃO DA VACINA pgDE7H COM O mRNA-LNP CODIFICANTE PARA ANTI-CLTA-4

4.2.1. Produção e caracterização da vacina pgDE7h

O primeiro passo para iniciar o protocolo de imunização foi produzir a vacina pgDE7h, clonada no vetor pUMVC3 (Aldevron), o qual possui o promotor de citomegalovírus (CMV) e gene de resistência à canamicina. Esse plasmídeo foi amplificado em *Escherichia coli* DH5 α transformada com o vetor plasmidial. Após a purificação, uma amostra do plasmídeo foi duplamente digerida com as endonucleases *PstI* e *BglII* nas posições *upstream* e *downstream* do gene que codifica a proteína gDE7, cujo tamanho é de 1,5 kbp. Em seguida, essa amostra digerida foi analisada por eletroforese em gel de agarose 0,8% paralelamente a uma amostra do plasmídeo íntegro (Figura 3).

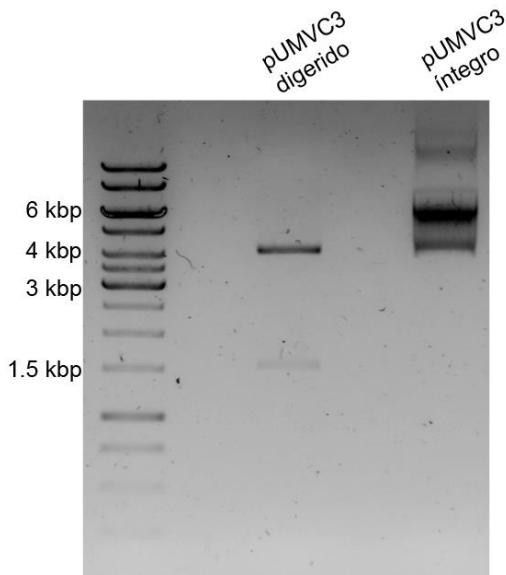


Figura 3. Controle de qualidade da vacina pgDE7h. O plasmídeo pUMVC3, nas suas formas digerida e íntegra e contendo o gene que codifica para a proteína pgDE7h, foi submetido à eletroforese em gel agarose a 0,8% a fim de averiguar a qualidade e integridade da vacina produzida.

Ao correr o gel, notamos na amostra digerida a formação de duas bandas nítidas, correspondentes a dois fragmentos de tamanhos aproximados de 4,5 kbp e 1,5 kbp. Esses fragmentos correspondem, respectivamente, ao plasmídeo pUMVC3 vazio e ao fragmento contendo o gene codificador da gDE7, confirmando que a identidade da vacina pgDE7h. Além disso, na amostra não digerida, é possível observar bandas nítidas, o que indica a integridade do plasmídeo nas suas formas enoveladas, característico da corrida de plasmídeos em gel de agarose.

4.2.2. Avaliação da tradução *in vitro* do mRNA-LNP anti-CTLA-4

A fim de garantir que o mRNA-LNP fosse capaz de ser transfectado e traduzido nas células dos animais, foi realizado um ensaio *in vitro* para avaliar a tradução e a produção do mAb anti-CTLA-4 em células HEK 293T. Após 12h, 24h e 48h da transfeccão, o sobrenadante foi coletado, concentrado e analisado por meio de *dot blot* (Figura 4).

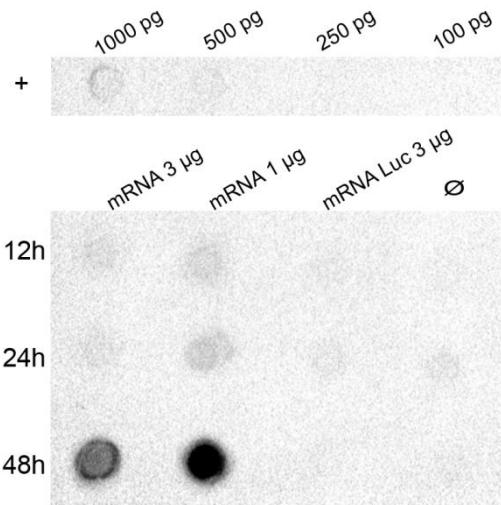


Figura 4. Dot blot de sobrenadante de cultura de células HEK 293T após transfecção com mRNA-LNP anti-CTLA-4. Após 12h, 24h ou 48h de transfecção de células HEK 293T com 3 μ g ou 1 μ g de mRNA-LNP anti-CTLA-4, 3 μ g mRNA-LNP luciferase (controle) ou nenhuma adição de mRNA (\emptyset - controle), os sobrenadantes já concentrados foram analisados por meio de *dot blot* com anticorpo secundário anti-mouse conjugado com peroxidase. Uma escala de controle positivo (+) foi criada por meio da diluição de anticorpo anti-CTLA-4 na forma proteica em quantidades de 1000 pg a 100 pg, a fim de estimar a quantidade de anticorpo produzida na transfecção.

Ao observar a imagem da membrana, notamos nitidamente a detecção do anticorpo anti-CTLA-4 nos poços em que foram adicionados 3 μ g e 1 μ g do mRNA-LNP após 48h, ainda que seja possível também notar um sinal menos intenso nos tempos de 12h e 24. Por meio da escala do controle positivo, realizada com diluições do mAb anti-CTLA-4 na forma proteica, é possível estimar que a quantidade de anticorpo produzida é superior a 1000 pg. Nos poços de controle negativo, com 3 μ g do mRNA-LNP luciferase ou sem adição de mRNA (não transfetado representado pelo símbolo \emptyset), não foi detectado nenhum sinal positivo para a presença do anticorpo, apenas alguns sinais inespecíficos os quais podem ser desprezados quando comparados com as amostras.

4.2.3. Testagem das células TC-1 quanto à ausência de *Mycoplasma*

Antes de realizar o desafio com as células TC-1 nos camundongos, foi necessário assegurar que as células estavam livres de contaminantes que eventualmente poderiam impactar o desenvolvimento do tumor nos animais. Um desses contaminantes são bactérias do gênero *Mycoplasma*, parasitas intracelulares que podem contaminar culturas de células e comprometer seu funcionamento normal (Rottem, 1993). Por isso, foi realizado um ensaio de PCR seguido de eletroforese em gel de agarose a 0,8%, para assegurar ausência de DNA específico para o gênero *Mycoplasma* nas células TC-1 (**Figura 5**).

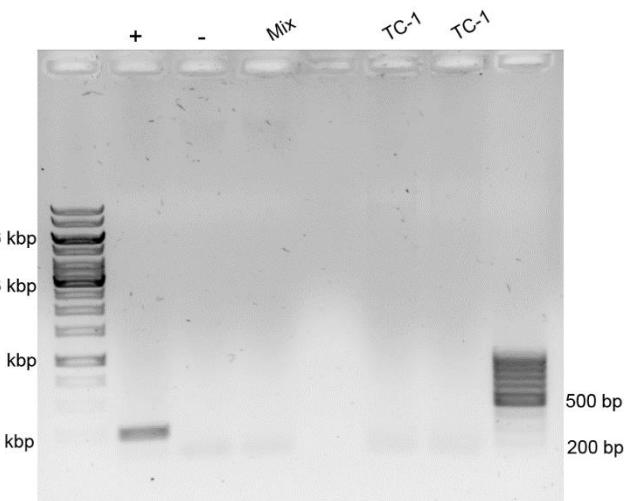


Figura 5. Avaliação da presença de *Mycoplasma* em cultura de células TC-1. Após realizar PCR e correr as amostras em gel de agarose a 0,8%, foi observada apenas uma banda no controle positivo (+), indicando amplificação do DNA bacteriano. No controle negativo (-), no mix da reação e nas duas amostras de células TC-1 não foi detectada amplificação, indicando ausência de *Mycoplasma*.

Ao analisarmos o gel, notamos a presença de uma banda com tamanho aproximado de 270 bp apenas na amostra do controle positivo, o que corresponde à sequência de tamanho esperado amplificada pelos *primers*. As amostras de células TC-1 e os demais controles não apresentaram nenhuma banda na região de 270 bp, indicando que estavam livres de contaminação por *Mycoplasma*.

4.2.4. Avaliação do efeito antitumoral terapêutico mediado pela combinação da vacina pgDE7h com o mRNA-LNP codificante para anti-CTLA-4

Foram realizados ensaios de proteção terapêutica em camundongos desafiados com 1×10^5 células TC-1. Quando os tumores atingiram um diâmetro de 2 mm (8 dias após o desafio), os animais foram imunizados com uma dose única de 100 µg ou duas doses de 50 µg (intervalo de 1 semana) de pgDE7h por via intramuscular (i.m.) seguida de eletroporação (e.p.). Grupos de camundongos vacinados foram administrados pela via intramuscular com 20 µg de mRNA-LNP anti-CTLA-4 em dois diferentes *timepoints*: 0 e 7 dias ou 7 e 14 dias após a imunização com pgDE7h, em um intervalo de sete dias entre as doses (**Figura 6A**).

Como observado na **figura 6**, todos os grupos que receberam a vacina pgDE7h, tanto dose única de 100 µg quanto duas doses de 50 µg, combinadas ou não ao mRNA-LNP anti-CTLA-4 demonstraram controle do desenvolvimento tumoral em relação ao grupo PBS. No entanto, 60 dias após o desafio, notamos que os grupos que receberam o mRNA-LNP anti-

CTLA-4 em associação com a vacina apresentaram áreas tumorais médias estatisticamente maiores que as dos grupos que receberam apenas a pgDE7h (**Figura 6B-C**). Além disso, apesar de todos os grupos terem apresentado a mesma porcentagem de sobrevivência (**Figura 6D**), a porcentagem de animais livres de tumores foi diferente entre os grupos (**Figura 6E**). Para os animais dos grupos vacinados com 100 µg de pgDE7h, a associação ao mRNA-LNP anti-CTLA-4 em ambos os *timepoints*, reduziu a proteção de 100% para 80%, porém sem significância estatística entre os grupos (**Figura 6E**). No entanto, nos grupos que receberam duas doses de 50 µg de pgDE7h, a porcentagem de animais livres de tumores caiu de 80% para 20% com a associação com o mRNA-LNP anti-CTLA-4 (**Figura 6E**).

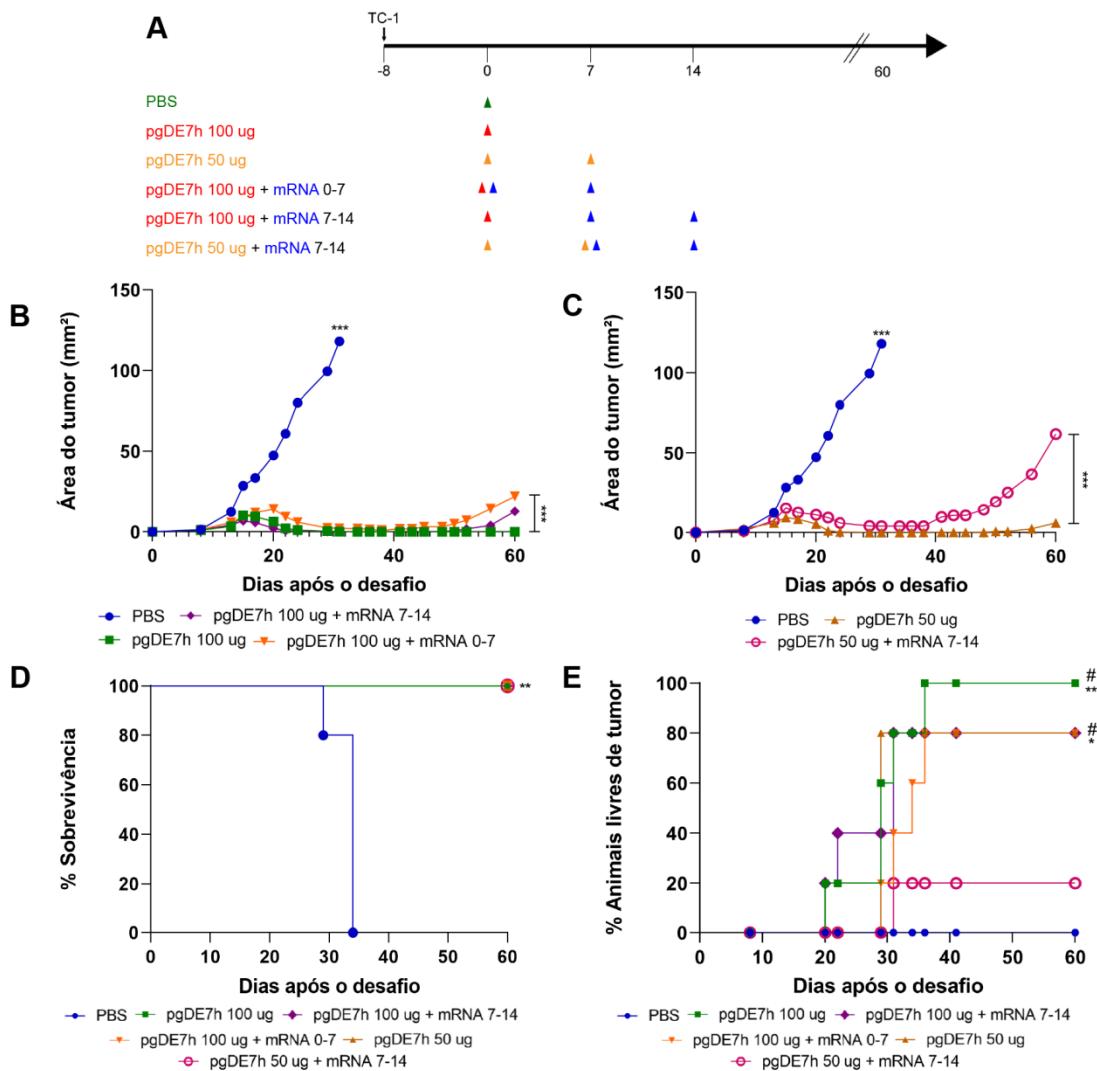


Figura 6. Ensaio de proteção terapêutica em camundongos C57BL/6 desafiados com células TC-1 imunizados com a vacina pgDE7h em associação com o mRNA-LNP codificante para anti-CTLA-4. (A) Quando o tumor atingiu cerca de 2 mm de diâmetro, os animais foram imunizados com uma dose única de 100 µg ou duas doses de 50 µg (intervalo de 7 dias) de pgDE7h (i.m. + e.p.), associada ou não a duas doses de 20 µg

de mRNA-LNP anti-CTLA-4 (intervalo de 7 dias), em dois diferentes *timepoints*: 0 e 7 dias ou 7 e 14 dias após a imunização com pgDE7h. **(B)** e **(C)** Acompanhamento da área tumoral ao longo do tempo dos grupos vacinados respectivamente com 100 µg ou 50 µg de pgDE7h (*two-way ANOVA*, pós-teste de Bonferroni). **(D)** Acompanhamento da sobrevivência dos animais por 60 dias (log-rank, pós-teste de Mantel-Cox). **(E)** Porcentagem de animais livres de tumor ao longo de 60 dias (log-rank, pós-teste de Mantel-Cox). (*) vs PBS, (#) vs 50 µg de pgDE7h + mRNA 7-14 dias. (n=5). (n.s.) diferença estatística não significativa. (*) p < 0,05; (**) p < 0,01; (***) p < 0,001.

Em seguida, avaliamos semanalmente a frequência de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos ativados no sangue periférico dos animais imunizados com os diferentes grupos experimentais. Como esperado, a vacinação com a pgDE7h promoveu a ativação linfócitos T CD8⁺ E7-específicos produtores de IFN-γ, independente da dose administrada. O pico de ativação dos linfócitos foi detectado duas semanas pós imunização que decai ao longo do tempo. Interessantemente, todos os grupos que receberam o mRNA-LNP anti-CTLA-4 associado com 100 µg ou 50 µg da vacina pgDE7h, apresentaram frequências médias de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos produtores de IFN-γ estatisticamente inferiores em relação aos grupos que receberam apenas a pgDE7h (**Figura 7B-D**). É possível notar também que os grupos tratados com mRNA-LNP anti-CTLA-4 demonstraram um desempenho igual ou inferior aos grupos imunizados com a vacina, em relação à proteção antitumoral e indução de resposta imune mediada por linfócitos T CD8⁺ E7-específicos produtores de IFN-γ.

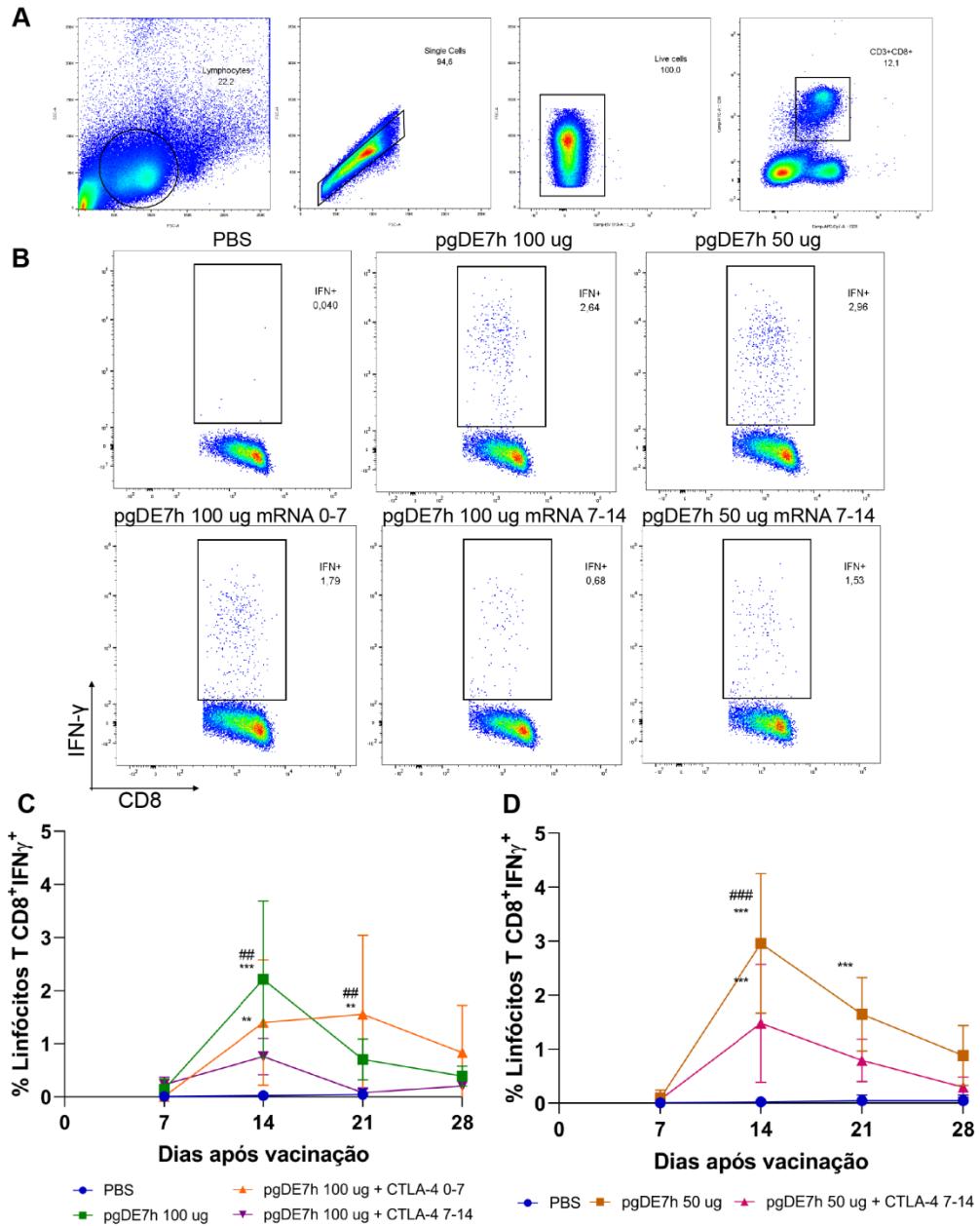


Figura 7. Ensaio de marcação intracelular de IFN- γ em linfócitos T CD8 $^{+}$ E7-específicos presentes no sangue periféricos dos camundongos C57BL/6 imunizados com a associação de pgDE7h ao mRNA-LNP anti-CTLA-4. **(A)** Estratégia de gate utilizada para análise de citometria de fluxo a partir de células de sangue periférico. Isolamento de linfócitos, seguido de células únicas, células vivas e células duplo-positivas para CD3 e CD8. **(B)** Ilustração das populações de linfócitos T CD8 $^{+}$ E7-específicos produtoras de IFN- γ 14 dias após a imunização, estimuladas *in vitro* com peptídeo MHC classe I restrito derivado de E7. Porcentagem de linfócitos T CD8 $^{+}$ E7-específicos produtoras de IFN- γ mensurados semanalmente nos dias 7, 14, 21 e 28 após a primeira dose de **(C)** 100 μ g ou **(D)** 50 μ g de pgDE7h. Análise estatística: two-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni. (*) vs PBS, (#) vs 100 μ g de pgDE7h + mRNA 7-14 dias (C) ou 50 μ g de pgDE7h + mRNA 7-14 dias (D). (n=5). (*) p < 0,05; (**) p < 0,01; (***) p < 0,001.

4.2.5. Avaliação do efeito antitumoral terapêutico mediado por diferentes doses da vacina pgDE7h

A partir dos resultados encontrados no experimento anterior, notamos que a proteção antitumoral mediada pela vacina pgDE7h foi elevada: 100% com a dose de 100 µg e 80% com duas doses de 50 µg. Dessa forma, dificilmente seria possível observar um efeito terapêutico aditivo a partir da associação com o mRNA-LNP anti-CTLA-4. Portanto, a próxima etapa do trabalho consistiu em avaliar a proteção antitumoral com diferentes doses únicas de pgDE7h sem nenhuma outra associação, a fim de escolher a dose mais apropriada para alcançar os objetivos propostos neste trabalho. Para isso, camundongos C57BL/6 foram desafiados com 1×10^5 células TC-1 e acompanhados até o diâmetro dos tumores atingir a medida de aproximadamente 2 mm (9 dias após o desafio). Em seguida, os animais foram imunizados com uma dose única de 100 µg, 50 µg ou 25 µg de pgDE7h por via intramuscular seguida de e.p. (**Figura 8A**).

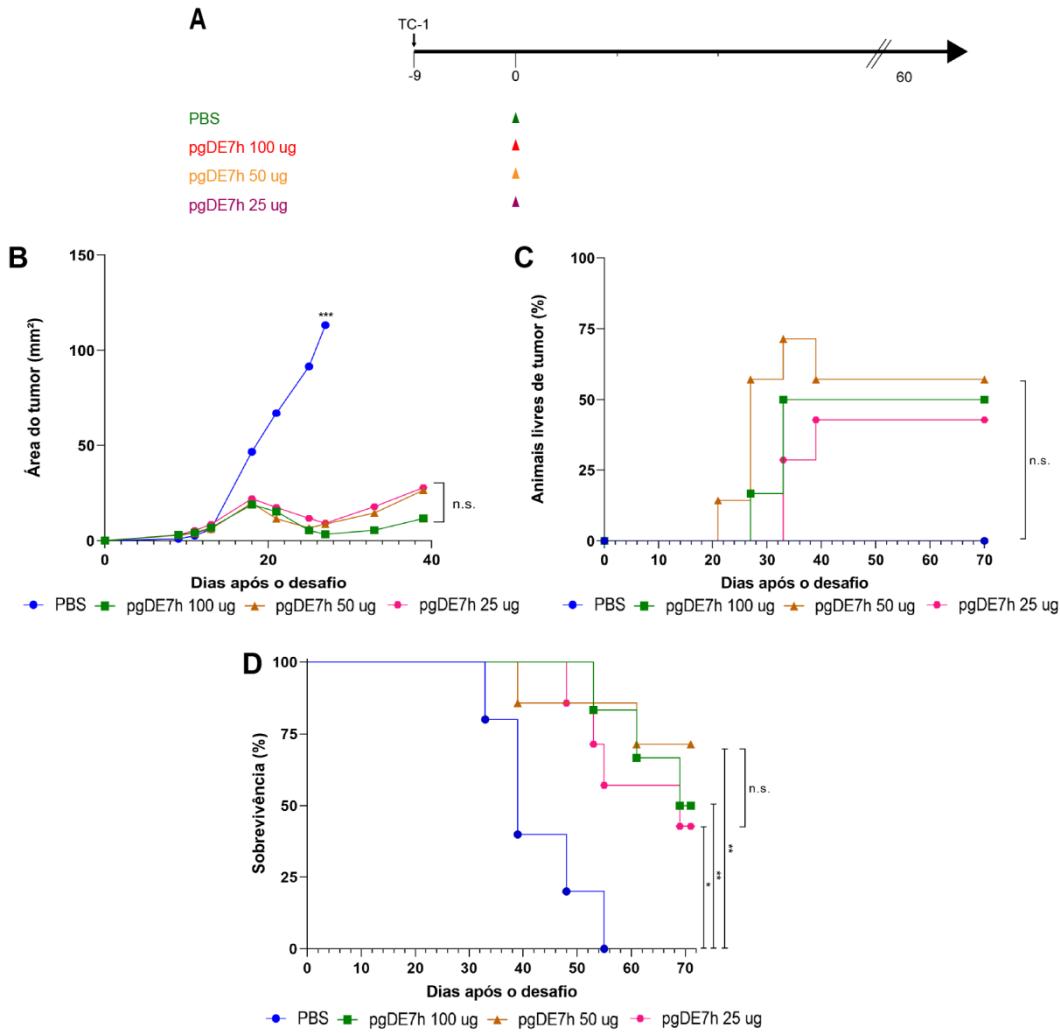


Figura 8. Ensaio de proteção terapêutica em camundongos C57BL/6 desafiados com células TC-1 imunizados com a vacina pgDE7h em três diferentes doses. (A) Quando o tumor atingiu cerca de 2 mm de diâmetro, os animais foram imunizados com uma dose única de 100 µg, 50 µg, ou 25 µg de pgDE7h (i.m. + e.p.). (B) Acompanhamento da área tumoral ao longo do tempo (*two-way* ANOVA, pós-teste de Bonferroni). (C) Porcentagem de animais livres de tumor ao longo de 70 dias (log-rank, pós-teste de Mantel-Cox). (D) Acompanhamento da sobrevivência dos animais por 70 dias (log-rank, pós-teste de Mantel-Cox). (PBS n=5; pgDE7h 100 µg n=6; pgDE7h 50 µg n=7; pgDE7h 25 µg n=7). (n.s.) diferença estatística não significativa. (*) p < 0,05; (**) p < 0,01; (***) p < 0,001.

Como observado na **figura 8**, notamos que as três diferentes dosagens da vacina pgDE7h foram capazes de induzir o desenvolvimento tumoral nos animais imunizados em relação ao grupo PBS. Porém, não houve diferença estatística entre os grupos vacinados (**Figura 8B**). Esse mesmo padrão foi observado ao analisarmos as porcentagens de animais livres de tumor (**Figura 8C**) e a curva de sobrevivência (**Figura 8D**). Isso foi um indicativo de que a dose de pgDE7h utilizada nos experimentos seguintes poderia ser ainda mais reduzida a fim de permitir a visualização de um possível efeito aditivo proporcionado pela coadministração do mRNA-LNP codificante para anti-CTLA-4.

Notamos também que a proteção antitumoral induzida pela dose única de 100 µg da vacina pgDE7h nesse experimento foi diferente da obtida anteriormente: 80% de proteção contra 100% no experimento anterior. Essa variação pode estar relacionada, entre outros fatores, à eficiência da transfecção do DNA e à expressão da proteína gDE7 *in vivo*.

4.2.6. Avaliação do efeito antitumoral terapêutico mediado pela combinação da vacina pgDE7h com o mRNA-LNP codificante para anti-CTLA-4 em diferentes doses ou com o mAb anti-CLTA-4

Com base nos resultados obtidos nos experimentos anteriores, foi realizado um novo ensaio de proteção antitumoral, mas com uma dose reduzida de pgDE7h e doses diferentes do mRNA-LNP anti-CLTA-4, além de incluir um grupo tratado com o mAb anti-CLTA-4 na forma proteica. Esse ensaio foi estabelecido de forma a avaliar três fatores: o efeito antitumoral da vacina com uma dose de apenas 5 µg, a influência da dose do mRNA-LNP anti-CTLA-4 sobre a vacina e o efeito do mAb comparado com o mRNA. Portanto, camundongos C57BL/6 foram desafiados com 1×10^5 células TC-1 e acompanhados até o diâmetro dos tumores atingir a medida de aproximadamente 2 mm (8 dias após o desafio). Em seguida, os animais foram imunizados com uma dose única de 5 µg de pgDE7h por via intramuscular seguida de eletroporação *in vivo*, exceto grupo controle. Após 7 e 14 dias da imunização, os animais receberam 20 µg, 10 µg ou 5 µg de mRNA-LNP anti-CTLA-4, 20 µg de mRNA-LNP luciferase (controle) por via intramuscular ou 50 µg de mAb anti-CTLA-4 por via intraperitoneal (**Figura 9A**).

Conforme observado na **figura 9**, uma única dose de 5 µg de pgDE7h foi capaz de retardar o crescimento tumoral até cerca de 30 dias após o desafio em relação ao grupo mRNA luciferase não vacinado. No entanto, após esse período, os tumores voltaram a crescer progressivamente, atingindo uma área semelhante à dos outros grupos (**Figura 9B**). A sobrevivência dos animais foi o parâmetro mais variável no experimento, sendo os grupos vacinados com 5 µg de pgDE7h, sozinha ou associada a 10 µg mRNA-LNP anti-CTLA-4, os únicos com aumento de sobrevivência superior a 90 dias após o desafio, com taxas de sobrevivência e animais livres de tumores de 20% e 25% respectivamente (**Figura 9C-D**). Embora tenham sido observadas diferenças estatísticas entre os grupos vacinados com a pgDE7h e o grupo que recebeu apenas mRNA-LNP luciferase, não houve diferença significativa entre os grupos vacinados com a combinação terapêutica, independentemente da dose de mRNA-LNP anti-CTLA-4.

Em seguida, avaliamos semanalmente a frequência de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos ativados circulantes no sangue dos animais vacinados. Duas semanas após a imunização, todos os grupos que receberam o mRNA-LNP anti-CTLA-4 e os controles apresentaram frequências médias de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos produtores de IFN- γ inferiores em relação ao grupo que recebeu apenas a vacina pgDE7h (**Figura 9E**), o qual apresentou um pico de resposta. No 21º dia, notamos que o grupo que recebeu o mAb anti-CTLA-4 apresentou um pico de frequência média de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos produtores de IFN- γ mais tardio quando comparado com todos os outros grupos vacinais de todos os experimentos realizados.

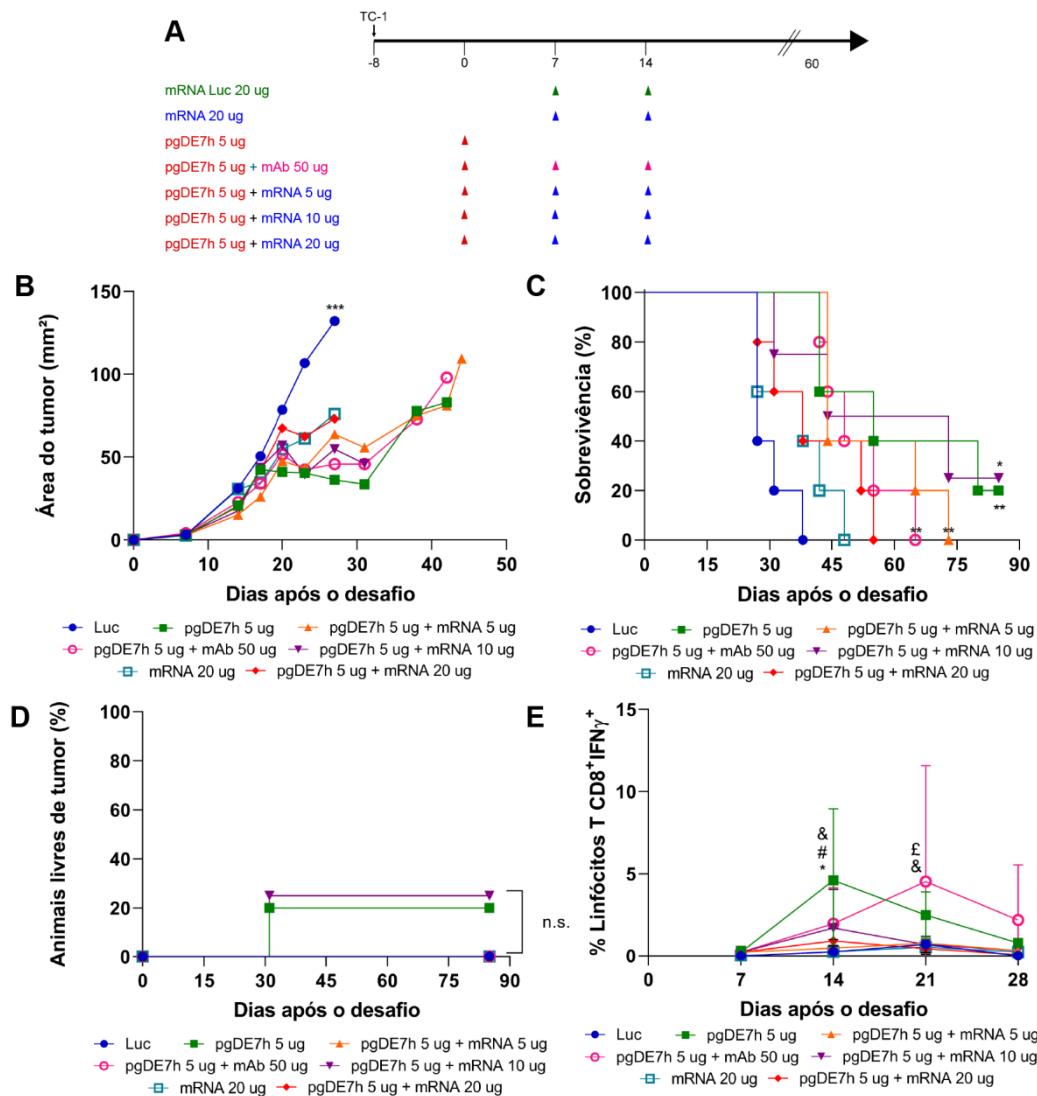


Figura 9. Ensaio de proteção terapêutica em camundongos C57BL/6 desafiados com células TC-1 imunizados com 5 μg vacina pgDE7h em associação com o mRNA-LNP codificante para anti-CTLA-4 em três diferentes doses. (A) Quando o tumor atingiu cerca de 2 mm de diâmetro, os animais foram imunizados com uma dose única de 5 μg de pgDE7h (i.m. + e.p.), associada ou não a duas doses de 20 μg , 10 μg ou 5 μg de mRNA-LNP anti-CTLA-4 (i.m.), 20 μg de mRNA-LNP luciferase, ou 50 μg de mAb anti-CTLA-4 (i.p.), 7 e 14 dias após a imunização com pgDE7h. **(B)** Acompanhamento da área tumoral ao longo do tempo (two-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni). **(C)** Acompanhamento da sobrevida dos animais por 85 dias (log-rank, pós-teste de Mantel-Cox). **(D)** Porcentagem de animais livres de tumor ao longo de 85 dias (log-rank, pós-teste de Mantel-Cox). **(E)** Porcentagem de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos produtores de IFN- γ mensurados 7, 14, 21 e 28 dias após a primeira dose de 5 μg pgDE7h, estimulados *in vitro* com peptídeo MHC classe I restrito derivado de E7. (*) vs Luc, (#) vs pgDE7h 5 μg + mRNA 5 μg , (&) vs mRNA 20 μg , (£) vs pgDE7h 5 μg + mRNA 20 μg . (n=5; pgDE7h 5 μg + mRNA 5 μg n=4). (n.s.) diferença estatística não significativa. (*) p < 0,05; (**) p < 0,01; (***) p < 0,001.

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho propôs explorar novas formas de aumentar a eficácia terapêutica de uma vacina de DNA contra tumores associados ao HPV-16. Contudo, o conjunto de dados obtidos durante a pesquisa demonstra que não houve benefício significativo a partir da combinação da vacina pgDE7h e o mRNA-LNP anti-CTLA-4, independente da dose de ambas as formulações e o tempo de administração. Foi possível observar que a coadministração do mRNA-LNP anti-CTLA-4 e a vacina pgDE7h está associada à piora de alguns parâmetros avaliados, como as porcentagens de proteção antitumoral, sobrevida e frequência de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos produtores de IFN-γ no sangue periférico. Embora os resultados não demonstrem efeitos sinérgicos entre os dois tratamentos, eles devem ser interpretados à luz do modelo experimental empregado e, sobretudo, da condição terapêutica testada (combinação com uma vacina de DNA específica).

Os estudos realizados utilizando o modelo tumoral de implante subcutâneo de células TC-1 em camundongos C57BL/6 e imunoterapia baseada no bloqueio de CTLA-4 com anticorpos monoclonais apresentam resultados variados. Nossa grupo havia verificado anteriormente que a coadministração do mAb anti-CTLA-4 por via intraperitoneal junto da vacina pgDE7h por via intramuscular seguida de eletroporação era capaz de aumentar a proteção antitumoral e a sobrevida dos animais (Sales, 2021). Além disso, um trabalho anterior ao nosso foi demonstrado que a administração sistêmica do mAb anti-CTLA-4 por via intraperitoneal (100 µg a cada dois dias), mesmo sem o uso de uma vacina específica contra as células TC-1, foi capaz de retardar o desenvolvimento tumoral nesse mesmo modelo experimental (Persson *et al.*, 2011). Entretanto, outro estudo constatou que a utilização de repetidas doses do mAb anti-CTLA-4 (150 µg), administradas por via intraperitoneal, não afetou o desenvolvimento do tumor e ainda ocasionou respostas autoimunes no fígado dos animais. Esses autores observaram um efeito antitumoral quando a expressão constitutiva do mAb anti-CTLA-4 foi feita diretamente nas células TC-1, o que também reduziu as respostas autoimunes (Tuve *et al.*, 2007). Esses dados em conjunto demonstram que, ainda que seja utilizado o mesmo modelo experimental, os resultados obtidos com a imunoterapia baseada no uso do mAb anti-CTLA-4 são variáveis e altamente dependentes do protocolo de administração adotado.

Levando essas informações em consideração, passamos a formular hipóteses para explicar os fenômenos observados no atual trabalho. A primeira levantada foi relacionada à capacidade de transfecção e tradução do mRNA-LNP. No entanto, após transfecção as células

HEK 293T e analisar o sobrenadante por *dot blot*, observamos que, de fato, o mAb anti-CTLA-4 foi sintetizado e expresso nas células eucarióticas a partir do mRNA. Embora não tivéssemos meios disponíveis para verificar se o mesmo fenômeno ocorria *in vivo*, essa evidência enfraqueceu a hipótese inicial. É importante destacar também que houve várias tentativas de realizar um *western blot* para melhor caracterizar o mAb produzido *in vitro*, porém não conseguimos visualizá-lo por meio dessa técnica. Isso provavelmente se deve a dois fatores: a baixa concentração de mAb no sobrenadante e a alta quantidade de outras proteínas presentes no meio de cultura suplementado com SFB, o que dificulta a detecção.

Essa observação nos leva a outra possível explicação para a falta de efeitos antitumorais do mRNA-LNP codificante para anti-CTLA4. Embora a transfecção e a tradução ocorram *in vitro*, a expressão do mAb específico ainda é baixa, e esse fenômeno também pode ter ocorrido *in vivo*. Consequentemente, a ação do mAb anti-CTLA-4 em sítios sistêmicos envolvidos na ativação das respostas imunológicas necessárias ao controle do crescimento tumoral também poderia estar reduzida. Entretanto, quando administrados de forma sistêmica o mAb anti-CTLA-4 purificado, também não notamos nenhum efeito sinérgico com a vacina pgDE7h, o que nos levou a inferir que possivelmente a falta de efeito anti-tumoral não esteja relacionado com o nível de expressão do mRNA *in vivo*.

As demais hipóteses que surgiram estão relacionadas com outros parâmetros que não puderam ser avaliados diante das técnicas disponíveis, como a capacidade do mAb ser transportado até o tumor por meio da corrente sanguínea, a influência da vascularização do tumor nesse processo, as diferenças entre os efeitos sistêmico e local da terapia de bloqueio de CTLA-4 e até mesmo o tipo de interação que ocorre entre o mAb anti-CTLA-4 codificado pelo mRNA e a molécula de CTLA-4 nos camundongos, uma vez que todos esses fatores influenciam no sucesso de terapias anticâncer (Bagchi *et al.*, 2021; Jain, 2003).

Anticorpos podem atuar como agonistas ou antagonistas de receptores celulares, característica influenciada por fatores relacionados à estrutura proteica, como seu epítopo-alvo, afinidade e até mesmo o domínio do fragmento cristalizável do anticorpo (Fc) (Mayes *et al.*, 2018). Visto que desconhecemos a estrutura do mAb codificado pelo mRNA, assim como não realizamos nenhum tipo de caracterização molecular dele, desconhecemos se, de fato, o mAb anti-CTLA-4 desempenha a função teórica e esperada de antagonista de CTLA-4. Estudos demonstraram que, além das funções inibitórias extracelulares do CTLA-4, isto é, a competição com o CD28 pelos ligantes CD80 e CD86, essa molécula é capaz de ativar vias de sinalização inibitórias intracelulares também, pela indução de ubiquitina-ligases e inibição da tradução proteica, as quais reduzem a expressão de citocinas, como o próprio IFN- γ , e

impactam negativamente a ativação e diferenciação dos linfócitos T (Hoff *et al.*, 2010; Lingel *et al.*, 2017).

Essas informações vão ao encontro dos nossos dados a respeito da frequência de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos produtores de IFN-γ, que se apresentou reduzida quando houve administração do mRNA-LNP anti-CTLA-4. No entanto, não temos dados suficientes para fazer essa afirmação, apenas indícios apontando para a hipótese de que o mAb anti-CTLA-4 codificado pelo mRNA pode desempenhar uma função de agonista de CTLA-4, em vez de antagonista como esperado, e impactar negativamente a ativação de linfócitos T CD8⁺. Isso explicaria, consequentemente, o porquê da piora em relação ao controle do desenvolvimento tumoral e a redução das porcentagens de proteção antitumoral e sobrevivência dos animais observados nesse trabalho. As hipóteses para explicar os resultados obtidos são diversas, tendo sido relatado que até mesmo a composição da microbiota intestinal de camundongos pode influenciar a eficácia da imunoterapia de bloqueio de CTLA-4 (Vétizou *et al.*, 2015). Logo, tendo em vista a complexidade de fatores envolvidos, não podemos acatar ou rejeitar qualquer hipótese para a explicação dos efeitos observados sem a realização de experimentos adicionais.

Outro objetivo importante desse trabalho foi comparar os efeitos obtidos a partir da administração do mRNA-LNP anti-CTLA-4 ou do mAb anti-CTLA-4 diretamente na sua forma proteica. Contudo, visto que, após diversas tentativas e alterações nos regimes vacinais, não observamos nenhum efeito sinérgico entre a vacina de DNA e o mRNA-LNP, decidimos incluir apenas um grupo experimental tratado com o mAb anti-CTLA-4 para fins comparativos. O que observamos a partir desse experimento foi que os parâmetros analisados, como sobrevivência, proteção antitumoral e controle do crescimento tumoral, foram semelhantes aos observados com os animais que receberam o mRNA-LNP. Porém, a frequência de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos produtores de IFN-γ apresentou um pico mais tardio em relação aos dos demais grupos vacinados: 21 dias contra 14 dias após a vacina para os animais tratados com o mRNA e com o mAb purificado, respectivamente. Esse fato pode estar relacionado com as características farmacocinéticas das duas formulações. Enquanto o mAb em sua forma proteica está pronto para desempenhar sua ação biológica, o mRNA precisa ser transfetado e traduzido para dar origem à proteína, o que gera diferenças no momento de ação dessas formulações *in vivo*, embora sejam administradas simultaneamente. Outro fator a ser levado em consideração foi a quantidade de proteína sintetizada *in vivo* a partir de uma dose definida de mRNA-LNP. Não tivemos condições de aferir quanto uma dose de 20 µg, 10 µg ou 5 µg de mRNA-LNP anti-CTLA-4 geraria de mAb na forma proteica

no organismo do animal, e se as concentrações atingidas seriam, de fato, comparáveis à dose de 50 µg do mAb anti-CTLA-4 utilizada no experimento.

Portanto, é notável que o estabelecimento de comparações entre as duas plataformas de entrega do mAb anti-CTLA-4 *in vivo* se torna difícil, visto a complexidade dos efeitos e múltiplas variáveis envolvidas . Logo, além dos ensaios de proteção antitumoral terapêutica, seria necessário estudar experimentalmente as propriedades farmacocinéticas dessas formulações de modo a estabelecer um regime vacinal mais adequado e definir comparações mais equivalentes entre as plataformas. Ademais, embora tenhamos levantado diversas hipóteses acerca dos resultados obtidos no trabalho apresentado, pouco pode-se afirmar a respeito delas, uma vez que não possuímos dados experimentais. O que de fato afirmamos é que, no modelo experimental utilizado, não encontramos as condições necessárias para detectar efeitos antitumorais sinérgicos a partir da combinação da vacina de DNA pgDE7h e o mRNA-LNP anti-CTLA-4.

6. CONCLUSÃO

A partir dos dados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir que:

- A associação entre a vacina pgDE7h e o mRNA-LNP codificante para o mAb anti-CTLA-4, quando administrado pela via intramuscular, não aumentou a proteção antitumoral terapêutica induzida pela vacina de forma significativa. Em alguns experimentos, observou-se inclusive um impacto negativo nos parâmetros avaliados, como controle do desenvolvimento tumoral, taxa de sobrevivência e quantidade de animais livres de tumor;
- A administração do mRNA-LNP codificante para o mAb anti-CTLA-4 resultou em baixos níveis de expressão, detectáveis em células transfetadas mantidas em cultura, o que poderia afetar a indução de efeitos imunológicos *in vivo*;
- Diferentes metodologias devem ser testadas para avaliar a relação entre a administração do mRNA-LNP anti-CTLA-4 e a diminuição da proteção antitumoral ou se ainda se, de fato, seria possível obter algum benefício terapêutico a partir dessa associação imunoterapêutica por meio de outras abordagens experimentais;
- Mesmo com a administração do mAb anti-CTLA-4 purificado não foi possível detectar um efeito antitumoral sinérgico com a vacina pgDE7h, sugerindo a indução de vias imunológicas que não se beneficiam do bloqueio de CTLA-4 nas células do sistema imune.

REFERÊNCIAS

- ALAMEH, M. G. *et al.* Lipid nanoparticles enhance the efficacy of mRNA and protein subunit vaccines by inducing robust T follicular helper cell and humoral responses. **Immunity**, [S. l.], v. 54, n. 12, p. 2877- 2892.e7, 2021. Disponível em: <http://www.doi.org/10.1016/j.immuni.2021.11.001>. Acesso em: 9 mar. 2022.
- BAGCHI, S; YUAN, R.; ENGLEMAN, E. G. Immune Checkpoint Inhibitors for the Treatment of Cancer: Clinical Impact and Mechanisms of Response and Resistance. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 223–249, 2021. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-pathol-042020-042741>. Acesso em: 19 jun. 2022.
- BOYER, S. N.; WAZER, D. E.; BAND, V. E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. **Cancer research**, [S. l.], v. 56, n. 20, p. 4620–4, 1996. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8840974>.
- BRUNI, L. *et al.*, Human Papillomavirus and Related Diseases in the World. Summary Report 17 June 2019. **ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre)**. Disponível em: <https://hpvcentre.net/statistics/reports/XWX.pdf>. Acesso em: 26 abr. 2021.
- BURD, E. M. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. **Clinical Microbiology Reviews**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 1, 2003. Disponível em: <http://www.doi.org/10.1128/CMR.16.1.1-17.2003>. Acesso em: 24 maio. 2022.
- BURK, R. D. *et al.* Integrated genomic and molecular characterization of cervical cancer. **Nature**, [S. l.], v. 543, n. 7645, p. 378–384, 2017. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature21386>. Acesso em: 23 mai. 2022.
- BZHALAVA, D.; EKLUND, C.; DILLNER, J. International standardization and classification of human papillomavirus types. **Virology**, [S. l.], v. 476, p. 341–344, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25577151/>. Acesso em: 26 abr. 2021.
- CHEN, Daniel S.; MELLMAN, Ira. Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. **Immunity**, [S. l.], v. 39, n. 1, p. 1–10, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23890059/>. Acesso em: 26 abr. 2021.
- CULLIS, P. R.; HOPE, M. J. Lipid Nanoparticle Systems for Enabling Gene Therapies. **Molecular Therapy**, [S. l.], v. 25, n. 7, p. 1467–1475, 2017. Disponível em: <http://www.cell.com/article/S1525001617301119/fulltext>. Acesso em: 30 mai. 2022.
- DANOS, O.; KATINKA, M.; YANIV, M. Human papillomavirus 1a complete DNA sequence: a novel type of genome organization among papovaviridae. **The EMBO Journal**, [S. l.], v. 1, n. 2, p. 231, 1982. Disponível em: <http://www.doi.org/10.1002/J.1460-2075.1982.TB01152.X>. Acesso em: 24 mai. 2022.
- DINIZ, M. O *et al.* 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**, [S. l.], v. 17, n. 10, p. 1576–1583, 2010. Disponível em: <http://www.doi.org/10.1128/CVI.00264-10>. Acesso em: 26 abr. 2021.

DINIZ, M. O. *et al.* Enhanced Therapeutic Effects Conferred by an Experimental DNA Vaccine Targeting Human Papillomavirus-Induced Tumors. **Human Gene Therapy**, [S. l.], v. 24, n. 10, p. 861–870, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24007495/>. Acesso em: 26 abr. 2021.

DORTA-ESTREMERA, S. *et al.* Targeting interferon signaling and CTLA-4 enhance the therapeutic efficacy of anti-PD-1 immunotherapy in preclinical model of HPV+ oral cancer. **Journal for Immunotherapy of Cancer**, [S. l.], v. 7, n. 1, 2019. Disponível em: <http://www.doi.org/10.1186/S40425-019-0728-4>. Acesso em: 31 mai. 2022.

DYSON, N *et al.* The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. **Science**, [S. l.], v. 243, n. 4893, p. 934–937, 1989. Disponível em: <http://www.doi.org/10.1126/science.2537532>. Acesso em: 26 abr. 2021.

FELLNER, C. Ipilimumab (Yervoy) prolongs survival in advanced melanoma: Serious side effects and a hefty price tag may limit its use. **P and T**, [S. l.], v. 37, n. 9, p. 503–30, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3462607/pdf/ptj3709503.pdf/>. Acesso em: 26 abr. 2021.

GRAHAM, S. V. The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review. **Clinical Science**, [S. l.], v. 131, n. 17, p. 2201–2221, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28798073/>. Acesso em: 26 abr. 2021.

GREEN, D. R.; KROEMER, G. Cytoplasmic Functions of the Tumor Suppressor p53. **Nature**, [S. l.], v. 458, n. 7242, p. 1127, 2009. Disponível em: <http://www.doi.org/10.1038/NATURE07986>. Acesso em: 30 mai. 2022.

HANCOCK, G.; HELLNER, K.; DORRELL, L. Therapeutic HPV vaccines. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, [S. l.], v. 47, p. 59–72, 2018. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1521693417301414>. Acesso em: 28 abr. 2021.

HILDESHEIM, A. *et al.* Impact of human papillomavirus (HPV) 16 and 18 vaccination on prevalent infections and rates of cervical lesions after excisional treatment. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, [S. l.], v. 215, n. 2, p. 212.e1–212.e15, 2016. Disponível em: [http://www.doi.org/10.1016/j.ajog.2016.02.021/](http://www.doi.org/10.1016/j.ajog.2016.02.021). Acesso em: 28 abr. 2021.

HILDESHEIM, A. *et al.* Effect of Human Papillomavirus 16/18 L1 Viruslike Particle Vaccine Among Young Women With Preexisting Infection. **JAMA**, [S. l.], v. 298, n. 7, p. 743, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17699008/>. Acesso em: 28 abr. 2021.

HODI, F. S. *et al.* Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. **The New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 363, n. 8, p. 711, 2010. Disponível em: [http://www.doi.org/10.1056/NEJMoa1003466/](http://www.doi.org/10.1056/NEJMoa1003466). Acesso em: 31 mai. 2022.

HOFF, H. *et al.* CTLA-4 (CD152) inhibits T cell function by activating the ubiquitin ligase Itch. **Molecular Immunology**, [S. l.], v. 47, n. 10, p. 1875–1881, 2010. Disponível em: <http://www.doi.org/10.1016/J.MOLIMM.2010.03.017>. Acesso em: 01 jun. 2022.

HONG, A. M. *et al.* Human papillomavirus predicts outcome in oropharyngeal cancer in patients treated primarily with surgery or radiation therapy. **British Journal of Cancer**, [S. l.], v. 103, n. 10, p. 1510–1517, 2010. Disponível em: <http://www.doi.org/10.1038/sj.bjc.6605944>. Acesso em: 26 abr. 2021.

HU, Z.; MA, D. The precision prevention and therapy of HPV-related cervical cancer: new concepts and clinical implications. **Cancer Medicine**, [S. l.], v. 7, n. 10, p. 5217–5236, 2018. Disponível em: <http://www.doi.org/10.1002/cam4.1501>. Acesso em: 26 abr. 2021.

HUANG, C. F. *et al.* DNA vaccines for cervical cancer. **American Journal of Translational Research**, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 75–87, 2010. Disponível em: www.ajtr.org/AJTR912004. Acesso em: 26 abr. 2021.

HUNG, C. F. *et al.* Therapeutic human papillomavirus vaccines: current clinical trials and future directions. **Expert Opinion on Biological Therapy**, [S. l.], v. 8, n. 4, p. 421–439, 2008. Disponível em: <http://www.doi.org/10.1517/14712598.8.4.421>. Acesso em: 28 abr. 2021.

JAIN, R. K. Molecular regulation of vessel maturation. **Nature Medicine**, [S. l.], v. 9, n. 6, p. 685–693, 2003. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nm0603-685>. Acesso em: 19 jun. 2022.

JANICEK, M. F.; AVERETTE, H. E. Cervical Cancer: Prevention, Diagnosis, and Therapeutics. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [S. l.], v. 51, n. 2, p. 92–114, 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11577486/>. Acesso em: 26 abr. 2021.

JENNINGS, K. How Much Will A Covid-19 Vaccine Cost?. **Forbes**. Disponível em: <https://www.forbes.com/sites/katiejennings/2020/11/17/how-much-will-a-covid-19-vaccine-cost/?sh=6ff1736576de>. Acesso em: 13 mai. 2021.

KARIKÓ, K. *et al.* Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability. **Molecular Therapy**, [S. l.], v. 16, n. 11, p. 1833–1840, 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18797453/>. Acesso em: 29 abr. 2021.

KLINGELHUTZ, A. J.; ROMAN, A. Cellular transformation by human papillomaviruses: Lessons learned by comparing high- and low-risk viruses. **Virology**, [S. l.], v. 424, n. 2, p. 77–98, 2009. Disponível em: <http://www.doi.org/10.1016/j.virol.2011.12.018>. Acesso em: 26 abr. 2021.

LASARO, M. O. *et al.* Anti-tumor DNA vaccines based on the expression of human papillomavirus-16 E6/E7 oncoproteins genetically fused with the glycoprotein D from herpes simplex virus-1. **Microbes and Infection**, [S. l.], v. 7, n. 15, p. 1541–1550, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16213178/>. Acesso em: 26 abr. 2021.

LEDFORD, H. Melanoma drug wins US approval. **Nature**, [S. l.], v. 471, n. 7340, p. 561–561, 2011. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/471561a>.

LEE, S. J. *et al.* Immunotherapy for human papillomavirus-associated disease and cervical cancer: Review of clinical and translational research. **Journal of Gynecologic Oncology**, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4944018/>. Acesso em: 26 abr. 2021.

LIN, K. Y. *et al.* Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. **Cancer research**, [S. l.], v. 56, n. 1, p. 21–26, 1996. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8548765>. Acesso em: 11 maio. 2021.

LINGEL, H. *et al.* CTLA-4-mediated posttranslational modifications direct cytotoxic T-lymphocyte differentiation. **Cell Death & Differentiation** 2017 24:10, [S. l.], v. 24, n. 10, p. 1739–1749, 2017. DOI: 10.1038/cdd.2017.102. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/cdd2017102>. Acesso em: 01 jun. 2022.

LINSLEY, P. S. *et al.* Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. **Immunity**, [S. l.], v. 1, n. 9, p. 793–801, 1994. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7534620/>. Acesso em: 31 maio. 2022.

MA, B. *et al.* Emerging human papillomavirus vaccines. **Expert Opinion on Emerging Drugs**. NIH Public Access, 2012. Disponível em: www.doi.org/10.1517/14728214.2012.744393/. Acesso em: 28 abr. 2021.

MARIN-ACEVEDO, J. A.; KIMBROUGH, E. M. O.; LOU, Y. Next generation of immune checkpoint inhibitors and beyond. **Journal of Hematology and Oncology**. BioMed Central Ltd, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01056-8>. Acesso em: 26 abr. 2021.

MAYES, P. A.; HANCE, K. W.; HOOS, A. The promise and challenges of immune agonist antibody development in cancer. **Nature Publishing Group**, [S. l.], v. 17, 2018. Disponível em: <http://www.doi.org/10.1038/nrd.2018.75>. Acesso em: 1 jun. 2022.

MCLAUGHLIN-DRUBIN, M. E.; MÜNGER, K. Oncogenic activities of human papillomaviruses. **Virus Research**, NIH Public Access, 2009. Disponível em: [http://www.doi.org/10.1016/j.virusres.2009.06.008/](http://www.doi.org/10.1016/j.virusres.2009.06.008). Acesso em: 26 abr. 2021.

MOSCICKI, A. B. *et al.* The natural history of human papillomavirus infection as measured by repeated DNA testing in adolescent and young women. **The Journal of Pediatrics**, [S. l.], v. 132, n. 2, p. 277–284, 1998. Disponível em: [http://www.doi.org/10.1016/S0022-3476\(98\)70445-7](http://www.doi.org/10.1016/S0022-3476(98)70445-7). Acesso em: 25 mai. 2022.

NGUYEN, N. P. *et al.* Combined chemotherapy and radiation therapy for head and neck malignancies: Quality of life issues. **Cancer**, [S. l.], v. 94, n. 4, p. 1131–1141, 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11920484/>. Acesso em: 26 abr. 2021.

OBERLI, M. A. *et al.* Lipid Nanoparticle Assisted mRNA Delivery for Potent Cancer Immunotherapy. **Nano Letters**, v. 17, n. 3, p. 1326–1335, 2017. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.nanolett.6b03329>. Acesso em 26 abr. 2021.

PAL, A.; KUNDU, R. Human Papillomavirus E6 and E7: The Cervical Cancer Hallmarks and Targets for Therapy. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 10, p. 3116, 2020. Disponível em: <http://www.doi.org/10.3389/fmicb.2019.03116>. Acesso em: 23 maio. 2022.

PARDOLL, Drew M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. **Nature Reviews Cancer**, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22437870/>. Acesso em: 26 abr. 2021.

PARDI, N. *et al.* mRNA vaccines-a new era in vaccinology. **Nature Reviews Drug Discovery**. Nature Publishing Group, 2018. Disponível em: www.nature.com/nrd.2017.243 Acesso em: 26 abr. 2021.

PERALTA-ZARAGOZA, O. *et al.* Targeted treatments for cervical cancer: a review. **Oncotargets and Therapy**, Dove Press, 2012. Disponível em: <http://www.doi.org/10.2147/OTT.S25123>. Acesso em: 26 abr. 2021.

PERSSON, J. *et al.* Immuno-Therapy with Anti-CTLA4 Antibodies in Tolerized and Non-Tolerized Mouse Tumor Models. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 6, n. 7, p. 22303, 2011. Disponível em: <http://www.doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0022303>. Acesso em: 20 jun. 2022.

POLACK, Fernando P. *et al.* Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 383, n. 27, p. 2603–2615, 2020. <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmoa2034577>. Acesso em: 9 mar. 2022.

SAHIN, U.; KARIKÓ, K.; TÜRECI, Ö. mRNA-based therapeutics-developing a new class of drugs, **Nature Reviews Drug Discovery**, Nature Publishing Group, 2014. Disponível em: <http://www.doi.org/10.1038/nrd4278>. Acesso em: 29 abr. 2021.

SALES, N. S. **Controle de tumores induzidos por HPV por imunoterapia baseada na associação de anticorpos monoclonais de bloqueio de vias imunossupressoras a uma vacina terapêutica capaz de ativar linfócitos T CD8+ citotóxicos**. 2021. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

SALES, N. S. *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**, [S. l.], v. 35, n. 52, p. 7240–7249, 2017. Disponível em: <http://www.doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.11.011>. Acesso em: 26 abr. 2021.

SAUNDERS, K. O. *et al.* Lipid nanoparticle encapsulated nucleoside-modified mRNA vaccines elicit polyfunctional HIV-1 antibodies comparable to proteins in nonhuman primates. **npj Vaccines**, [S. l.], v. 6, n. 1, 2021. Disponível em: <http://www.doi.org/10.1038/s41541-021-00307-6>. Acesso em: 9 mar. 2022.

- SCHEFFNER, M. *et al.* The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. **Cell**, [S. l.], v. 63, n. 6, p. 1129–1136, 1990. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2175676/>. Acesso em: 26 abr. 2021.
- SCHILLER, John T.; LOWY, Douglas R. Understanding and learning from the success of prophylactic human papillomavirus vaccines. **Nature Reviews Microbiology**, [S. l.], v. 10, n. 10, p. 681–692, 2012. DOI: 10.1038/nrmicro2872. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nrmicro2872>. Acesso em: 25 abr. 2021.
- SEIDEL, Judith A.; OTSUKA, Atsushi; KABASHIMA, Kenji. Anti-PD-1 and Anti-CTLA-4 Therapies in Cancer: Mechanisms of Action, Efficacy, and Limitations. **Frontiers in oncology**, [S. l.], v. 8, n. 86, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29644214/>. Acesso em: 26 abr. 2021.
- STANLEY, M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. **Gynecologic Oncology**, Academic Press Inc., 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20304221/>. Acesso em: 26 abr. 2021.
- SYMER, M. M.; YEO, H. L. Recent advances in the management of anal cancer, **F1000Research**, F1000 Research Ltd, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30345012/>. Acesso em: 26 abr. 2021.
- TALLON, B. *et al.* Trends in cervical cancer mortality in Brazil in 5 years (2012-2016). **Saúde em Debate**, [S. l.], v. 44, n. 125, p. 362–371, 2020. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-11042020000200362&lng=en&nrm=iso&tlang=en. Acesso em: 26 abr. 2021.
- TUVE, S. *et al.* Combination of Tumor Site–Located CTL-Associated Antigen-4 Blockade and Systemic Regulatory T-Cell Depletion Induces Tumor-Destructive Immune Responses. **Cancer Research**, [S. l.], v. 67, n. 12, p. 5929–5939, 2007. Disponível em: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/67/12/5929/533155/Combination-of-Tumor-Site-Located-CTL-Associated>. Acesso em: 20 jun. 2022.
- VAN DOORSLAER, K. *et al.* The Papillomavirus Episteme: a central resource for papillomavirus sequence data and analysis. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 41, n. D1, p. D571–D578, 2012. Disponível em: www.doi.org/10.1093/nar/gks984. Acesso em: 29 abr. 2021.
- VAN HOECKE, L.; ROOSE, K. How mRNA therapeutics are entering the monoclonal antibody field, **Journal of Translational Medicine**, BioMed Central Ltd., 2019. Disponível em: <https://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12967-019-1804-8>. Acesso em: 26 abr. 2021.
- VÉTIZOU, M. *et al.* Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota. **Science**, [S. l.], v. 350, n. 6264, p. 1079–1084, 2015. Disponível em: <http://www.doi.org/10.1126/SCIENCE.AAD1329>. Acesso em: 20 jun. 2022.
- WALBOOMERS, J. M. M. *et al.* Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **Journal of Pathology**, [S. l.], v. 189, n. 1, p. 12–19, 1999. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10451482/>. Acesso em: 26 abr. 2021.

WEI, Spencer C.; DUFFY, Colm R.; ALLISON, James P. Fundamental mechanisms of immune checkpoint blockade therapy. **Cancer Discovery**, American Association for Cancer Research Inc., 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30115704/>. Acesso em: 29 abr. 2021.

WINER, R. L.; KOUTSKY, L. A. The Epidemiology of Human Papillomavirus Infections. *[S. l.]*, p. 143–187, 2004. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/1-4020-2016-3_6. Acesso em: 23 mai. 2022.

ZHAI, L.; TUMBAN, E. Gardasil-9: A global survey of projected efficacy. **Antiviral Research**, *[S. l.]*, v. 130, p. 101–109, 2016. Disponível em: <http://www.doi.org/10.1016/J.ANTIVIRAL.2016.03.016>. Acesso em: 25 mai. 2022.

ZUR HAUSEN, H. Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer, **Virology**, Virology , 1991. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1651607/>. Acesso em: 26 abr. 2021.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nature Reviews Cancer**, *[S. l.]*, v. 2, n. 5, p. 342–350, 2002. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nrc798>. Acesso em: 27 abr. 2021.

ANEXO A - CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



**Instituto
de Ciências
Biomédicas**
Excelência em Ensino e Pesquisa

**Universidade de São Paulo
Comissão de Ética no
Uso de Animais**

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Caracterização do efeito antitumoral da combinação do mRNA codificante para anti-CTLA-4 com uma vacina de DNA específica para tumores associados ao HPV-16", protocolada sob o CEUA nº 9918190521, sob a responsabilidade de **Luis Carlos de Souza Ferreira** e equipe; *Guilherme Formoso Pelegrin; Jamile Ramos da Silva* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 23/07/2021.

We certify that the proposal "Characterization of the antitumor effect from the combination of anti-CTLA-4 coding mRNA with a specific DNA vaccine for tumors associated with HPV-16", utilizing 495 Isogenics mice (495 females), protocol number CEUA 9918190521, under the responsibility of **Luis Carlos de Souza Ferreira** and team; *Guilherme Formoso Pelegrin; Jamile Ramos da Silva* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 07/23/2021.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: **12 meses**

Depto/Setor: **Microbiologia**

Origem: **Biotério Central FMUSP**

sexo: **Fêmeas**

Idade ou peso: **7 a 9 semanas**

Espécie: **Camundongos isogênicos**

Linhagem: **C57BL/6**

N amostral: **495**

São Paulo, 04 de março de 2022

Profa. Dra. Luciane Valéria Sita

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)



Prof. Dr. Francemilson Goulart da Silva

Vice-Cordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

ANEXO B – COLABORAÇÃO EM ARTIGO CIENTÍFICO

Silva J. R., Rodrigues, K. B., **Pelegrin, G. F.**, Sales N. S., Muramatsu H., Silva M. O., Porchia B. F. M. M., Moreno A. C. R., Aps L. R. M. M., Venceslau-Carvalho A. A., Tombácz I., Fotoran W. L., Karikó K., Lin P. J. C., Tam Y. K., Diniz M. O., Pardi N. & Ferreira L. C. S., Comparative evaluation of self-amplifying and non-replicating mRNA-LNP vaccine platforms in an HPV-associated mouse tumor model. Submetido para Science Translational Medicine (em revisão).