



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

MYLENNA MÁYRA GOIS DE SOUSA

**EMPREGO DE CÉLULAS THP-1 COMO MODELO *IN VITRO* PARA AVALIAÇÃO
DE VACINAS DE DNA**

Recife
2024

MYLENNÁ MÁYRA GOIS DE SOUSA

**EMPREGO DE CÉLULAS THP-1 COMO MODELO *IN VITRO* PARA AVALIAÇÃO
DE VACINAS DE DNA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Microbiologia, Bioprocessos e Bioprodutos.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas

Coorientadora: Prof. Dra. Anna Jéssica Duarte Silva

Recife

2024

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Sousa, Mylenna Mayra Gois de.

Emprego de células THP-1 como modelo in vitro para avaliação de vacinas de DNA / Mylenna Mayra Gois de Sousa. - Recife, 2024. 70p.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências - CB, Programa de Pós graduação em Biotecnologia.

Orientação: Antonio Carlos de Freitas.

Coorientação: Anna Jéssica Duarte Silva.

Inclui Referências.

1. Células THP-1; 2. Vacina de DNA; 3. Oncoproteína E6; 4. Modelo in vitro; 5. Macrófagos. I. Freitas, Antonio Carlos de - Orientador. II. Silva, Anna Jéssica Duarte - Coorientadora. III. Título.

UFPE-Biblioteca Central

CDD 660.6

MYLENNA MÁYRA GOIS DE SOUSA

**EMPREGO DE CÉLULAS THP-1 COMO MODELO *IN VITRO* PARA AVALIAÇÃO
DE VACINAS DE DNA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Biociências, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Microbiologia, Bioprocessos e Bioprodutos.

Aprovado em: 26/07/2024

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Anyonio Carlos de Freitas (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. Fabrício Motteran (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. Pedro Luiz de França Neto (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter sido meu sustento e minha força em toda minha trajetória.

A minha mãe, que sempre me apoiou e incentivou em todas as fases da minha vida.

Ao meu orientador Prof. Antonio Carlos, por todo o suporte e por ter me dado a oportunidade de participar do LEMTE, onde pude crescer e evoluir como pesquisadora.

A minha co-orientadora Anna Jéssica, que é uma inspiração profissional para mim e por todo suporte que me foi dado durante esses 2 anos de mestrado.

A Lígia, minha ex co-orientadora, por todos os ensinamentos que fizeram parte da minha construção como profissional até hoje e por todo conhecimento compartilhado para a realização deste trabalho.

Aos colegas de laboratório, que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão do meu trabalho, por dividerem comigo seus conhecimentos e pela alegria e momentos de descontração no laboratório.

A minha amiga e parceira de estudos, Karolini, que sempre esteve ao meu lado em momentos de frustração, insegurança e desânimo. Obrigada amiga, por toda ajuda, palavras de incentivo e por me acolher sempre que eu precisei.

Aos meus amigos da vida, por me apoiarem e me entenderem quando eu não podia estar presente, devido as demandas acadêmicas. Por toda a força emanada de longe para o meu sucesso e por sempre torcerem por mim.

Ao meu namorado, Jobson, de quem por muitas vezes precisei estar ausente para me dedicar aos estudos, por apoiar pacientemente minha trajetória acadêmica, pelo incentivo e suporte.

A FACEPE pelo apoio financeiro.

RESUMO

Os modelos *in vitro* desempenham um papel crucial na avaliação preliminar de vacinas, destacando-se as células THP-1 pela sua capacidade de replicar características do sistema imunológico humano. As células THP-1, uma linhagem de promonócitos humanos, são amplamente utilizadas em estudos de imunologia por se diferenciarem em macrófagos funcionais, essenciais para estudar mecanismos de apresentação de antígenos e respostas imunológicas. A biotecnologia tem sido fundamental no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, com vacinas de DNA se destacando por induzirem respostas imunológicas robustas e serem de fácil produção e armazenamento. Contudo, a avaliação eficaz dessas vacinas é desafiadora, necessitando de modelos *in vitro* que mimetizem com precisão as interações imunológicas humanas. As células THP-1 é um modelo versátil e relevante para essa análise, facilitando a compreensão dos mecanismos de ação das vacinas de DNA e a identificação de marcadores de eficácia imunológica. A oncoproteína E6 do HPV-16 é o antígeno vacinal estudado, considerado um alvo interessante na imunoterapia do câncer cervical devido à sua expressão em lesões pré-malignas e invasivas. O estudo investiga o uso das células THP-1 como modelo *in vitro* para avaliar vacinas de DNA, focando no antígeno E6multi derivado do HPV-16. Neste sentido, foi feita a análise da viabilidade do antígeno, padronização da diferenciação das células THP-1 em macrófagos funcionais com PMA, verificação da eficácia da transfecção desses macrófagos com o DNA plasmidial E6multi, e investigação do perfil de polarização dos macrófagos resultantes. Os plasmídeos vacinais foram construídos a partir do gene de interesse, confirmados por PCR e sequenciamento. Células HEK-293T foram usadas para testar a expressão do antígeno vacinal, enquanto THP-1 foram diferenciadas com sucesso em macrófagos polarizados e transfectadas para análise de expressão gênica por RT-qPCR. A expressão gênica analisada por RT-qPCR mostrou amplificação específica do E6multi. A eficiência de transfecção das células diferenciadas com pVAX1-E6multi foi confirmada, destacando a expressão de marcadores de superfície CD68, CD80 e CD86, característicos de macrófagos ativados (M1). Não houve expressão significativa de CD206 (M2). A otimização das condições de diferenciação com PMA (150 nM por 24 horas) e densidade celular (2×10^6 células/poço) foi crucial para maximizar a diferenciação celular. Este estudo demonstra a viabilidade da abordagem de vacina multiepítipo e a eficácia da transfecção em células THP-1 diferenciadas para investigações futuras sobre imunoterapia contra HPV.

Palavras-chave: Células THP-1. Modelo *in vitro*. Vacina de DNA. Macrófagos. Oncoproteína E6.

ABSTRACT

In vitro models play a crucial role in the preliminary evaluation of vaccines, with THP-1 cells standing out for their ability to replicate characteristics of the human immune system. THP-1 cells, a lineage of human promonocytes, are widely used in immunology studies because they differentiate into functional macrophages, essential for studying mechanisms of antigen presentation and immunological responses. Biotechnology has been fundamental in the development of new therapeutic strategies, with DNA vaccines standing out for inducing robust immune responses and being easy to produce and store. However, effective evaluation of these vaccines is challenging, requiring in vitro models that accurately mimic human immunological interactions. THP-1 cells are a versatile and relevant model for this analysis, facilitating the understanding of the mechanisms of action of DNA vaccines and the identification of markers of immunological efficacy. The HPV-16 E6 oncoprotein is the studied vaccine antigen, considered an interesting target in cervical cancer immunotherapy due to its expression in pre-malignant and invasive lesions. The study investigates the use of THP-1 cells as an in vitro model to evaluate DNA vaccines, focusing on the E6multi antigen derived from HPV-16. In this sense, the viability of the antigen was analyzed, standardization of the differentiation of THP-1 cells into functional macrophages with PMA, verification of the effectiveness of transfection of these macrophages with E6multi plasmid DNA, and investigation of the polarization profile of the resulting macrophages. The vaccine plasmids were constructed from the gene of interest, confirmed by PCR and sequencing. HEK-293T cells were used to test vaccine antigen expression, while THP-1 were successfully differentiated into polarized macrophages and transfected for gene expression analysis by RT-qPCR. Gene expression analyzed by RT-qPCR showed specific amplification of E6multi. The transfection efficiency of cells differentiated with pVAX1-E6multi was confirmed, highlighting the expression of surface markers CD68, CD80 and CD86, characteristic of activated macrophages (M1). There was no significant expression of CD206 (M2). Optimization of differentiation conditions with PMA (150 nM for 24 hours) and cell density (2×10^6 cells/well) was crucial to maximize cell differentiation. This study demonstrates the feasibility of the multiepitope vaccine approach and the efficacy of transfection in differentiated THP-1 cells for future investigations into HPV immunotherapy.

Key words: THP-1 cells. *In vitro* model. DNA vaccine. Macrophages. E6 oncoprotein.

LISTA DE FIGURAS

Figura	1	Fenótipos pró-inflamatório M1 (classicamente ativado) e o anti-inflamatório e M2 (alternativamente ativado) 20
Figura	2	Polarização de células THP-1 em diferentes fenótipos de macrófagos..... 22
Figura	3	O papel das TAMs no apoio ao crescimento do tumor 24
Figura	4	Representação esquemática do genoma do HPV-16 evidenciando os genes de expressão precoce (E), tardia (L) e a região longa de controle (LCR). 26
Figura	5	Alvos moleculares da oncoproteína E6 de alto risco 28
Figura	6	Indução de imunidade celular e humoral após imunização com vacinas de DNA..... 32
Figura	7	Esquema ilustrativo do gene sintético multiepítopo para o antígeno E6 de HPV 16 e sua sequência em pares de bases. 34
Figura	8	Esquema de transfecção das células THP-1 diferenciadas para macrófagos com o DNA plasmidial..... 42
Figura	9	Mapa do plasmídeo pVAX1 contendo o inserto E6multi clonado em orientação BamHI/XbaI. Mapa construído através do programa SnapGene v.4.0.8..... 46
Figura	10	Análise do produto de amplificação por PCR do E6multi e pVAX. 47
Figura	11	Resultado da diferenciação das células THP-1 após 24 horas da indução com PMA..... 49

Figura	12	Resultado da diferenciação das células THP-1 após 48 horas da indução com PMA.	49
Figura	13	Resultado da diferenciação das células THP-1 após 24 horas da indução com PMA	50
Figura	14	Resultado da diferenciação das células THP-1 após 48 horas da indução com PMA	51
Figura	15	Células THP-1 sem adição de PMA.	52
Figura	16	Expressão dos marcadores de superfície de macrófagos.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela	1	Descrição dos epítomos ligantes de MHC-I preditos pela ferramenta IEDB utilizados neste estudo.....	35
Tabela	2	Sequência dos oligonucleotídeos e temperatura de anelamento	44
Tabela	3	Valores dos RNAm do pVAX1-E6multi após 24 horas de transfecção e do controle negativo (pVAX1 vazio).....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APCs	- Células Apresentadoras de Antígeno
DC	- Célula Dendrítica
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DMEM	- Meio Eagle Modificado
dNTPs	- Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
EGF	- Fator de Crescimento Epidermal
FBS	- Soro Bovino Fetal
INCA	- Instituto Nacional do Câncer
HPV	- Papilomavírus Humano
hrHPV	- HPV de alto risco
MHC	- Complexo Principal de Histocompatibilidade
PCR	- Reação em Cadeia da Polimerase
PBS	- Phosphate Buffered Saline
PMA	- Phorbol 12-myristate 13-acetate
qPCR	- PCR em Tempo Real
RPMI	- Roswell Park Memorial Institute Médio
RT-PCR	- Transcriptase Reverse PCR
TAMs	- Macrófagos Associados a Tumores
THP-1	- Linhagem humana de promonócito

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 LINHAGEM CELULAR MONOCÍTICA HUMANA (THP-1) E SUAS APLICAÇÕES.....	16
2.2 MACRÓFAGOS: CARACTERÍSTICAS E FENÓTIPOS.....	19
2.2.1 MACRÓFAGOS E O MICROAMBIENTE TUMORAL.....	22
2.3 O PAPILOMAVÍRUS HUMANO.....	25
2.3.1 ESTRUTURA E ORGANIZAÇÃO DO GENOMA.....	25
2.3.2 A ONCOPROTEÍNA E6.....	28
2.4 VACINA DE DNA COMO ESTRTEGIA TERAPÊUTICA CONTRA O CÂNCER CERVICAL.....	29
3 OBJETIVOS.....	33
3.1 OBJETIVOS GERAIS.....	33
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
4.1 ANTÍGENO VACINAL.....	34
4.2 CONSTRUÇÃO DE PLASMÍDEOS VACINAIS.....	35
4.3 CULTIVO E TRANSFECCÃO DE CÉLULAS HEK – 293T.....	36
4.4 EXTRAÇÃO E ANÁLISE DO RNA TOTAL DAS CÉLULAS TRANSFECTADAS.....	37
4.5 SÍNTESE DE CDNA.....	37

4.6 RT-PCR PARA A VERIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE E6MULTI EM CÉLULAS HEK-293T.....	38
4.7 CULTURA DE CÉLULAS.....	39
4.7.1 DESCONGELAMENTO DAS CÉLULAS.....	39
4.7.2 CULTURA DE CÉLULAS THP-1.....	39
4.7.3 CONGELAMENTO DAS CÉLULAS.....	40
4.8 DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS THP-1 POR PMA.....	40
4.9 PADRONIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS THP-1 UTILIZADAS POR POÇO.....	41
4.10 TRANSFEÇÃO DOS MACRÓFAGOS COM DNA PLASMIDIAL E6MULTI.....	41
4.10.1 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL DAS CÉLULAS DE MACRÓFAGOS TRANSFECTADAS.....	42
4.10.1 SÍNTESE DE CDNA.....	43
4.11 PCR EM TEMPO REAL (RT – qPCR)	43
4.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	45
5 RESULTADOS	46
5.1 OBTENÇÃO DO PLASMÍDEO VACINAL.....	46
5.2 ANÁLISE DA EXTRAÇÃO DO RNA.....	46

5.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE E6MULTI A PARTIR DA RT-PCR.....	47
5.4 ANÁLISE DA DIFERENCIAÇÃO CELULAR INDUZIDA POR PMA.....	48
5.5 PADRONIZAÇÃO DA DENSIDADE DE CÉLULAS THP-1 UTILIZADAS POR POÇO.....	48
5.6 ANÁLISE DA EXTRAÇÃO DO RNA.....	53
5.7 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA.....	54
6. DISCUSSÃO.....	56
7. CONCLUSÕES.....	62
8 REFERÊNCIAS.....	63

1. INTRODUÇÃO

A utilização de modelos *in vitro* desempenha um papel crucial na avaliação preliminar de vacinas, oferecendo *insights* valiosos sobre sua eficácia e segurança antes de testes em organismos vivos mais complexos. Entre esses modelos, as células THP-1 emergem como uma ferramenta promissora devido à sua capacidade de recapitular características chave do sistema imunológico humano.

As células THP-1, uma linhagem de promonócitos humanos, têm sido amplamente utilizadas como modelo para estudos de imunologia devido à sua capacidade de se diferenciar em macrófagos funcionais sob estímulos específicos. Esses macrófagos, por sua vez, são fundamentais no estudo de mecanismos de apresentação de antígenos e na avaliação de respostas imunológicas.

A biotecnologia tem desempenhado um papel crucial no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e preventivas contra diversas doenças. Entre essas, as vacinas de DNA emergem como uma tecnologia promissora, oferecendo várias vantagens, como a capacidade de induzir uma resposta imunológica robusta e a facilidade de produção e armazenamento. No entanto, a avaliação eficaz dessas vacinas ainda representa um desafio significativo, exigindo modelos *in vitro* que possam mimetizar com precisão as interações imunológicas humanas.

Nesse contexto, as células THP-1 oferecem um modelo versátil e relevante para a análise de respostas imunológicas, particularmente na avaliação de novas vacinas. A utilização das células THP-1 como modelo *in vitro* permite uma melhor compreensão dos mecanismos de ação das vacinas de DNA e facilita a identificação de potenciais marcadores de eficácia imunológica.

O antígeno vacinal utilizado neste estudo é a oncoproteína E6 do HPV-16. Dentre as proteínas do HPV, as oncoproteínas são consideradas interessantes alvos da imunoterapia do câncer cervical, pois são essenciais para o surgimento e evolução da malignidade e são expressas em lesões pré-malignas e invasivas. Diversas estratégias vêm sendo estudadas para o desenvolvimento de vacinas terapêuticas que têm como alvos as oncoproteínas. No entanto, nenhuma destas estratégias conseguiu causar regressão total dos tumores induzidos pelo vírus, o que reforça a

necessidade de estudos complementares para eliciar uma resposta imune adequada contra essas oncoproteínas, fornecendo estratégias promissoras no combate às neoplasias cervicais.

A vacina de DNA terapêutica contra o câncer cervical é uma forma de imunoterapia que visa utilizar o próprio sistema imunológico do paciente para combater células cancerígenas no colo do útero. A ideia por trás dessa abordagem é induzir linfócitos T citotóxicos (CTLs) para eliminar células infectadas ou transformadas por HPV, em pacientes com infecção crônica. Isso pode ajudar a ativar o sistema imunológico do paciente para que ele reconheça e ataque essas células cancerosas como se fossem invasores estrangeiros.

O presente trabalho tem como foco investigar o uso das células THP-1 como modelo *in vitro* para a avaliação de vacinas de DNA, visando contribuir para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes de imunização. Especificamente, este estudo foca na avaliação do antígeno vacinal pVAX-E6multi, que contém sequências imunogênicas derivadas da oncoproteína E6 do HPV-16, um alvo significativo na prevenção de cânceres associados ao Papilomavírus humano. Neste contexto, a utilização de macrófagos como modelo experimental é relevante devido ao seu papel crucial na resposta imunológica e no microambiente tumoral.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 LINHAGEM CELULAR MONOCÍTICA HUMANA (THP-1) E SUAS APLICAÇÕES

A linhagem celular THP-1 foi isolada por Tsuchiya e colaboradores em 1980 a partir do sangue periférico de um paciente masculino de um ano de idade com diagnóstico de leucemia monocítica aguda (Tsuchiya et al., 1980). Essas células assemelham-se às propriedades morfológicas e de diferenciação de monócitos e macrófagos primários (Tsuchiya et al., 1980). Esta linhagem celular tem sido amplamente empregada em pesquisas para estudar as funções de monócitos e macrófagos, assim como os mecanismos, vias de sinalização e transporte de nutrientes e medicamentos (Chanput et al., 2014).

A linhagem celular monocítica humana THP-1 é uniforme, simples de cultivar e manter em ambiente laboratorial. As THP-1 são extensivamente empregadas para estudar como os monócitos e macrófagos controlam, regulam, funcionam, sinalizam e destroem patógenos (Shah et al., 2022). Esses modelos *in vitro* são comumente usados para explorar a interação entre patógeno e hospedeiro durante infecções por *M. tuberculosis* (Chanput et al., 2014).

Os primeiros estudos indicaram que as células THP-1 se assemelham a monócitos primários e macrófagos em propriedades morfológicas e funcionais, incluindo marcadores de diferenciação (Kramer et al., 2002; Hjort et al., 2003; Sakamoto et al., 2001; Tsuchiya et al., 1980 e Ueki et al., 2002). Devido às suas semelhanças metabólicas e morfológicas, essas células podem ser diferenciadas em macrófagos utilizando forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), 1,25-di-hidroxivitamina D3 (VD3), ácido retinoico ou citocinas (TNF, IFN- γ), fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) ou fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF). Entre os quatro mencionados anteriormente, o PMA e o VD3 são os agentes de diferenciação mais frequentemente utilizados em linhagens celulares monocíticas (Chen e Catharine, 2004; Daigneault et al., 2010; Park et al., 2007 e Smith et al., 2018).

Ésteres de forbol, como o PMA, são capazes de promover a completa diferenciação de monócitos em macrófagos (Daigneault et al., 2010; Genin et al., 2015 e Smith et al., 2015). A diferenciação induzida pelo PMA ocorre através da ativação da proteínaquinase C (PKC) e é semelhante à diferenciação induzida por diacilglicerol que acontece naturalmente nos macrófagos humanos (Reyes et al., 1999 e Cao et al., 2014).

Após a exposição ao PMA (forbol 12-miristato 13-acetato), as células começam a aderir às placas de cultura. Isso é seguido por notáveis alterações morfológicas, resultando na diferenciação em um fenótipo de macrófago caracterizado por uma forma ameboide e plana, com corpos de Golgi bem desenvolvidos, um grande número de ribossomos citoplasmáticos livres e retículos endoplasmáticos rugosos (Tsuchiya et al., 1982). De acordo com a literatura, pode-se concluir que o PMA é o agente de diferenciação mais eficaz para obter macrófagos maduros a partir de monócitos THP-1, apresentando características semelhantes aos macrófagos derivados de monócitos de célula mononuclear do sangue periférico (PBMC) (Bastiaan-net et al., 2013; Chanput et al., 2012; Chanput et al., 2013 e Liu et al., 2023).

As concentrações de PMA utilizadas em estudos variam de 6 a 500 nM, representando uma diferença de quase 80 vezes na concentração (Feng et al., 2004; Park et al., 2007 e Spano et al., 2007). Além disso, o tempo de exposição das células ao PMA varia de 3 a 72 horas, o que equivale a uma variação de 24 vezes na duração da fase de estimulação (Feng et al., 2004 e Lud et al., 2016). O tratamento com PMA oferece vantagens sobre o $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na indução de um fenótipo mais maduro, caracterizado por uma maior taxa de fagocitose, menor taxa de proliferação, expressão aumentada de CD14 e CD11b na superfície celular, e maior capacidade de aderência em comparação com o agente de indução $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (vitamina D3) (Schwende et al., 1996).

Os macrófagos diferenciados da linhagem THP-1 são empregados como um modelo *in vitro* de macrófagos humanos em pesquisas que exploram doenças inflamatórias (Chanput et al., 2014; Hjort et al., 2003; Shah et al., 2022 e Ueki et al., 2002). Devido ao seu comportamento semelhante ao de macrófagos derivados

naturalmente de monócitos, essa linhagem celular representa um modelo confiável para investigar os mecanismos subjacentes à diferenciação dos macrófagos (Auwerx, 1991).

A linhagem celular THP-1 é vantajosa para pesquisas que envolvem o sistema monócito-macróforo por diversos motivos. Em primeiro lugar, por ser derivada de uma única fonte, a THP-1 possui um background genético mais uniforme em comparação aos monócitos primários. Essa uniformidade genética ajuda a reduzir as variações no fenótipo celular resultantes da diferenciação de monócitos em macrófagos (Qin, 2012). Além disso, os macrófagos polarizados a partir de células THP-1 podem ser eficientemente transfectados utilizando métodos não virais, como eletroporação e transfecção lipossomal, com maior sucesso do que os macrófagos primários. Isso se deve ao papel funcional dos macrófagos no sistema imunológico, onde eles rapidamente eliminam corpos estranhos, incluindo os reagentes de transfecção (Qin, 2012 e Yasin et al., 2022).

Theus e colaboradores (2004) enfatizaram que as vantagens de utilizar a linhagem celular THP-1 como modelo de diferenciação de monócitos/macrófagos *in vitro* incluem a consistência na função de macróforo e a capacidade replicável de crescimento celular. Isso facilita seu estudo em vários estágios, tanto normais quanto ativados. Além disso, foi demonstrado que a diferenciação da THP-1 pode ser utilizada como modelo experimental na compreensão de diferentes vias de sinalização durante a infecção por *M. tuberculosis* e as respostas imunes desenvolvidas pelos macrófagos (Wei et al., 2016 e Zhou et al., 2019).

Em um estudo sobre o câncer, foi explorado o papel dos macrófagos derivados de células THP-1. Estes macrófagos foram usados para provar que o câncer induziu a suprarregulação dos marcadores TAM (Macrófagos Associados a Tumores) em monócitos circulantes (Cassetta et al., 2019). Assim, esses estudos anteriores reforçam a validação da THP-1 como um modelo confiável de macrófagos primários e oferece insights importantes para pesquisas futuras envolvendo esse conjunto de células monócito-macróforo.

2.2 MACRÓFAGOS: CARACTERÍSTICAS E FENÓTIPOS

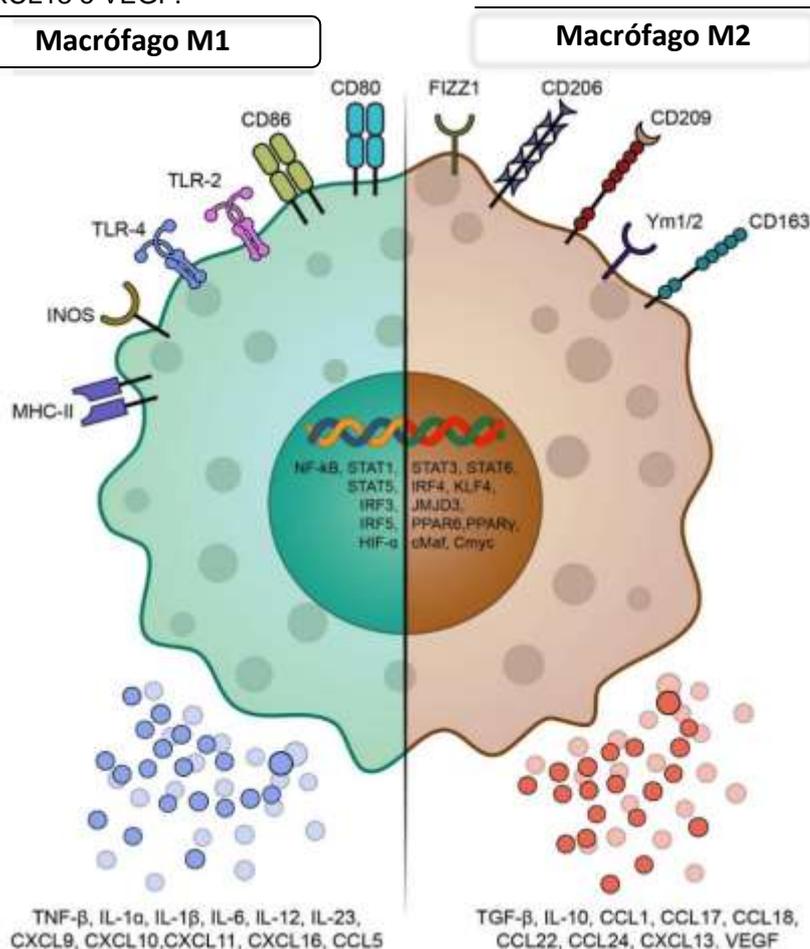
Os macrófagos desempenham uma variedade de funções na imunidade inata e adaptativa. Eles possuem pelo menos três funções essenciais para a manutenção da homeostase: fagocitose, apresentação de antígenos e secreção de citocinas (Davies et al., 2013). Originados de precursores monocíticos, os macrófagos respondem a diversos fatores extrínsecos que influenciam a expressão de proteínas regulatórias e de superfície, resultando em um estado de polarização celular. Este conceito refere-se às características fenotípicas que os macrófagos apresentam em determinado tempo e contexto, refletindo propriedades proteicas e funcionais relacionadas à inflamação (Murray et al., 2017).

Nos estudos, essas subpopulações são categorizadas em dois tipos fenotipicamente distintos: os macrófagos M1, que são reconhecidos como pró-inflamatórios e possuem uma forte capacidade de produzir citocinas pró-inflamatórias. Eles são especializados na resistência a patógenos, apresentam alta atividade microbicida e geram espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS/RNS). A ativação dos macrófagos M1 ocorre em resposta a componentes bacterianos como o LPS, isoladamente ou em combinação com citocinas que promovem uma resposta imune Th1, incluindo o interferon-gama (IFN- γ). Esses macrófagos são definidos pela elevada expressão de interleucina-1 β (IL-1 β), IL-6, IL-12, IL-23, fator de necrose tumoral (TNF- α) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS), desempenhando um papel pró-inflamatório essencial para a eliminação de microrganismos invasores. Eles podem ser identificados pela presença de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade classe II (MHC II), CD68, CD80, CD86, SOCS3 e iNOS (**Figura 1**) (Barros et al., 2013, Martinez e Gordon, 2014 e Shiratori et al., 2018).

Os macrófagos M2, ou alternativamente ativados, são caracterizados por uma resposta anti-inflamatória e são induzidos por citocinas produzidas por células Th2, como IL-4, IL-10 e IL-13 (Khan et al., 2019, Murray et al., 2017). Esses macrófagos expressam receptores de manose CD206 e CD163 e produzem citocinas como IL-6, IL-10 e TGF- β , um fator de transformação do crescimento. Além disso, os macrófagos M2 possuem baixa expressão de iNOS e IL-12 (**Figura 1**). Funcionalmente, eles

ajudam a resolver a inflamação, têm alta capacidade fagocítica, promovem a angiogênese e contribuem para o remodelamento tecidual. Eles também são encontrados no microambiente tumoral I (Martinez e Gordon, 2014; Mosser & Edward, 2008 e Murray et al., 2017).

Figura 1: Fenótipos pró-inflamatório M1 (classicamente ativado) e o anti-inflamatório e M2 (alternativamente ativado). Os macrófagos M1 são induzidos por LPS, IFN- γ e TNF- α e expressam TLR-2, TLR-4, CD86, CD80, iNOS e MHC-II, liberando citocinas como TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12, CXCL9 e CXCL-10. A expressão dos genes M1 é regulada por NF- κ B, STAT1, STAT5, IRF3, IRF-5 e HIF- α . Já os macrófagos M2 são induzidos por IL-4 e IL-13, identificados pela expressão de FIZZ1, CD206, CD209, Ym1/2 e CD163, e pela secreção de TGF- β , IL-10, CCL1, CCL17, CCL18, CCL22, CCL24, CXCL13 e VEGF.



Adaptado de Reghu (2024)

Além disso, a literatura descreve três subgrupos de macrófagos M2: M2a, M2b e M2c (**Figura 2**). O subgrupo M2a é geralmente induzido por IL-4 ou IL-13, já o M2b é ativado pela exposição a imunocomplexos (CI), agonistas de TLRs ou receptores de IL-1, responsável pela regulação imunológica. Enquanto o M2c é gerado pela indução de IL-10 ou TGF- β , cuja função consiste na promoção da tolerância imunológica e o remodelamento dos tecidos (Cui e Liu 2015 e Sha et al., 2022). Os macrófagos humanos não polarizados (M0) podem ser identificados por marcadores como fator 1 estimulador de colônia de macrófagos/CD115, CD36, CD14, CD68 ou CD71, conforme ilustrado na **Figura 2** (Sha et al., 2022). Em geral, uma variedade de mediadores é utilizada para indução das células THP-1, isoladamente ou em combinações, para alcançar diferentes populações de macrófagos.

Figura 2: Polarização de células THP-1 em diferentes fenótipos de macrófagos. A ativação clássica refere-se à polarização para o fenótipo M1, a ativação alternativa ao M2a, o macrófago Tipo II ao M2b, e o fenótipo desativado ao M2c. Entre os termos citados estão: RM (receptor de manose), SRs (receptores scavenger), TLR (receptor Toll-like), TGF- β (fator de crescimento transformador beta), TNF- α (fator de necrose tumoral alfa), LPS (lipopolissacarídeos) e PMA (phorbol 12-miristato 13-acetato).

Dentro do microambiente tumoral, os TAMs exercem certos efeitos promotores do tumor, incluindo a estimulação da proliferação de células tumorais, metástases, angiogênese e resistência a drogas (**Figura 3**) (Li et al., 2019 e Hourani et al., 2021). Além disso, os macrófagos associados a tumores exibem considerável plasticidade, sendo facilmente polarizadas em tipos distintos em resposta a fatores ambientais. O perfil presente nos infiltrados tumorais, denominados como M1 ou M2, influencia na progressão de alguns tipos de câncer, incluindo os cânceres HPV positivos (Lequeux et al., 2021 e Silva et al., 2023).

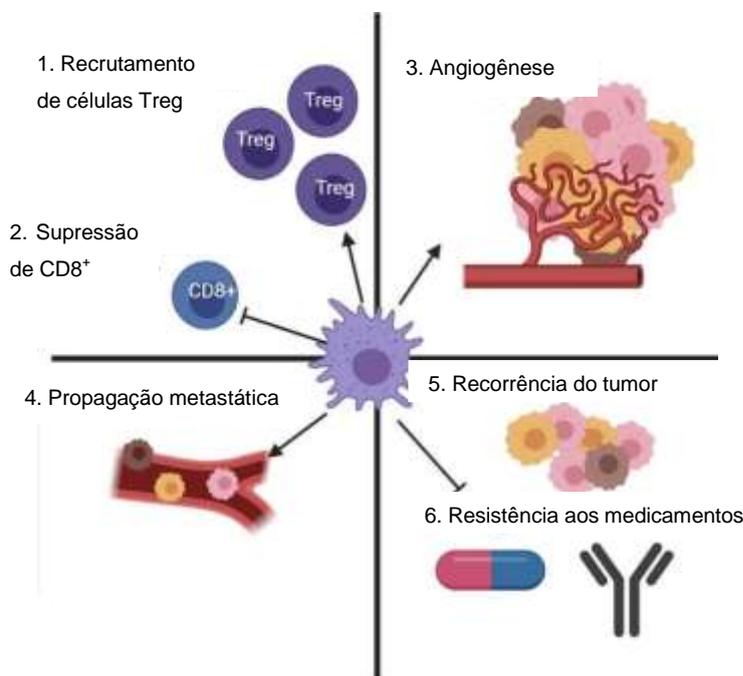
A regulação das funções dos macrófagos desempenha um papel crucial no êxito da imunoterapia contra tumores, envolvendo múltiplas citocinas, receptores e vias de sinalização que influenciam a ativação e inibição dessas células, determinando assim a eficácia das respostas imunológicas (Clara et al., 2020). Esta estratégia traz novas perspectivas para o tratamento do câncer, particularmente em estágios avançados e metastáticos.

Embora compartilhem funcionalidades semelhantes aos macrófagos do tipo M2, os TAMs não se encaixam perfeitamente nessa classificação, exibindo características que favorecem a imunossupressão no microambiente tumoral e a progressão do câncer. O papel imunossupressor dos TAMs está intimamente ligado aos tipos e funções das células T que infiltram esse ambiente (Xia et al., 2021). Os TAMs podem suprimir diretamente as funções imunológicas dos linfócitos T citotóxicos (CTL) através de pelo menos três mecanismos distintos: modulação da expressão de *checkpoints* imunológicos, liberação de fatores supressores do sistema imunológico e regulação da produção de metabólitos que afetam a atividade dos CTLs por meio de vias metabólicas (Zhou et al., 2021).

No entanto, devido à sua plasticidade, há indícios de que as TAMs possuem perfis de expressão que podem ser semelhantes dos padrões tradicionais M1 e M2 dos macrófagos (Lavine et al., 2014). Como a maioria das neoplasias está associada a estados inflamatórios crônicos, sugere-se que os macrófagos M1 podem iniciar a formação do tumor, criando um ambiente propenso a mutações, enquanto os macrófagos M2 favorecem a progressão da malignidade (Ribeiro et al., 2014 e Xia et al., 2021).

Abordagens terapêuticas direcionadas aos macrófagos no microambiente do câncer de ovário em murinos visam converter macrófagos M2 em M1 e combater a imunossupressão (Travers et al., 2019). A inibição da polarização dos TAMs através de terapias combinadas oferece promessa significativa na prática clínica. Estudos recentes demonstraram que a combinação de 5-azacitidina (AZA) e α -difluorometilornitina (DFMO) aumentou a sobrevivência e reduziu a carga tumoral em modelos de câncer de ovário em camundongos (Travers et al., 2019). Outro estudo introduziu nanopartículas de duplo inibidor (DNTs) que transformaram macrófagos M2 em M1, apresentando uma abordagem inovadora e promissora para a terapia antitumoral (Ramesh et al., 2019).

Figura 3: O papel das TAMs no apoio ao crescimento do tumor. As TAMs facilitam a imunossupressão ao recrutar células Treg e inibir as células T CD8+. Além disso, as TAMs estão envolvidas na disseminação metastática, angiogênese e resistência a medicamentos.



Adaptado de Hourani (2021).

2.3 O PAPILOMAVÍRUS HUMANO

2.3.1 ESTRUTURA E ORGANIZAÇÃO DO GENOMA

Os Papilomavírus humano (HPVs) possuem como material genético uma molécula de DNA circular de fita dupla de aproximadamente 8000 pb, dividida em 8 ORFs e associada a proteínas do tipo histona. São vírus icosaédricos não envelopados, protegido por um capsídeo, com diâmetro de aproximadamente 55nm (Brianti et al., 2017 e Van Doorslaer et al., 2019). Até o presente momento são conhecidos 216 tipos de HPV (Van Doorslaer et al., 2019) e eles difere um do outro pelo menos 10% na sequência do gene L1, altamente conservado em cada genótipo (Kocjan *et al.*, 2015). O contágio pelo vírus está relacionado com infecções cutâneas e na mucosa epitelial que podem levar a lesões ou verrugas (Brianti et al., 2017 e Van Doorslaer et al., 2019).

Atualmente são definidos cinco grupos evolutivos de HPV (alfa (α), beta (β), gama (γ), mi (μ) e ni (ν)). Dentre os mais de 200 tipos de HPV reconhecidos, os Papilomavírus do gênero alfa são os principais responsáveis por infectar mucosas, além de causar infecções cutâneas, e são classificados como de alto ou baixo risco oncogênico (Okunade et al., 2020 e Van Doorslaer et al., 2019). Os HPVs de alto risco são os agentes etiológicos do câncer cervical e de outros cânceres genitais, assim como carcinomas decabeça e pescoço. Treze tipos foram classificados como sendo de alto risco pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC): HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68 (Graham, 2017 e Viariso, 2017). Os alfa-papilomavirus de baixo risco causam lesões benignas ou de baixo grau e verrugas anogenitais. Dentre os HPVs de baixo risco, os tipos 6 e 11 são os mais prevalentes (Alemany et al., 2014; Brianti et al., 2017; Serrano et al., 2015).

O genoma viral (**Figura 4**) pode ser dividido em três regiões funcionais, que são: uma região codificante contendo os genes iniciais E1, E2 e E4, responsável pela replicação e transcrição do DNA viral; e E5, E6 e E7, que estão associados à carcinogênese; uma região contendo dois genes tardios: as proteínas do capsídeo principal (L1) e secundária (L2) e por fim, a região de controle longo (LCR) que não codifica proteínas e é responsável pela regulação da transcrição das demais ORFs e da replicação (Graham, 2010; Gupta e Mania-pramanik, 2019; Zheng, 2022; Nelson, 2023). Devido o *splicing* alternativo e a expressão de múltiplos promotores, a

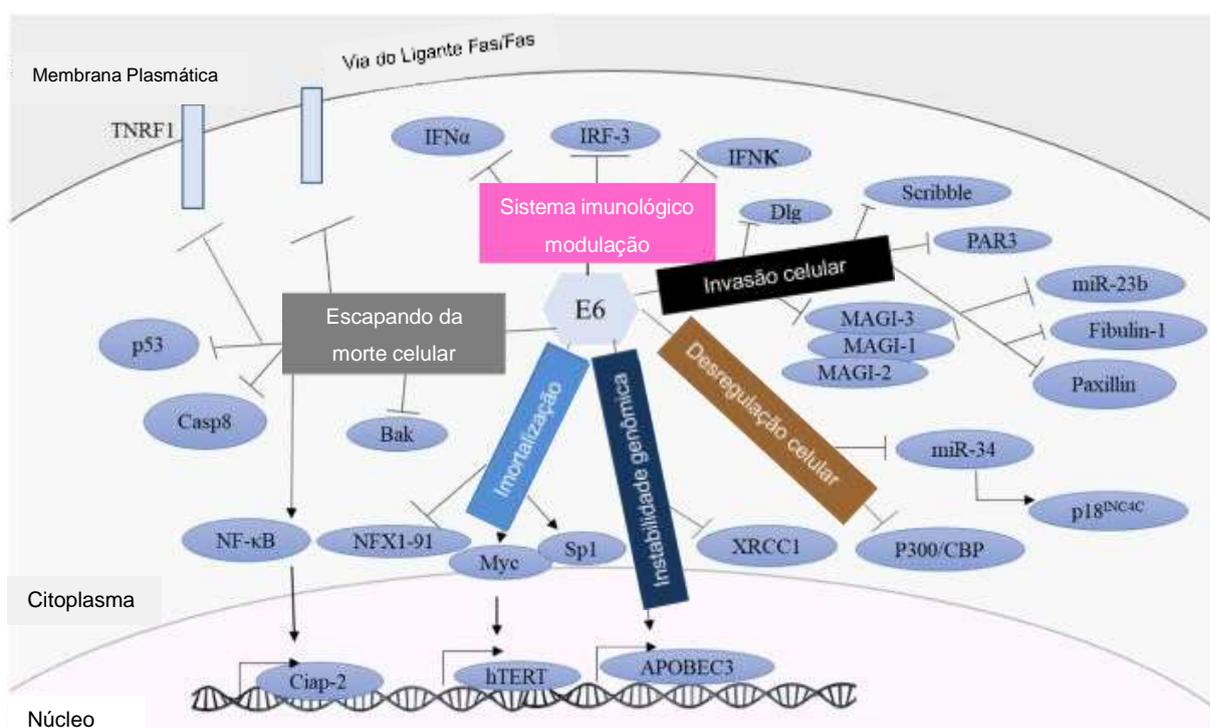
Proteína viral	Principais funções
E1	Regulação da replicação do DNA viral; possui função de helicase
E2	Ativador da replicação do genoma viral; regulador da transcrição viral (repressor de E6 e E7)
E4	Montagem e liberação da partícula viral; alteração da matriz intracelular
E5	Ativação do Fator de Crescimento Epidermal (EGF); dificulta a apresentação de antígenos via MHC, induz a proliferação celular
E6	Inativação do supressor tumoral p53 via degradação proteossomal; induz a carcinogênese
E7	Inativação do supressor tumoral pRB via degradação proteossomal; induz a carcinogênese
E8^E2	Resultado de processamento via <i>splicing</i>, Inibidor da transcrição e tradução dos genes virais
L1	Principal proteína do capsídeo
L2	Proteína interna do capsídeo

2.3.2 A ONCOPROTEÍNA E6

A oncoproteína E6 é uma das principais oncoproteínas virais de HPVs de alto risco atuando como proteína multifuncional (Martínez-Ramírez et al., 2018). Esta proteína é responsável pela proliferação e sobrevivência celular, inibição do apoptose, instabilidade genômica e evasão da resposta imune do hospedeiro (Yeo- Teh et al., 2018) através das suas interações com um conjunto de proteínas-chave como

supressor tumoral p53 (Figura 5). A inativação das proteínas p53 leva ao acúmulo de danos no DNA da célula do hospedeiro e, conseqüentemente, à carcinogênese (Doorbar et al., 2012; Estêvão et al., 2019).

Figura 5: Alvos moleculares da oncoproteína E6 de alto risco. É conhecido que a oncoproteína E6 interage com uma ampla variedade de moléculas que participam de várias vias celulares. Essas interações têm um impacto significativo na modulação do sistema imunológico, na promoção da invasão celular, na desregulação do ciclo celular, na indução de instabilidade genômica, na facilitação da immortalização celular e na supressão da morte celular. Esse conjunto de efeitos contribui para potencializar o desenvolvimento do câncer.



Fonte: Adaptado de Estêvão (2019).

Em condições normais, a célula responde a eventos de proliferação não programada através da indução à apoptose. Porém, este evento é impedido pela proteína E6 de HPVs de alto risco, visto que E6 interage com a ubiquitina ligase E6AP (*E6-associated protein*) levando o supressor tumoral p53 – um regulador-chave do apoptose – à degradação proteossomal, alterando assim todos os genes subordinados a este (Martinez-Zapien et al., 2016 e Vande Pol & Klingelutz, 2013).

Além disso, a oncoproteína E6 possui um domínio de ligação ao motivo PDZ (*PDZ binding motif*) e desta forma, é capaz de interagir com pelo menos outras 14 proteínas que contêm este motivo, o que na maioria dos casos as direciona à degradação proteossomal. A perda dessas proteínas resulta na alteração da morfologia celular, reorganização da rede de microfilamentos e perda das junções celulares, eventos associados à imortalização dos queratinócitos (Massimi, et al., 2008 e Yeo-Teh et al., 2018).

Recentemente, dados publicados pela Inovio (2022) sobre a vacina de DNA terapêutica Inovio VGX-3100, que tem como alvo as proteínas E6 e E7, demonstraram que ela passou por ensaios clínicos de Fase 3. Esses ensaios foram conduzidos de forma prospectiva, randomizada, duplo-cega e com grupo controle que recebeu placebo (NCT03721978e NCT03185013). As participantes eram mulheres adultas com lesões histologicamente confirmadas de Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) 2 e 3, causadas pelos tipos virais HPV16 e HPV18. Embora os resultados relativos à regressão histopatológica e à redução da carga viral após a vacinação com VGX-3100 não tenham atingido níveis de sucesso significativo, devido a falta de significância estatística na população biomarcadora experimental selecionada, essa vacina representa o composto mais avançado em estágios clínicos, demonstrando a viabilidade de direcionar as proteínas E6 e E7 como alvos eficazes para uma vacina terapêutica contra o HPV16. A vacina BNT113 da BioNTech, que utiliza a tecnologia de mRNA, também está direcionando seus testes aos antígenos E6 e E7. Atualmente, encontra-se em andamento um ensaio clínico de fase II com o objetivo de avaliar tanto a segurança quanto o efeito terapêutico dessa vacina em pacientes que apresentam câncer na região da cabeça e pescoço e são positivos para o HPV16.

Estudos recentes feito por Zhou e colaboradores (2023) mostraram que os camundongos C57Bl6 re-desafiados com o tumor C3 foram capazes de montar uma resposta imune induzida por vacina de mRNA contra E6, o que sugere que a imunogenicidade de E6 poderia oferecer um nível extra de proteção contra recorrência. Pelo fato das oncoproteínas E6 e E7 atuarem nas fases iniciais e avançadas da transformação de queratinócitos e no desenvolvimento de lesões cervicais malignas,

uma resposta imune elicitada contra epítomos imunogênicos dessas proteínas deve erradicar as células tumorais eficientemente.

2.4 VACINA DE DNA COMO ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA CONTRA O CÂNCER CERVICAL

Em se tratando do desenvolvimento de vacinas, as vacinas de DNA destacam-se, pois, são mais seguras, visto que podem ser desenvolvidas a partir de sequências alvo e vetores não patogênicos, rápida produção e maior estabilidade, comparada às vacinas tradicionais (Garg et al., 2018). As vacinas de DNA consistem em plasmídeos recombinantes que expressam *in vivo* um imunógeno capaz de estimular respostas imunes celular e humoral do hospedeiro que a recebe. Elas podem ser projetadas para modular a especificidade da imunidade ou para aumentar as respostas imunológicas com auxílio de sequências que podem atuar como adjuvantes (Vici et al., 2016). As vacinas podem ser entregues por diferentes rotas, sendo as mais comuns a intramuscular (IM) e intradérmica (ID) que resultam na transfeção direta de miócitos e queratinócitos, respectivamente, além de células apresentadoras de antígeno (APCs) especializadas (Lopes et al., 2019).

A vacina de DNA consiste em utilizar um plasmídeo que é sintetizado em bactérias e contém a informação genética para produzir uma determinada proteína de interesse, também conhecida como antígeno. Esse plasmídeo é projetado com um promotor adequado para funcionar em células de mamíferos e é direcionado de maneira a adentrar o núcleo das células humanas que o receberão, iniciando assim o processo de transcrição e tradução. Uma vez que o plasmídeo é internalizado pelas células do hospedeiro, a proteína específica codificada por ele começa a ser produzida. Esse antígeno resultante torna-se disponível dentro das células. Um passo crucial acontece quando esse antígeno é apresentado às células apresentadoras de antígenos (APCs), células dendríticas e macrófagos, por meio das vias de complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Dessa forma, as células T virgens podem ser ativadas após reconhecerem o antígeno, o que desencadeia uma resposta imune. Caso as proteínas da vacina sejam secretadas, esses alvos são reconhecidos pelos

receptores de células B em células B virgens as células produzidas produzirão diferentes classes de mecanismos (principalmente IgG) para proteger contra a doença. Além disso, a vacinação através do uso de vacinas de DNA também induz a produção de citocinas e quimiocinas com propriedades pró- inflamatórias (Lopes, et al., 2019; Silveira, et al., 2021; Ghattas, et al., 2021).

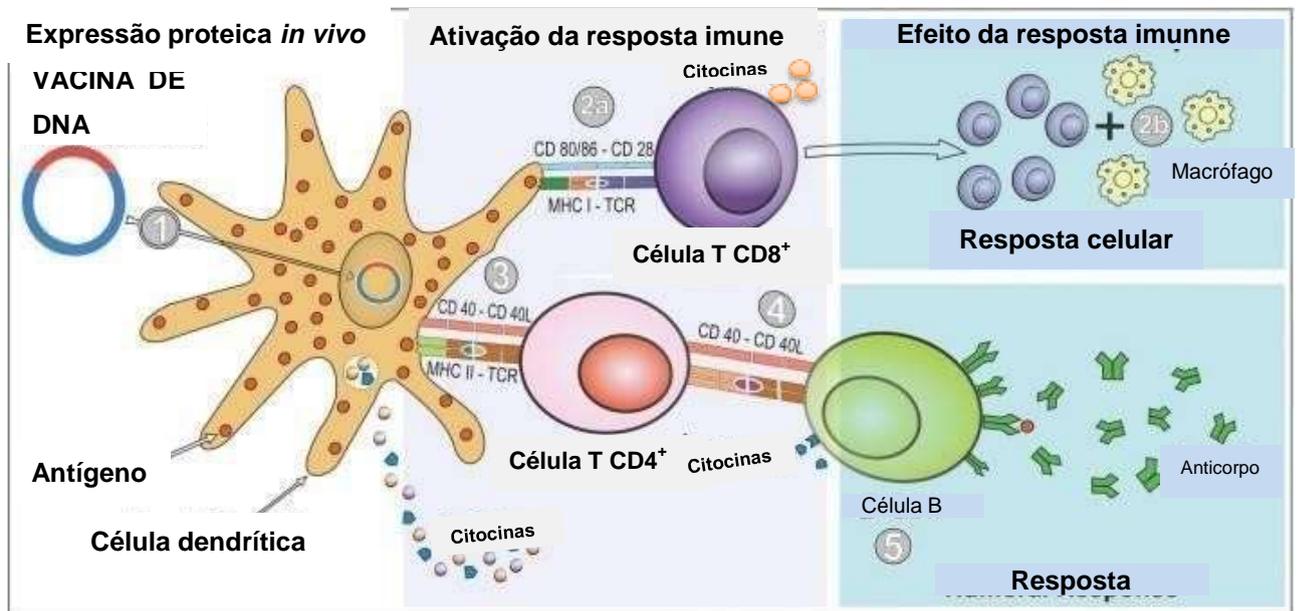
Atualmente são licenciadas 4 vacinas profiláticas contra o HPV. No entanto, as vacinas não são eficazes contra o Câncer cervical em indivíduos já infectados, visto que a eficácia da vacinação é muito baixa em mulheres com infecção prevalente por HPV (Paavonen et al., 2009), o que aponta para um baixo impacto no controle do câncer cervical pré-existente. Diante deste quadro é indispensável o desenvolvimento de estratégias terapêuticas no combate ao câncer cervical. No momento, o foco do combate ao câncer em mulheres já diagnosticadas com lesões consiste em aumentar as taxas de sobrevivência, principalmente por meio de terapias direcionadas em combinação com a crioterapia, quimio-radiação padrão e histerectomia (Del Campo et al., 2008).

Durante a infecção pelo HPV, naturalmente, o sistema imune não é capaz de reconhecer todos os epítomos possíveis do patógeno, causando assim uma resposta centrada em apenas um ou poucos deles. Portanto, o uso de vacinas terapêuticas baseadas em epítomos específicos permite a escolha de alvos terapêuticos mais apropriados, aumentando assim a eficácia da resposta imune celular contra as proteínas do vírus (Rajissa et al., 2019; Sette e Fikes, 2003). Essas vacinas são compostas de epítomos imunodominantes de células B e T separados por espaçadores, que auxiliam no processamento e apresentação de antígenos. A falta de sequências espaçadoras para separação dos epítomos resulta na produção de uma nova proteína (Li et al., 2014).

Quando o plasmídeo vacinal chega ao núcleo, o gene que codifica o antígeno de interesse é transcrito. Em seguida, esse mRNA é traduzido no citoplasma da célula utilizando a maquinaria traducional do hospedeiro (**Figura 6**). A proteína resultante, contendo os epítomos intactos, é processada pela via de reconhecimento antigênico do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) e apresentada ao sistema imunológico. Uma grande vantagem das vacinas de DNA é a capacidade de codificar

antígenos que são processados pelas vias MHC classe I e II, ativando assim tanto as respostas de células TCD8 quanto TCD4. Isso promove uma resposta imune humoral (através da apresentação cruzada) e celular, sendo esta última crucial para o sucesso da terapia (Dunham 2002).

Figura 6: Indução de imunidade celular e humoral após imunização com vacinas de DNA.



Fonte: Adaptado de Silveira 2021.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o uso de células THP-1 como modelo *in vitro* para a avaliação de vacinas de DNA, visando contribuir para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes de imunização contra o câncer cervical promovido pelo HPV.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a viabilidade do antígeno vacinal pVAX-E6multi.
- Padronizar o processo de diferenciação das células THP-1 através da indução com PMA (forbol 12-miristato 13-acetato), determinando as condições ótimas para a obtenção de macrófagos funcionais.
- Avaliar a eficácia da transfecção de macrófagos derivados de células THP-1 com DNA plasmidial E6multi.
- Investigar o perfil de polarização dos macrófagos obtidos a partir da transfecção das células THP-1 através da análise de expressão gênica de marcadores típicos de macrófagos M0 (como CD68), M1 (como CD80/CD86) e M2 (como CD206).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANTÍGENO VACINAL

O gene sintético otimizado para expressão em células de mamífero foi adquirido (GenScript) como antígeno proposto para a estratégia vacinal. A construção vacinal é composta por sequências duplicadas para três epítomos imunogênicos – ligantes de MHC-I, alelo H-2-Db – para ativação de linfócitos T citotóxicos presentes na oncoproteína E6 do HPV-16. A sequência dos epítomos presente na construção multiepítomo está representada na **Tabela 1**. Os genes multiepítomo foram intercalados por sequências *linkers* para sítios de clivagem proteossomal e lisossomal (HEYGAEALERAG e AAY) (Dolenc et al., 1998; Bergmann et al., 1996; Nezafat et al., 2014) como abordagem para aumento da apresentação via MHC. O esquema da construção vacinal está ilustrado na **Figura 7**.

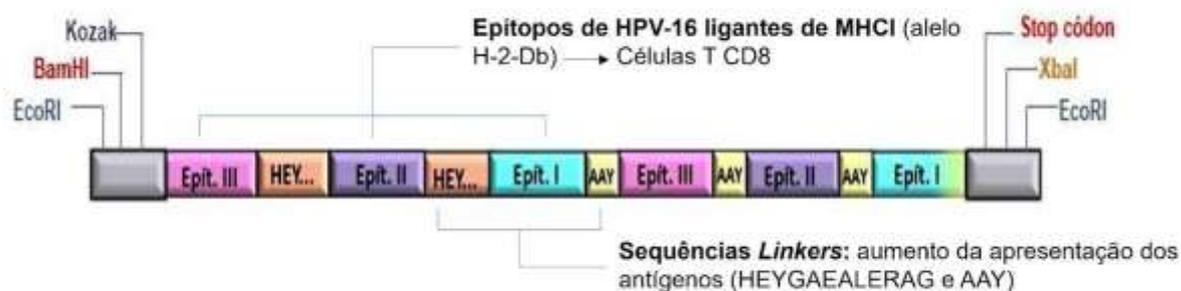
Tabela 1. Descrição dos epítomos ligantes de MHC-I preditos pela ferramenta IEDB utilizados neste estudo.

Gene	Epítomo I	Epítomo II	Epítomo III	Tamanho da construção (em pb)
E6 HPV-16 multiepítomo	REYDFAFRDLCI V (47-60)	CVYCKQQLLRREV Y (37-50)	RKLPQLCTELQT T (17-29)	372

Fonte: A autora (2024).

Figura 7. Esquema ilustrativo do gene sintético multiepítomo para o antígeno E6 de HPV-16 e sua sequência em pares de bases.

Representação esquemática da construção multi-epitopo E6



Predição: Immune Epitope Database (IEDB)

Sequência da construção multi-epitopo E6 *

```
5'GAATTCGGATCCATCATGAGGGAAGTATATGATTCGCATTCA GGGATCTGTGCATCGTCCATGAATACGGTGCTGAAGCCCTTGAACGGGCGCAGGATGTGTTACTGC
AAGCAACAGCTGCTGCGCCGCGAGGTATACCACGAATATGGCGCCGAGGCCCTGGAGAGGGCCGGCCGCAAGCTCCCCAGCTCTGCACCGAACCTCAAACACTACTGCT
GCATACCGAGAAGTATACGACTTCGCATTTAGAGACCTCTGCATCGTTGCTGCCTACTGTGTGATTGTAAGCAGCAACTGCTGAGAAGGGAGGTCTACGCTGCCTATCG
GAAATTGCCACAGCTGTGTACCGAGTTGCAAACCACTTGATCTAGAGAATTC3'
```

4.2 CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS VACINAIS

Para obtenção do plasmídeo vacinal, o gene de interesse foi selecionado e propagado em plasmídeo pUC57 através de cultura de bactérias quimiocompetentes da linhagem *Escherichia coli Top 10*. Durante a transformação bacteriana, aproximadamente 100 ng de DNA foram adicionados a 50 µl de bactérias quimiocompetentes e cultivadas em meio LB (Luria-Bertani). Os clones foram selecionados utilizando-se o antibiótico de resistência ampicilina para o vetor pUC57 (uso a 100 µg/mL). O DNA das colônias foi extraído utilizando-se kit comercial de mini extração plasmidial (*KitYield™ Plasmid Miniprep System*) e submetido à digestão enzimática com as enzimas de restrição *BamHI* e *XbaI*.

O gene de interesse foi então separado do vetor através de eletroforese em gel de agarose a 1% e os recortes do gel foram purificados através de kit de purificação de DNA comercial (*kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System™* - Promega®) e subclonados, por meio de reação de ligação (*T4 DNA ligase* - Invitrogen™) no

plasmídeo de expressão em células de mamíferos pVAX1 (Invitrogen™) previamente digerido pelas enzimas *BamHI* e *XbaI*. Bactérias quimiocompetentes da linhagem *E. coli* Top10 foram utilizadas nesse processo de clonagem para produção em grande escala dos plasmídeos recombinantes e manutenção destes. Para o vetor pVAX1 foi usado 50 µg/mL de antibiótico Canamicina para seleção dos clones. A construção vacinal (pVAX1-E6multi) foi confirmada quanto à integridade das sequências desejadas através de PCR (Polymerase Chain Reaction), clivagem com enzima de restrição e sequenciamento de DNA dos clones. Para a análise do sequenciamento, foram utilizados os programas Pregap4 (pacote Staden V. 1.5) e Bio Edit V. 7.1.

4.3 CULTIVO E TRANSFEÇÃO DE CÉLULAS HEK – 293T

Culturas de células eucarióticas (HEK 293 – Human embryonic Kidney cell – Célula embrionária de rim humana) foram crescidas utilizando o meio DMEM – Dulbeccos Modified Eagles Medium com adição de: 10% soro fetal bovino, 1% penicilina/estreptomicina, 1% L-glutamina para manutenção celular. Posteriormente, foram incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por tempo suficiente para que as células se recuperassem e começassem a proliferar. Trocas do meio de cultura foram realizadas logo quando percebida a acidificação do meio (aproximadamente 2 dias). Após atingir 80% de confluência (1×10^5 de células) ou sempre que necessário, a passagem das células foi realizada por tripsina a 0.25% (Gibco) e transferida para outro frasco.

Para a realização da transfecção, o meio de cultura foi descartado e as células foram lavadas com 5 mL de PBS (“Phosphate Buffered Saline”). Em seguida, foi adicionado 1 mL de tripsina e as células foram incubadas a 37 °C por 5 minutos. Uma vez tripsinizadas, as células foram ressuspensas em 3 mL de meio DMEM contendo 10% de Soro Fetal Bovino (FBS). Para contagem de células viáveis foi utilizado o método de exclusão por Azul de Tripán (diluição 1:10) e 10 µl da suspensão celular foi utilizada para a contagem de células viáveis em câmara de Neubauer.

Uma vez contabilizadas, as células foram centrifugadas a 1800 rpm por 5 minutos. Cerca de 1×10^5 de células HEK 293T foram distribuídas por poço em uma placa de seis poços previamente preenchidos com 3 mL de meio DMEM. Seguindo o protocolo de transfecção (PolyFect Transfection - Qiagen®) as células HEK 293T foram transfectadas transientemente com a construção vacinal (500 ng por poço) na placa de 6 poços e o vetor vazio pVAX1 com reagente de transfecção Lipofectamine™ 3000 (Thermo Fisher Scientific) segundo as instruções do fabricante e incubadas por 48 horas em estufa com 5% CO₂ a 37°C. Após as 48 horas de incubação, o meio de cultura foi retirado de cada poço contido na placa e em seguida, foram lavados com PBS. Após a lavagem, o PBS foi retirado e 1 mL tripsina foi adicionada a cada um dos seis poços que posteriormente foram incubados à 37°C por 5 minutos. Após a tripsinização, foram adicionados 1,5 mL de meio de cultura contendo 10% de FBS em todos os poços e em seguida, as células foram recolhidas e centrifugadas a 1800 rpm por 5 minutos em tubos de 15 mL. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e foram utilizados 1,5 mL de PBS para ressuspensão celular.

4.4 EXTRAÇÃO E ANÁLISE DO RNA TOTAL DAS CÉLULAS TRANSFECTADAS

A expressão do candidato vacinal foi detectada por meio da extração do seu RNA e avaliação qualitativa do mRNA por RT-PCR. A partir do precipitado celular das células HEK 293T transfectadas com o plasmídeo pVAX1-E6multi e com o vetor vazio (pVAX1), foi extraído o RNA total com o PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen), conforme as recomendações do fabricante. Todo material utilizado para extração e manipulação do RNA foi tratado ou adquirido livre de RNases. A verificação da quantidade do RNA isolado e o seu grau de pureza foi feita através do uso do Nanodrop (Thermo Scientific) considerando as razões 260/280. Os estoques de RNA total foram mantidos a -80°C.

4.5 SÍNTESE DE cDNA

O cDNA foi sintetizado utilizando o protocolo sugerido pelos fabricantes do kit High capacity cDNA reverse transcription - Applied Biosystem (Thermo Fisher Scientific) seguindo as recomendações do fabricante. Para isso, o RNA foi preparado seguindo as instruções do kit DNase I, livre de RNase (1U/ μ L) para preparação de RNA livre de DNA antes de RT-PCR. Ao RNA total (1 μ g) foi feita a reação de transcrição reversa (RT) para cDNA, com volume final de 10 μ l. Em tubo tipo eppendorff, foram adicionados os seguintes componentes: 1 μ g de RNA total, 1 μ l de $MgCl_2$, água tratada suficiente para completar 10 μ l. As amostras foram incubadas a 37°C por 30 minutos em termociclador. Em seguida foi adicionado 1 μ l de EDTA 50mM e incubadas a 65°C por 30 minutos em termociclador.

4.6 RT-PCR PARA A VERIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE E6MULTI EM CÉLULAS HEK-293T

A realização da RT-PCR (Transcriptase Reverse PCR), ou seja, a amplificação por PCR de um produto de Transcrição Reversa (cDNA) se deu a partir dos cDNAs obtidos. Para a amplificação do E6multi, foram utilizados primers específicos, sendo a sequência forward: 5'CATCTAGATGAATTGGATCCCTGCAGATCATGAGGGAAGTATATG3' e a sequência reverse: 5'ATCCGATGAATTCTCTAGATCAAAGCTTITACCCGGGAGTGGTTT GCAACTC 3', que em conjunto a cerca de 100 ng do DNA molde foram adicionados a GoTaq® Green Master Mix (Promega). As reações foram realizadas segundo as instruções presentes no protocolo fornecido pelo fabricante. As condições de amplificação compreenderam uma desnaturação inicial: 95°C por 5 minutos; 35 ciclos de 95°C por 30 segundos (desnaturação), 57°C por 1 minuto (anelamento) e 72°C por 1 minuto (extensão); extensão final a 72°C por 10 minutos. Em todas as amplificações foram realizados controles negativos (C-), contendo água livre de nucleases em vez do DNA molde, para o controle de contaminações. A análise dos amplicons obtidos após a PCR foi realizada em gel de agarose a 1% com brometo de etídio. Para a amplificação do pVAX1, foram utilizados os primers específicos, sendo a sequência forward: 5'

TAATACGACTCACTATAGGG 3' e a sequência reversa do BGH: 5'TAGAAGGCACAGTOGAGG 3'.

4.7 CULTURA DE CÉLULAS

A linhagem humana de promonócito (THP-1) foi obtida no Laboratório de Virologia e Terapia Experimental (LAVITE) do Instituto Aggeu Magalhães - FIOCRUZ Universidade de Pernambuco sobre a partir da colaboração do Prof. Dr. Antônio Roberto.

4.7.1 DESCONGELAMENTO DAS CÉLULAS

A suspensão de THP-1 estocadas em criotubos foi retirada do nitrogênio líquido e deixada descongelando a 37°C por 5 minutos em banho maria. Em seguida o conteúdo do criotubo foi transferido para um tubo de fundo cônico modelo Falcon com 5 mL com o meio RPMI (RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 10 mM de L- glutamina e 10 mM de piruvato de sódio – Gibco – Carlsbad) e centrifugado por 10 minutos a 1800 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 1 mL do mesmo meio e transferido para a garrafa de cultura de células T75, completado para 9 mL de meio RPMI.

4.7.2 CULTURA DE CÉLULAS THP-1

Após a confirmação da expressão do antígeno vacinal por RT- PCR, células da linhagem humana de origem monocítica, derivada de paciente com leucemia monocítica aguda) THP-1 foram cultivadas para sua posterior diferenciação em macrófagos. Para isso, $0,5 \times 10^6$ de células incubadas em estufa a 37°C contendo 5% de CO₂. As trocas de meio foram realizadas a cada 2 dias, onde 10 mL de meio eram substituídos por novos 10 mL de RPMI (RPMI 1640 suplementado com 10%de soro

fetal bovino, 10 mM de L-glutamina e 10 mM de piruvato de sódio – Gibco – Carlsbad), mantendo assim a cultura em ambiente favorável para seu crescimento.

4.7.3 CONGELAMENTO DAS CÉLULAS

Após uma semana de cultivo, foi realizada a contagem celular em câmara de Neubauer, em seguida as células foram centrifugadas a 1800 rpm durante 5 minutos em temperatura ambiente. O pellet foi ressuspensão em volume suficiente para ser estocadas 3×10^6 células/mL em alíquotas de 1 mL da solução de congelamento (9,5 mL de soro fetal bovino suplementado com 500 μ l de dimetilsulfóxido) - DMSO, após isso, as células foram imediatamente levadas ao freezer -80°C .

4.8 DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS THP-1 POR PMA

Após o tempo de cultura, as células foram contadas em Câmara de Neubauer e crescidas em placas com 6 poços. Foram testadas algumas condições para a padronização e otimização da diferenciação celular induzida por PMA. Para isso, $0,5 \times 10^6$ de células foram crescidas em meio RPMI (RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 10 mM de L-glutamina e 10 mM de piruvato de sódio – Gibco – Carlsbad) e incubadas em estufa a 37°C contendo 5% de CO_2 até atingir 90% de confluência celular, o que aconteceu após 48 horas de crescimento.

Em seguida, foi iniciado o protocolo de diferenciação dos monócitos em macrófagos com PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate), de acordo com (He et al., 2021; Genin et al., 2015 e Smith, et al., 2015). Para isso, foram utilizadas duas concentrações de PMA (10 ng/ mL e 150 nM), a fim de testar qual seria a concentração ideal para uma melhor diferenciação celular. Dessa forma, foram feitas duplicatas de cultivo 2×10^5 de células THP-1 por poço em 3mL de meio completo (RPMI + 10% SBF), numa placa de 6 poços.

Para o teste com a concentração de 10 ng/mL foi feita uma solução intermediária utilizando 10 μ L da solução estoque de PMA (1mg/mL; 1622Um) em

10mL de RPMI, para termos uma concentração de 1ug/mL. Dessa solução foram pipetados 30uL em cada um dos poços, para concentração final de 10ng/mL. Para o teste com a concentração de 150 nM foi feita uma solução intermediária utilizando 6,2uL da solução estoque de PMA em 10mL de RPMI, para obtermos uma concentração de 1uM. Dessa solução foram pipetados 450uL em cada um dos poços para obter concentração final de 150nM.

Além disso, também foram feitas análises da diferenciação induzida por PMA em dois tempos: 24 e 48 horas, em que, o meio foi substituído por meio completo (RPMI+10%SFB) sem adição de PMA após 24 horas de diferenciação, para as análises das 48 horas após a indução.

O processo de diferenciação de monócitos em macrófagos foi visualizado em microscópio, para análise da adesão celular dos macrófagos aos poços da placa de cultura após 24 horas e 48 horas de diferenciação celular. Após diferenciação, o meio foi descartado e as células foram lavadas com 2 mL de PBS (“Solução salina tamponada com fosfato”) e posteriormente, tripsinizadas com 500 µl de tripsina e incubada a 37°C com 5% CO₂ por 5 minutos. Em seguida, foram feitas ressuspensões vigorosas para que as células desaderissem, já que *in vitro*, as células THP-1 diferenciadas em macrófagos se desenvolvem aderidas à superfície. Após a tripsinização, o excesso de células foi utilizado para montagem de nova garrafa (T75).

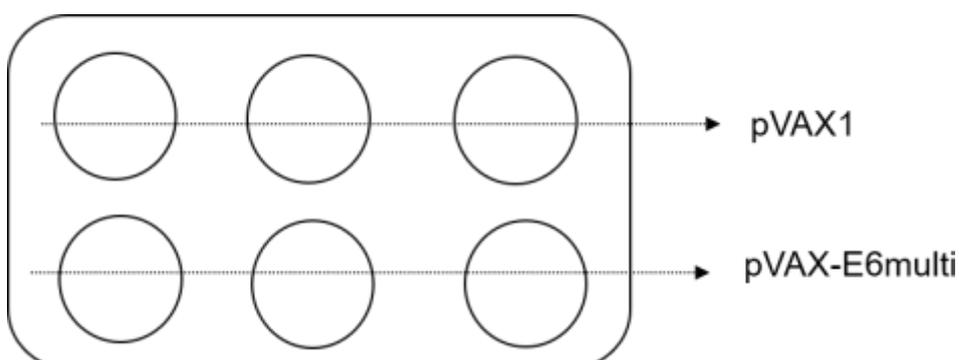
4.9 PADRONIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS THP-1 UTILIZADAS POR POÇO

Após o processo de diferenciação induzidos por PMA, as células THP-1 foram cultivadas em três densidades diferentes em placa de 6 poços (KASVI) e posteriormente induzidas por PMA na concentração 150nM conforme mencionado no item 4.9. Sendo assim, o cultivo foi feito em duplicata para as concentrações de 1×10^6 , $1,5 \times 10^6$ e 2×10^6 a fim de observar qual a melhor densidade celular de macrófagos diferenciados por poço.

4.10 TRANSFECCÃO DOS MACRÓFAGOS COM DNA PLASMIDIAL E6MULT

Para a diferenciação em macrófagos, as células THP-1 foram semeadas na densidade de 2×10^6 em placas de 6 poços e incubadas em meio RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino contendo 150 nM de PMA, por um período de 24 horas. Após esse período, foi realizada a troca do meio de cultivo contendo PMA por meio RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino para nova incubação por 24 horas em estufa de CO₂ a 37°C. As células THP-1 diferenciadas em macrófagos foram transfectadas transientemente com a construção vacinal (2.500 ng por poço) e o vetor vazio pVAX1 (**Figura 8**), ambos em triplicata utilizando o reagente Lipofectamine™ 3000 (Invitrogen) segundo as instruções do fabricante.

Figura 8: Esquema de transfecção das células THP-1 diferenciadas para macrófagos com o DNA plasmidial.



Fonte: A autora (2024).

4.10.1 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL DAS CÉLULAS DE MACRÓFAGOS TRANSFECTADAS

Para confirmação e quantificação das transfecções realizadas no período de 24 horas, foi realizada a extração do RNA total das células em cultivos utilizando o PureLink™ RNA Mini Kit segundo as instruções do fabricante. Todo material utilizado para extração e manipulação do RNA foi tratado ou adquirido livre de RNases. A verificação da quantidade do RNA isolado e o seu grau de pureza foi feita através do uso do Nanodrop (Thermo Scientific) considerando as razões 260/280. Os estoques de RNA total foram mantidos a -80°C.

4.10.1 SÍNTESE DE cDNA

O cDNA foi sintetizado utilizando o protocolo sugerido pelos fabricantes do kit High capacity cDNA reverse transcription - Applied Biosystem (Thermo Fisher Scientific) seguindo as recomendações do fabricante. Para isso, o RNA foi preparado seguindo as instruções do kit DNase I, livre de RNase (1 U/ μ L) para preparação de RNA livre de DNA antes de RT-qPCR como mencionado no item 4.6.

4.11 PCR EM TEMPO REAL (RT – qPCR)

Após a obtenção do RNA total das células cultivadas e subsequente produção do cDNA correspondente, foram realizadas análises de expressão do gene de interesse, para os marcadores: CD 68 (M0), CD80/CD86 - Molécula Co-estimulatória (Macrófago M1), CD206 - Receptor de Macrófagos M2. Para as RT-qPCRs foram utilizados primers específicos as sequências de interesse e a normalização feita com ACTB, conforme ilustrado na **tabela 2**. A amplificação dos genes alvo foi realizada no termociclador PCR em Tempo Real (CFX Opus) com primers específicos (**Tabela 2**), juntamente com os genes de referência GAPDH e EEF1A1 com intuito de calcular a expressão relativa dos genes alvos. Para cada gene também foram realizadas curvas de diluição de amostra de 1x, 10x, 100x, 1000x e 10000x para verificar a eficiência dos primers. As condições de ciclagem foram 95°C por 2 minutos para ativação da polimerase, seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos para desnaturação e 60°C por 1 minuto para anelamento e extensão. Assim, a média geométrica dos genes de referência foi utilizada para calcular a expressão relativa de todos os alvos nas amostras (Livak e Schmittgen 2001).

Tabela 2. Sequência dos oligonucleotídeos e temperatura de anelamento.

Primer	Sequência	Temperatura de Anelamento	Referência
E6m-H16_qPCR Forward	CGAGCTCGGATCCAT CAT	60°C	(Sales Leal, 2024)
E6m-H16_qPCR Reverse	TGCAGTAAACACATCC TG CC	60°C	(Sales Leal, 2024)
Human CD 68 Forward	CGAGCATCATTCTTTC AC CAGCT	60°C	Strobl H. et al., 1995, Br J Haematol. 90 (4): 774-82. Ogawa Y. et al., 1995, Pathol Int. 45 (9): 698-701. Sadovnikova E. et al., 2002, Leucemia. 16 (10): 2019-26. Gottfried E. et al., 2008, Scand J Immunol. 67 (5): 453-63. Strojnik T. et al., 2009, Anticancer Res. 29 (8): 3269-79.
Human CD 68 Reverse	ATGAGAGGCAGCAAG ATG GACC	60°C	Strobl H. et al., 1995, Br J Haematol. 90 (4): 774-82. Ogawa Y. et al., 1995, Pathol Int. 45 (9): 698-701. Sadovnikova E. et al., 2002, Leucemia. 16 (10): 2019-26. Gottfried E. et al., 2008, Scand J Immunol. 67 (5): 453-63. Strojnik T. et al., 2009, Anticancer Res. 29 (8): 3269-79.
Human CD 80 Forward	CTCTTGGTGCTGGCT GGT CTTT	60°C	Chen YQ, et al. (2006) CD28/CTLA-4--CD80/CD86 and ICOS--B7RP-1 costimulatory pathway in bronchial asthma. Allergy. 61(1): 15-26. Rau FC, et al. (2009) B7-1/2 (CD80/CD86) direct signaling to B cells enhances IgG secretion. J Immunol. 183(12): 7661-71. Dai ZS, et al. (2009) Defective expression and modulation of B7-2/CD86 on B cells in B cell chronic lymphocytic leukemia. Int J Hematol. 89(5): 656-63.
Human CD 80 Reverse	GCCAGTAGATGCGAG TTT GTGC	60°C	Chen YQ, et al. (2006) CD28/CTLA-4--CD80/CD86 and ICOS--B7RP-1 costimulatory pathway in bronchial asthma. Allergy. 61(1): 15-26. Rau FC, et al. (2009) B7-1/2 (CD80/CD86) direct signaling to B cells enhances IgG secretion. J Immunol. 183(12): 7661-71. Dai ZS, et al. (2009) Defective expression and modulation of B7-2/CD86 on B cells in B cell chronic lymphocytic leukemia. Int J Hematol. 89(5): 656-63.
Human CD 86 Forward	CCATCAGCTTGTCTGT TT CATTCC	60°C	Chen YQ, et al. (2006) CD28/CTLA-4--CD80/CD86 and ICOS--B7RP-1 costimulatory pathway in bronchial asthma. Allergy. 61(1): 15-26. Rau FC, et al. (2009) B7-1/2 (CD80/CD86) direct signaling to B cells enhances IgG secretion. J Immunol. 183(12): 7661-71.

			Dai ZS, et al. (2009) Defective expression and modulation of B7-2/CD86 on B cells in B cell chronic lymphocytic leukemia. <i>Int J Hematol.</i> 89(5): 656-63.
Human CD 86 Reverse	GCTGTAATCCAAGGAA TG TGGTC	60°C	Chen YQ, et al. (2006) CD28/CTLA-4--CD80/CD86 and ICOS--B7RP-1 costimulatory pathway in bronchial asthma. <i>Allergy.</i> 61(1): 15-26. Rau FC, et al. (2009) B7-1/2 (CD80/CD86) direct signaling to B cells enhances IgG secretion. <i>J Immunol.</i> 183(12): 7661-71. Dai ZS, et al. (2009) Defective expression and modulation of B7-2/CD86 on B cells in B cell chronic lymphocytic leukemia. <i>Int J Hematol.</i> 89(5): 656-63.
Human CD 206 Forward	ACACAAACTGGGGG AAA GGTT	60°C	https://bmcimmunol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12865-022-00529-w#MOESM1
Human CD 206 Reverse	TCAAGGAAGGGTCG GAT CG-	60°C	https://bmcimmunol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12865-022-00529-w#MOESM1
GAPDH Forward	GAAGGTGGGGCTCA TTTG	60°C	(São Marcos et al. 2022)
GAPDH Reverse	TTAAAAGCAGCCCT GGTG	60°C	(São Marcos et al. 2022)
EEF1A1 Forward	GTTGCGGTGGGTGT CATCA	60°C	(São Marcos et al. 2022)
EEF1A1 Reverse	GAGTGGGGTGGCA GGTAT	60°C	(São Marcos et al. 2022)

4.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

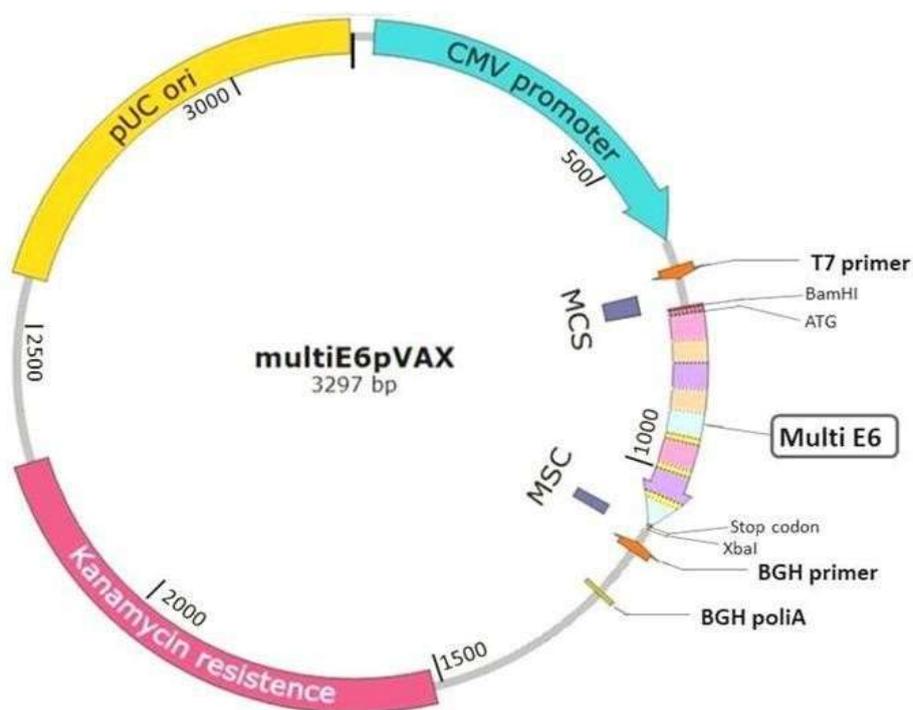
A distribuição dos dados foi verificada por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov. Todas as amostras que adotarem distribuição normal foram utilizadas para esse fim e para isso foi realizado o teste Ordinary One-way ANOVA. Resultados com valor de $p\text{-value} < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism versão 9.0.0 (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA, EUA).

5. RESULTADOS

5.1 OBTENÇÃO DO PLASMÍDEO VACINAL

A construção vacinal do presente estudo foi resultante da clonagem do inserto E6multi no vetor de expressão pVAX1 em orientação *BamHI/XbaI*, resultando em um plasmídeo pVAX1-E6multi com 3.297 pb (**Figura 9**). Os clones foram confirmados através de PCR e clivagem pelas respectivas enzimas de restrição (**Figura 9**) e sequenciamento de DNA. Para a análise do sequenciamento, foram utilizados os programas Pregap4 (pacote Staden V. 1.5) e Bio Edit V. 7.1

Figura 9. Mapa do plasmídeo pVAX1 contendo o inserto E6multi clonado em orientação *BamHI/XbaI*. Mapa construído através do programa SnapGene v.4.0.8.



Fonte: A autora (2024).

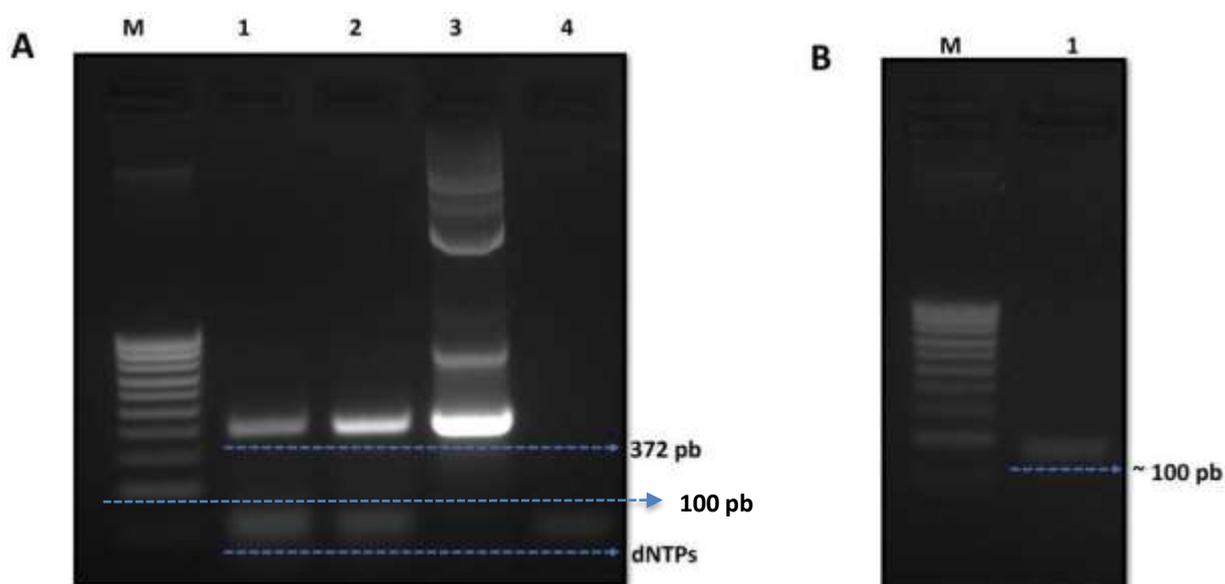
5.2 ANÁLISE DA EXTRAÇÃO DO RNA

A quantidade e o grau de pureza do RNA extraído das células HEK 293T transfectadas com pVAX1 e pVAX1-E6multi, foi medida no Nanodrop (Thermo Scientific) considerando as razões 260/280 e as amostras foram 91.1 ng/μl e 15 ng/μl referente a pVAX1-E6multi. Já para as amostras do vetor vazio (pVAX1), os resultados foram: 90 ng/μl e 102 ng/μl. A amostra referente a pVAX1- E6multi de 15 ng/ul foi descartada das análises devido a sua baixa concentração.

5.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE E6MULTI A PARTIR DA RT-PCR

A **Figura 10-A)** ilustra o resultado da amplificação do E6multi, a qual gerou o produto esperado de 372 pares de bases. O produto da amplificação obtido pela PCR não apresentou bandas inespecíficas, indicando a especificidade da amplificação. A **Figura 10-B)** refere-se à amplificação do pVAX1 a qual gerou o produto esperado de 100 pares de bases, pois a amplificação foi feita apenas de uma pequena sequência desse vetor.

Figura 10: Análise do produto de amplificação por PCR do E6multi e pVAX1. A) Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio. A Análise do produto de amplificação: Canaleta 1: Marcador de peso molecular (DNA Ladder Gene Ruler 1Kb – ThermoScientific); Canaleta 2 e 3: Produtos da amplificação - E6multi (372 pb) e a banda inespecífica (dNTPs); Canaleta 4: Controle positivo da reação – extração de DNA do pVAX1-E6multi; Canaleta 4: Controle negativo da reação. B) Análise do produto de amplificação por PCR do pVAX1 vazio: Canaleta 1: Marcador de peso molecular (DNA Ladder Gene Ruler 1Kb – ThermoScientific); Canaleta 2: Produto da PCR de um fragmento específico do vetor pVAX1 ~100 pb. corrida: 35 minutos a 80V.

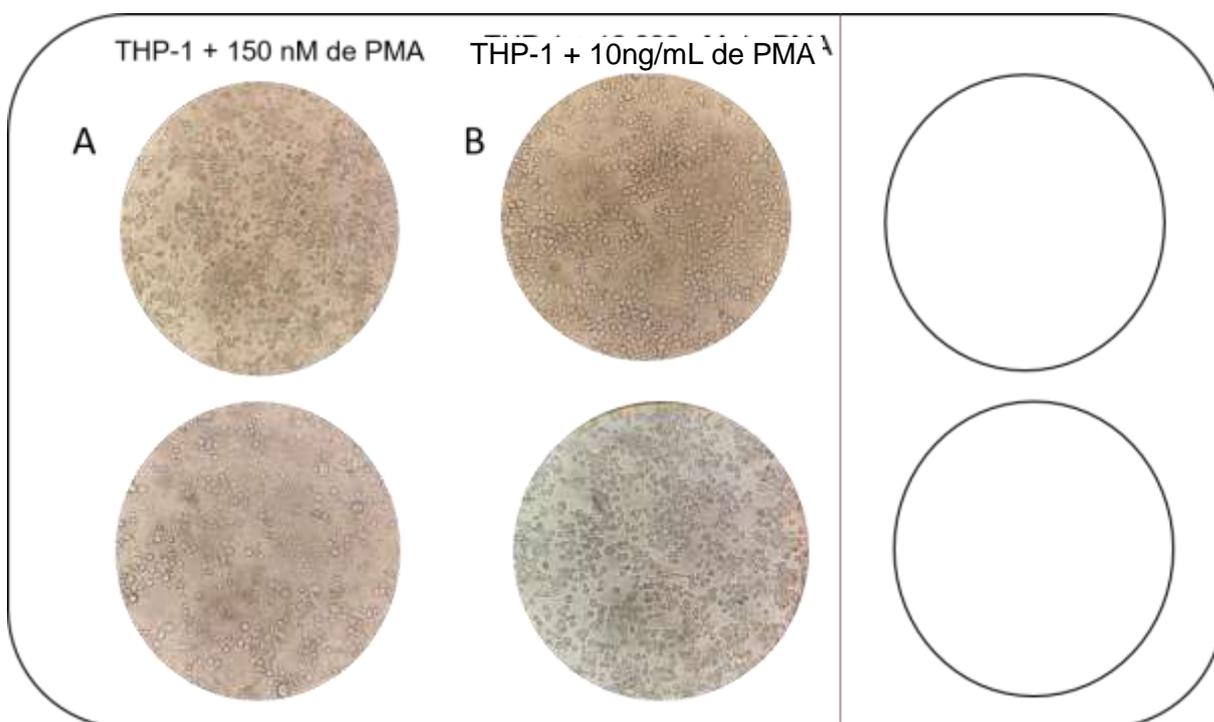


Fonte: A autora (2024).

5.4 ANÁLISE DA DIFERENCIAÇÃO CELULAR INDUZIDA POR PMA

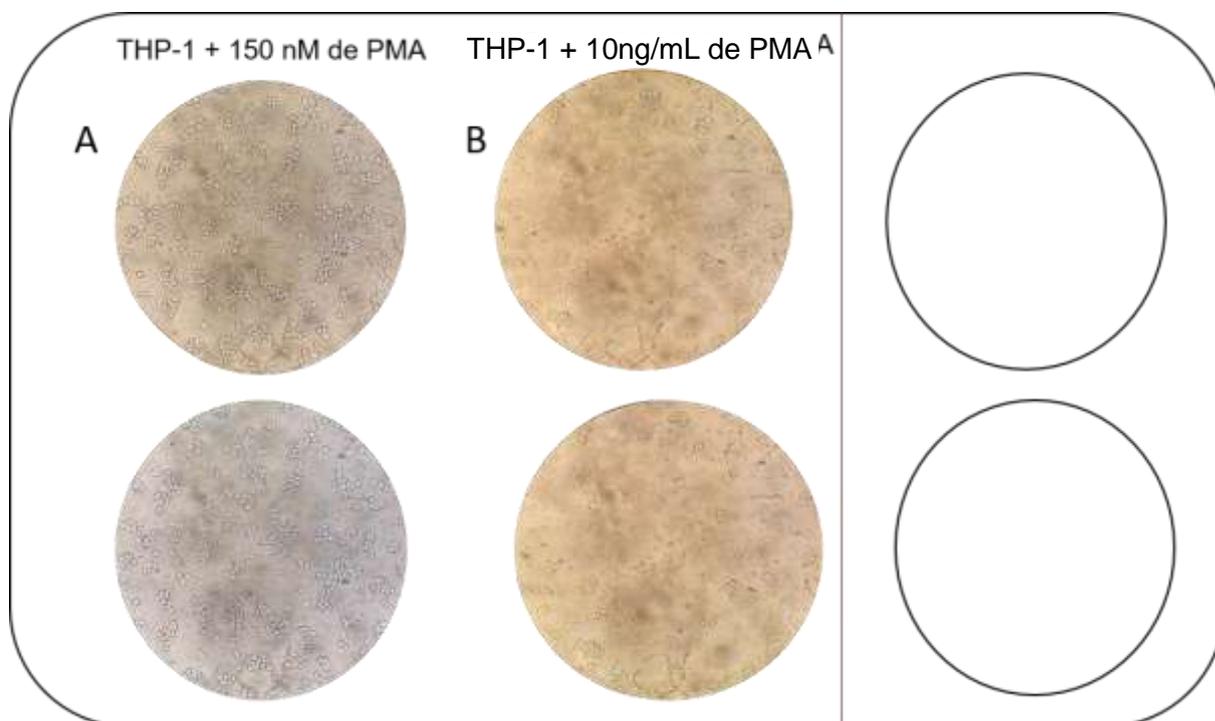
Com o intuito de observar a concentração ideal de PMA para diferenciação dos monócitos em macrófagos, foram realizadas duplicatas com a concentração de 10 ng/mL e 150 nM de PMA na placa de 6 poços. Cerca de $0,5 \times 10^5$ de células foram diferenciadas com as duas concentrações de PMA (10 ng/mL e 150 nM) e após 24 horas foram observadas em microscópio para verificar se as células tinham se tornado aderidas, o que indica diferenciação em macrófagos, como ilustrado na **Figura 11**. Além disso, após 24 horas de diferenciação o meio foi substituído por meio completo (RPMI + 10% SFB) sem adição de PMA e cerca de 48 horas após a adição de PMA, as células foram observadas no microscópio (**Figura 11**). Os resultados demonstram que não houve mudança significativa de células diferenciadas entre as concentrações utilizadas, sendo adotada a concentração de 150 nM (~ 92,5 ng/mL) para realização dos experimentos futuros.

Figura 11: Resultado da diferenciação das células THP-1 após 24 horas da indução com PMA. A) representa a coluna referente a indução das células THP-1 com 150 nM de PMA, em duplicata. B) representa a coluna referente a indução das células THP-1 com 10 ng/mL de PMA, em duplicata. Todas as imagens representam a média de 5 campos observados em objetiva de 40X em microscópio óptico. A terceira coluna de poços não foi utilizada.



Fonte: A autora (2024).

Figura 12: Resultado da diferenciação das células THP-1 após 48 horas da indução com PMA. A) representa a coluna referente a indução das células THP-1 com 150 nM de PMA, em duplicata. B) representa a coluna referente a indução das células THP-1 com 10 ng/mL de PMA, em duplicata. Todas as imagens representam a média de 5 campos observados em objetiva de 40X em microscópio óptico. A terceira coluna de poços não foi utilizada.

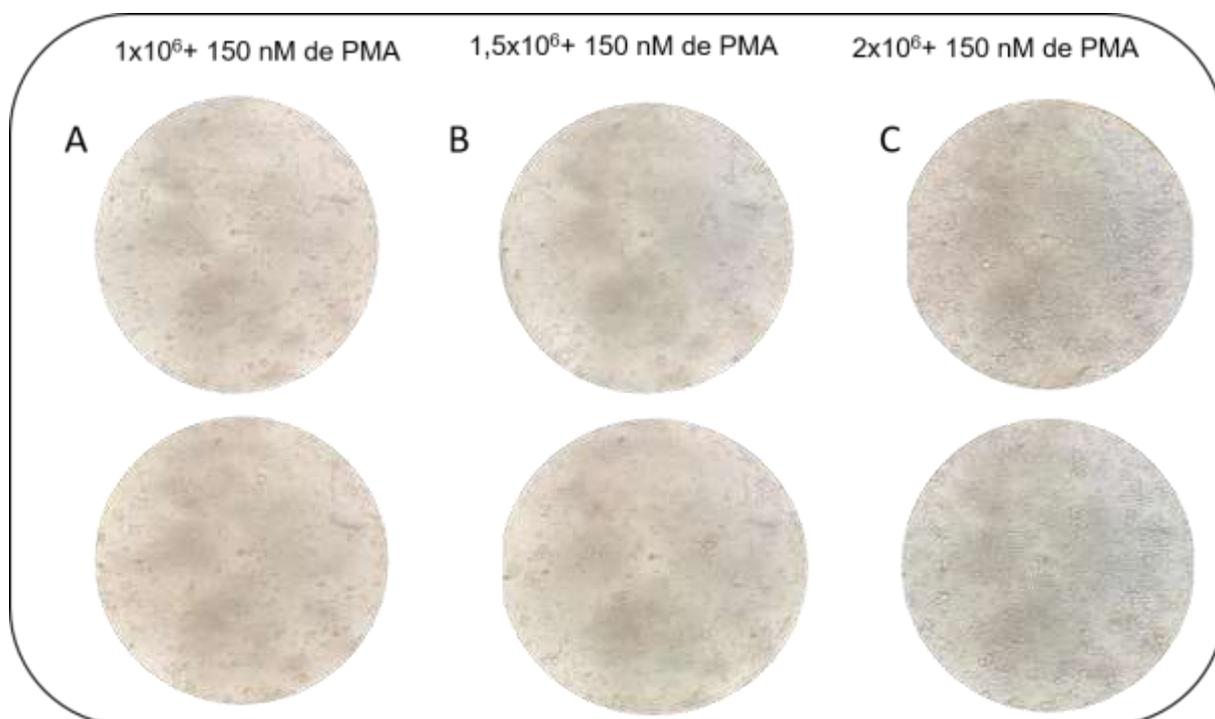


Fonte: A autora (2024).

5.5 PADRONIZAÇÃO DA DENSIDADE DE CÉLULAS THP-1 UTILIZADAS POR POÇO

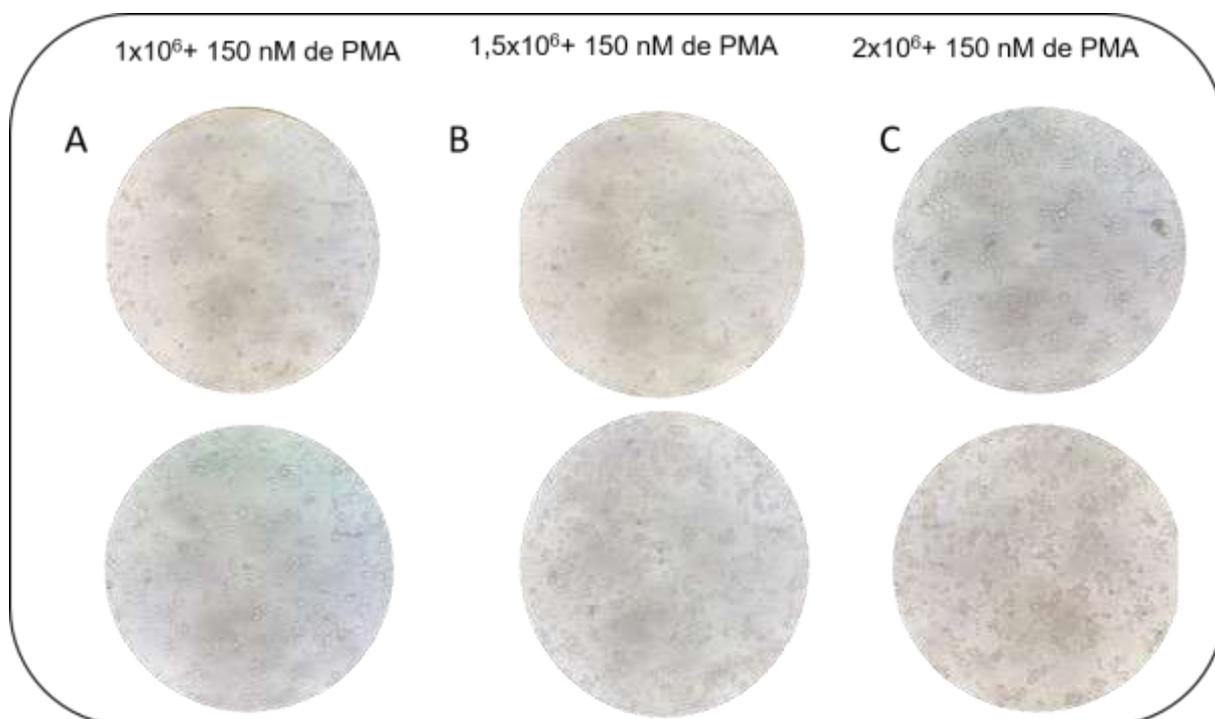
Três densidades de células THP-1 foram testadas para diferenciação com 150 nM de PMA: 1×10^6 , $1,5 \times 10^6$ e 2×10^6 e observadas 24 e 48 horas após indução com PMA como ilustrado na **Figura 13**. Os resultados demonstram que a densidade de 2×10^6 foi a que demonstrou uma maior quantidade de células diferenciadas por poço, como esperado.

Figura 13: Resultado da diferenciação das células THP-1 após 24 horas da indução com PMA. A) representa a coluna referente a indução de 1×10^6 de células THP-1 com 150 nM de PMA, em duplicata. B) representa a coluna referente a indução de $1,5 \times 10^6$ células THP-1 com 150 nM de PMA, em duplicata. C) representa a coluna referente a indução de 2×10^6 células THP-1 com 150 nM de PMA, em duplicata. Todas as imagens representam a média de 5 campos observados em objetiva de 40X em microscópio óptico.



Fonte: A autora (2024).

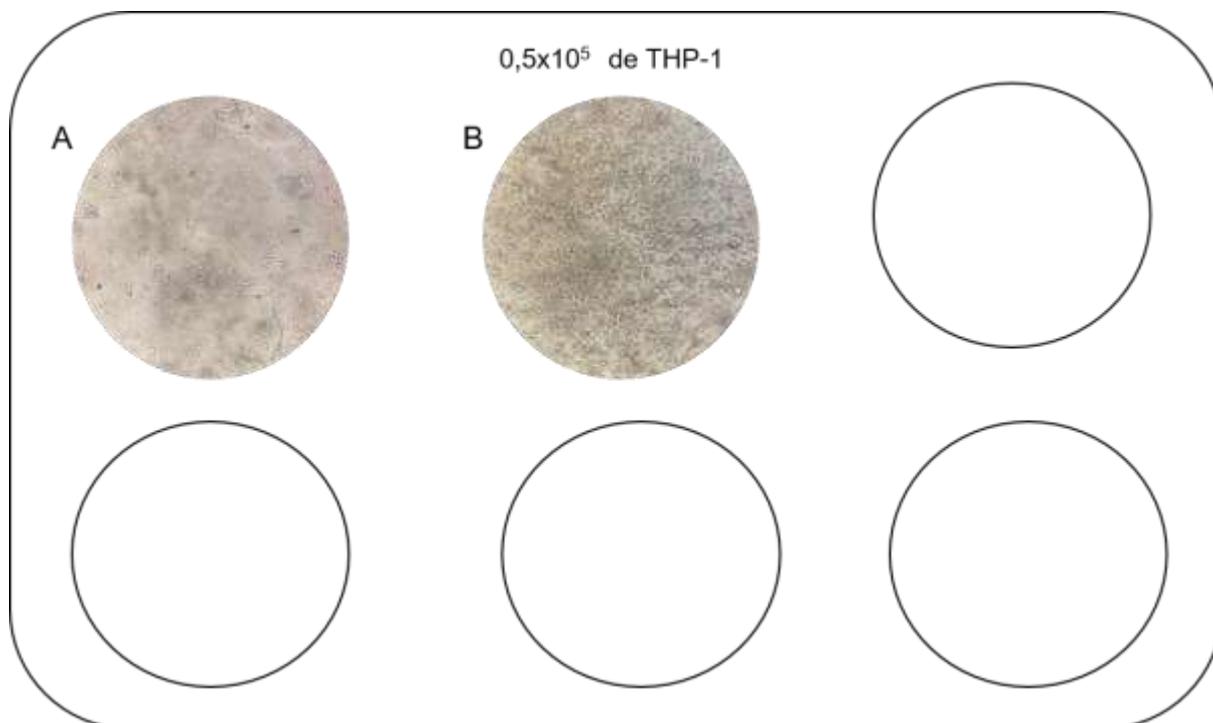
Figura 14: Resultado da diferenciação das células THP-1 após 48 horas da indução com PMA. A) representa a coluna referente a indução de 1×10^6 de células THP-1 com 150 nM de PMA, em duplicata. B) representa a coluna referente a indução de $1,5 \times 10^6$ células THP-1 com 150 nM de PMA, em duplicata. C) representa a coluna referente a indução de 2×10^6 células THP-1 com 150 nM de PMA, em duplicata. Todas as imagens representam a média de 5 campos observados em objetiva de 40X em microscópio óptico.



Fonte: A autora (2024).

Como previsto, os macrófagos humanos derivados de monócitos aumentaram seu volume citoplasmático em comparação com os monócitos (**Figura 15**). O tratamento com PMA além de aumentar o volume citoplasmático em células THP-1 em relação aos monócitos, aumentou a aderência das células THP-1 em relação às células não tratadas, como é possível observar pela morfologia estrelada (**Figura 13 e 14**).

Figura 15: Células THP-1 sem adição de PMA. Coluna A e B representam $0,5 \times 10^5$ de células THP-1 sem exposição ao PMA após o cultivo de 24 horas.



Fonte: A autora (2024).

5.6 ANÁLISE DA EXTRAÇÃO DO RNA

A partir do RNAm obtido pela extração através da metodologia descrita no item 4.10, foi avaliada a expressão gênica dos genes listados na **Tabela 3** abaixo, juntamente com a expressão dos genes alvos (**Tabela 2**), por PCR em tempo real. Os valores da quantificação dos RNAm, feitos no NanoDrop (A260/A280), após 24 horas de transfecção e estão listados na **Tabela 3** abaixo.

Tabela 3: Valores dos RNAm do pVAX1-E6multi após 24 horas de transfecção e do controle negativo (pVAX1 vazio).

		24 h
pVAX1 vazio	ng/mL	396,7
	260/280	2,03
pVAX1 vazio	ng/mL	389,7
	260/280	2,05
pVAX1 vazio	ng/mL	349,4
	260/280	2,01
pVAX1-E6multi	ng/mL	322,5
	260/280	2,03
pVAX1-E6multi	ng/mL	309,9
	260/280	2,03
pVAX1-E6multi	ng/mL	225,4
	260/280	2,03

Fonte: A autora (2024).

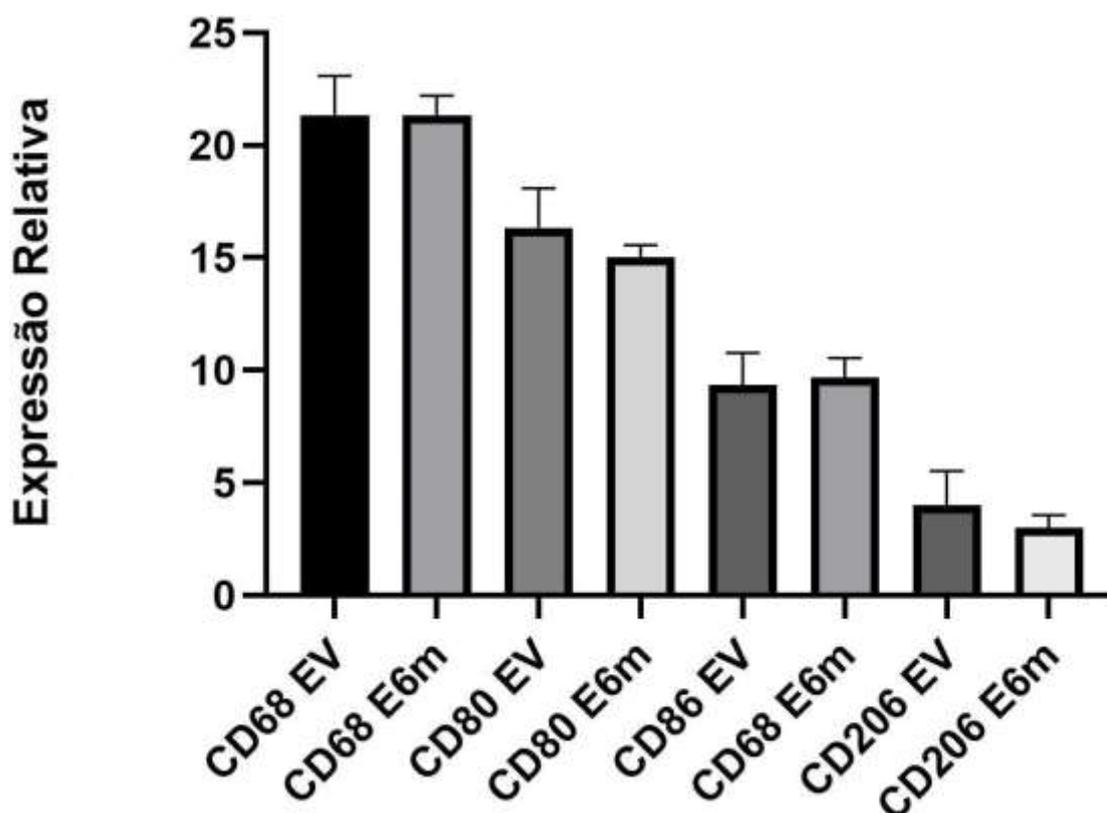
5.7 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

As amostras foram avaliadas quanto ao perfil de expressão dos marcadores de superfície dos macrófagos em diferentes fenótipos: CD68 (Macrófagos M0), CD80 e CD86 (Macrófagos M1) e CD206 (Macrófagos M2), considerando $p < 0,05$ (**Figura 16**).

A demonstração de expressão significativa de CD68, foi condizente com o fenótipo de macrófagos M0 - células imunes inatas diferenciadas de monócitos, sem ativação. Em contrapartida, a baixa expressão de CD206 (M2 - anti-inflamatórios e pró-tumorais) é esperada, já que esse fenótipo é característico de uma resposta adaptativa, o que não se espera nesta análise. Quanto a expressão dos marcadores

de superfície CD80 e CD86 (M1) houve uma expressão significativa, como também esperada, visto que, a diferenciação de macrófagos THP-1 por PMA também causa ativação em direção ao estado M1 (Park et al., 2007), como também, é descrito na literatura que o uso de lipossomo no processo da transfecção induz o tipo de polarização M1 (Pinto et al., 2021). Porém, em termos de expressão total o CD68 é predominante, como esperado. Além disso, foi possível observar a expressão do vetor vazio para os CDs analisados, sendo assim, não é possível comparar o vetor vazio (pVAX1) com o vetor adicionado com o E6 multiepítopo (pVAX-E6multi).

Figura 16: Expressão dos marcadores de superfície de macrófagos. Expressão de proteínas do HPV. Gráfico de classificação do teste Kruskal-Wallis com mediana. Estatística foi encontrada significância com $p < 0,05$ entre a expressão dos marcadores CD68, CD80, CD86 e CD206 para E6multi e vetor vazio (EV).



6. DISCUSSÃO

No presente estudo, foi utilizada cultura de linhagem monocítica humana (THP1). Essas células adquirem características aderentes quando estimuladas com acetato de forbol miristato (PMA), indutor de diferenciação mais comumente utilizado para células THP-1 (Chanput, W. et al., 2013; Daigneault, M. et al., 2010). As células THP-1 tem sido extensivamente empregada em pesquisas direcionadas para monócitos e macrófagos. Isso é viável devido à sua capacidade de diferenciação mediante o uso de PMA, o que resulta na aquisição de características fenotípicas e semelhantes aos dos macrófagos humanos primários (Feng et al., 2004; Park et al., 2007; Liu et al., 2023). Os macrófagos aderem a superfície lisa da placa de cultura através de integrinas e outros receptores que dependem de cátions (Maurya et al., 2007).

Os relatos atuais sobre as concentrações de PMA usadas na diferenciação de THP-1 variam de 5 ng/mL a 200 ng/mL (Lud et al., 2016 e Parque et al., 2007), e os relatos sobre o tempo de indução para células THP-1 também são diferentes, como 24 e 48 horas (Graham et al., 2016 e Chou et al., 2002). Ao mesmo tempo, a densidade de semeadura das células THP-1 está intimamente relacionada ao seu efeito de diferenciação. Portanto, é importante determinar o método ótimo para indução eficiente de células THP-1.

Neste estudo, a indução foi otimizada avaliando os efeitos de diferenciação de macrófagos sob duas condições, que são diferentes concentrações de PMA, e diferentes densidades de semeadura celular. O estímulo da indução com PMA foi retirado após 24 horas, seguindo os protocolos otimizados conforme descrito na literatura (He et al., 2021; Liu et al., 2023; Genin et al., 2015; MAEß et al., 2014 e Smith, et al., 2015). Em paralelo, outra condição de tempo de crescimento celular foi testada e o meio de cultura não foi trocado após 24 horas de indução por PMA. Isso resultou na morte das células e no seu desprendimento da superfície, pois, devido ao tempo de indução prolongado, a concentração de PMA diminuiu e as células aderentes se arredondam e se desprenderam gradualmente da superfície. O intervalo

de tempo em que a indução é realizada também desempenha um papel significativo na diferenciação das células THP-1.

Estudos indicam que um período de repouso após o tratamento com PMA melhora a diferenciação de monócitos em macrófagos. Isso inclui um aumento na razão citoplasmático/nuclear, maior número de mitocôndrias e lisossomos, e mudanças em marcadores de superfície celular que se assemelham aos macrófagos primários derivados de monócitos humanos (Daigneault et al., 2010). Outro estudo realizado por Lund et al. demonstrou que expor células THP-1 ao PMA seguido de um repouso de 24 horas é o protocolo ideal para a diferenciação dessas linhagens monocíticas (Lund et al., 2016). Esses achados reforçam a importância de incorporar um período de repouso na metodologia de diferenciação mediada por PMA das células THP-1.

Usar uma concentração muito baixa de PMA pode levar a uma diferenciação insuficiente, mas uma concentração muito alta de PMA terá certos efeitos tóxicos nas células. Duas concentrações de PMA foram utilizadas para indução da diferenciação celular: 10 ng/mL e 150 nM (~ 92,5 ng/mL) com intuito de comparar qual a concentração promove uma melhor diferenciação de monócitos em macrófagos (He et al., 2021 e Genin et al., 2015 e Smith, et al., 2015). A análise por microscopia óptica revelou alterações na morfologia induzida por PMA, incluindo aumento da adesão celular e morfologia da disseminação para ambas as concentrações testadas.

Embora ambas as concentrações tenham apresentado efeito sobre a atividade proliferativa das células THP-1, a concentração de 150 nM que corresponde a 92,5 ng/mL teve um notório efeito de indução e por isso foi escolhida para dar continuidade aos experimentos. As células apresentaram alterações na morfologia, como aumento significativo do volume citoplasmático com aumento da aderência ao poço após 24 horas de indução com PMA e repouso de 24 horas com meio RPMI suplementado com 10% de SFB, como também observado por Liu et al., 2023.

Como mostrado na **Figura 11**, o tratamento das células THP-1 com PMA provocou mudanças morfológicas, transformando-as de células em suspensão (estado monocítico) para células aderentes (estado de macrófago) sendo caracterizadas como maiores, poligonais com pseudopodia estendido e núcleo

irregular. Além disso, o tratamento com PMA também diminuiu a atividade proliferativa das células THP-1 (**Figura 11**).

A densidade de semeadura também é muito importante para a indução da diferenciação celular, sendo assim, no presente estudo foram testadas três concentrações diferentes, 1×10^6 , $1,5 \times 10^6$ e 2×10^6 de células THP-1 (**Figura 13**). A densidade de crescimento é fundamental para a vida celular, especialmente para células que dependem umas das outras. Se a densidade de crescimento for muito baixa, haverá uma quantidade insuficiente de substâncias ativas promotoras do crescimento secretadas pelas células, o que prejudica o crescimento e a diferenciação celular. Além disso, grandes distâncias entre as células dificultam a formação de conexões ou adesões, comprometendo a comunicação celular (Wilson, et al., 2015).

Por outro lado, uma densidade celular excessivamente alta resulta em espaço insuficiente para o crescimento, impedindo que as células adiram completamente à superfície e que os pseudópodes se estendam adequadamente, levando a uma diferenciação deficiente (Wilson, et al., 2015). Portanto, é crucial identificar densidades de crescimento adequadas para a diferenciação das células THP-1. Neste estudo, a indução foi realizada 24 horas após o cultivo e a concentração escolhida foi a de 2×10^6 com intuito de obter mais células diferenciadas, respeitando o espaço da placa de 6 poços.

Uma vez otimizado o método para diferenciação induzida por PMA de células THP-1 em macrófagos, o passo seguinte foi transfectar estes macrófagos com a construção vacinal (pVAX – E6multi). Para esta pesquisa, foi utilizada a construção de uma vacina multiepítipo. A inclusão de três segmentos de epítomos provenientes do oncogene viral E6, possibilita a entrega simultânea de diversos epítomos utilizando o mesmo método de entrega. Isso, por sua vez, amplia as oportunidades de ativação de diversos alelos do MHC. Além disso, essa abordagem também minimiza as probabilidades de evasão por parte de células cancerígenas mutantes direcionadas a um epítipo específico (Bae et al., 2015; Lopes et al., 2019).

De acordo com alguns estudos, credita-se que a inclusão de mais de um epítipo estimulador do sistema imunológico na formulação da vacina poderia resultar na competição entre eles pelos locais de ligação no complexo principal de

histocompatibilidade (MHC) dentro da mesma célula (Cordeiro et al. 2018; Khalili et al. 2015). Dessa forma, ao elaborar a construção vacinal, também se aumentou a atenção à potencialização dessas sequências por meio da incorporação de locais destinados à clivagem proteossômica e lisossômica (HEYGAEALERAG e AAY), além de sítios que se ligam ao transportador TAP, com o objetivo de aprimorar a exposição do antígeno vacinal.

A estratégia adotada para aprimorar a apresentação dos epítomos envolveu a duplicação de cada fragmento, organizada de maneira que cada réplica fosse cercada com um dos sítios de clivagem nas extremidades. Isso foi uma tentativa adicional para melhorar a apresentação do epítomo, visando um processamento mais eficaz. Adicionalmente, procedeu-se com a otimização da sequência viral original dos epítomos, ajustando-a para uma expressão eficaz em *Mus Musculus*, com o objetivo de intensificar a produção de proteínas e conseqüentemente, a eficácia imunogênica da vacina. As vacinas contra o câncer constituem uma estratégia promissora para provocar uma resposta imunológica específica e de longa duração (mediante a formação de células T de memória) direcionada a antígenos presentes nos tumores (Lopes et al. 2017).

Os resultados do experimento relativo à avaliação da expressão do antígeno vacinal confirmam que a construção de pVAX1-E6multi de forma funcional é capaz de permitir a expressão de E6 em células eucarióticas. A construção vacinal usada neste estudo teve a integridade da sua sequência confirmada por sequenciamento e pode ser empregada em testes *in vitro* de transfecção dos monócitos diferenciados em macrófagos.

Há diversas técnicas bem estabelecidas para a transfecção de células de mamíferos. Os métodos mais usados envolvem agentes químicos de transfecção que formam complexos com ácidos nucleicos carregados, facilitando assim seu transporte para dentro das células. Os reagentes mais comuns são baseados em diferentes tipos de lipídios ou podem ser escolhidos entre vários polímeros catiônicos (MAEß et al., 2014 e Morille et al., 2008).

Os macrófagos são conhecidos por serem difíceis de transfectar, pois evoluíram para reconhecer ácidos nucléicos estranhos e iniciar uma resposta imune

a essas moléculas (Keller et al., 2018). A maioria das técnicas de transfecção consolidadas diminui significativamente sua viabilidade ou altera seu comportamento, como a diferenciação e, em particular, a polarização (MAEß et al., 2014). Apesar disso, nossa transfecção foi eficiente e obtivemos o perfil de expressão dos marcadores de macrófagos M0, M1 e M2.

Uma vez diferenciadas em macrófagos (M0), as células THP-1 foram testadas quanto a eficiência de transfecção com o antígeno vacinal (pVAX-E6multi) e o controle negativo (pVAX1) e posterior extração do RNA e RT-qPCR para medir a expressão dos marcadores de macrófagos M0, M1 e M2. Os marcadores de superfície macrofágica CD68 para M0, CD80 e CD86 para M1 e CD206 para M2 foram analisados conforme sua expressão em nível de RNAm.

Os achados da **Figura 16** nos mostram que as células se tornaram aderentes e a expressão de marcadores macrofágicos CD68 reconhecidos, o que confirma a diferenciação monócito em macrófago, condizentes com a polarização M0 significativa na população. O fenótipo M1 foi caracterizado pelos marcadores CD80 e CD86 e obtiveram uma expressão significativa também, porém, não podemos dizer com certeza se isso é devido a resposta para o antígeno E6 ou uma resposta a transfecção, visto que, esse achado pode ser devido ao estímulo do lipossomo em induzir a polarização M1 como observado em estudos conduzidos por (Boutillier e ElSawa, 2021; Choe et al., 2019 e Ye et al., 2019). Como o primeiro contato da célula é o lipossomo (no momento da transfecção) a primeira resposta pode ser ao lipossomo e espera-se uma polarização para M1, como observado também no vetor vazio.

Também verificamos a expressão para o marcador M2 (CD206) e como ilustrado na **Figura 16** não foi observada expressão significativa desse gene, o que foi condizente com o esperado. Nesse aspecto, os achados se encaixam bem com a visão de que os macrófagos têm a capacidade de perceber o microambiente ao seu redor e ajustar sua polaridade em resposta. Essa plasticidade é uma característica fundamental dos macrófagos (Mosser e Edwards, 2008).

Esse é um modelo de criação, porém é necessário fazer ajustes para entender o real motivo do vetor vazio também induzir a expressão para os marcadores de superfície de macrófagos, visto que, não houve diferença significativa entre o antígeno

vacinal (pVAX-E6multi) e o controle negativo (pVAX1). Para além do efeito de polarização que a própria molécula de DNA é capaz de induzir, esperava-se que a construção com E6multi tivesse uma expressão gênica maior para os marcadores M1, visto que, esse gene após transfectado e expresso, seria apresentado e por isso causaria um maior efeito. Logo, testes com THP-1 e o lipossomo sem o vetor se faz necessário para observar o perfil de M1, como também, testes de co-cultivo com linfócitos para análise desse sistema quanto a sua viabilidade e estudo da resposta imune adaptativa.

7. CONCLUSÕES

A expressão do antígeno vacinal foi confirmada com sucesso, validando a eficácia da construção plasmidial utilizada e garantindo que o E6 multiepítipo é adequadamente expresso em células eucarióticas derivadas de mamíferos. A diferenciação de células THP-1 em macrófagos M0 utilizando PMA foi eficaz, comprovando a viabilidade da técnica adotada neste estudo. Além disso, a transfecção de macrófagos derivados de células THP-1 com o DNA plasmidial E6multi mostrou-se eficaz; no entanto, a resposta imunológica pode ser influenciada pelo lipossomo no processo de transfecção com o vetor vazio, sugerindo a necessidade de otimização adicional para separar os efeitos do vetor da resposta ao antígeno.

A análise do perfil dos macrófagos revelou a presença de marcadores típicos dos diferentes estados de polarização, com os macrófagos expressando CD68, o que confirma seu estado basal (M0), e demonstrando a expressão dos marcadores M1 (CD80/CD86) e M2 (CD206), indicando uma resposta polarizada conforme o estímulo, essencial para entender a resposta imunológica mediada por vacinas de DNA. Para avançar, são necessários testes adicionais com THP-1 utilizando lipossomos sem o vetor, bem como testes de co-cultivo com linfócitos, a fim de analisar a viabilidade do sistema e caracterizar a resposta imune adaptativa.

8. REFERÊNCIAS

ABREU, Mery Natali Silva et al. Knowledge and perception of HPV in the population over 18 years of age in the city of Ipatinga-State of Minas Gerais, Brazil. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 23, n. 3, 2018.

AUWERX, J. The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia*, v. 47, n. 1, p. 22-31, 1991.

BARROS, Mário Henrique M. et al. Polarização de macrófagos: uma abordagem imuno-histoquímica para identificar macrófagos M1 e M2. *PLoS um*, v. 8, n. 11, p. e80908, 2013.

BASTIAAN-NET, Shanna et al. Caracterização bioquímica e funcional de proteínas imunomoduladoras fúngicas recombinantes (rFIPs). *Imunofarmacologia Internacional*, v. 15, n. 1, p. 167-175, 2013.

BOUCKENOOGHE, Thomas et al. Macrófagos do tecido adiposo (ATM) de pacientes obesos estão liberando níveis aumentados de prolactina durante um desafio inflamatório: um papel da prolactina na diabetes? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bases Moleculares da Doença*, v. 1842, n. 4, p. 584-593, 2014.

BRIANTI, Pina; DE FLAMMINEIS, Eduardo; MERCURI, Santo Rafael. Revisão de doenças e cânceres relacionados ao HPV. *New Microbiol*, v. 40, n. 2, p. 80-85, 2017.

CAO, J.; HAN, Z.; TIAN, L.; CHEN, K.; FAN, Y.; YE, B.; HUANG, W.; WANG, C.; HUANG, Z. Curcumin inhibits EMMPRIN and MMP-9 expression through AMPK-MAPK and PKC signaling in PMA induced macrophages. *J Transl Med.*, v. 12, p. 12:266, 2014.

CLARA, José A. et al. Visando vias de sinalização e o microambiente imunológico de células-tronco cancerígenas – uma atualização clínica. *Nature reviews clinical oncology*, v. 17, n. 4, p. 204-232, 2020.

CHANPUT, Wasaporn et al. Caracterização de macrófagos THP-1 polarizados e capacidade polarizadora de LPS e compostos alimentares. *Função Alimentícia*, v. 4, n. 2, p. 266-276, 2013.

CHANPUT, Wasaporn; MES, Jurriaan J.; WICHERS, Harry J. Linhagem celular THP-1: um modelo celular in vitro para abordagem de modulação imune. *Imunofarmacologia internacional*, v. 23, n. 1, p. 37-45, 2014.

CHEN, Q.; ROSS, A.C. Retinoic acid regulates cell cycle progression and cell differentiation in human monocytic THP-1 cells. **Exp Cell Res.**, v. 297, n. 1, p. 68-81, 2004.

CHEN, Y.-Q.; SHI, H.-Z. CD28/CTLA-4–CD80/CD86 and ICOS–B7RP-1 costimulatory pathway in bronchial asthma. **Allergy**, v. 61, n. 1, p. 15-26, 2006.

CUI, Huachun; LIU, Gangue. Como os RNAs não codificantes contribuem para a polarização dos macrófagos. **MicroRNAs e outros RNAs não codificantes na inflamação**, p. 59-84, 2015.

DAI, Zhen-sheng et al. Defective expression and modulation of B7-2/CD86 on B cells in B cell chronic lymphocytic leukemia. **International journal of hematology**, v. 89, p. 656-663, 2009.

DAIGNEAULT, Marc e cols. A identificação de marcadores de diferenciação de macrófagos em células THP-1 estimuladas por PMA e macrófagos derivados de monócitos. *PLoS one*, v. 5, n. 1, pág. e8668, 2010.

Davies, L. C., Jenkins, S. J., Allen, J. E., & Taylor, P. R. (2013). Macrófagos residentes em tecidos. *Imunologia da Natureza*, 14(10), 986-995.

ESTÊVÃO, Diogo et al. Marcas da carcinogênese do HPV: O papel das oncoproteínas E6, E7 e E5 na malignidade celular. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, v. 1862, n. 2, pág. 153-162, 2019.

GENIN, Marie et al. M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. **BMC cancer**, v. 15, p. 1-14, 2015.

GOTTFRIED, E. et al. Expression of CD68 in non-myeloid cell types. **Scandinavian journal of immunology**, v. 67, n. 5, p. 453-463, 2008.

GHATTAS, Majed et al. Vaccine technologies and platforms for infectious diseases: Current progress, challenges, and opportunities. *Vaccines*, v. 9, n. 12, p. 1490, 2021.

GRAHAM, Sheila V. Papilomavírus humano: expressão gênica, regulação e perspectivas de novos métodos diagnósticos e terapias antivirais. *Microbiologia futura*, v. 5, n. 10, pág. 1493-1506, 2010.

GRAHAM, Sheila V. O ciclo de replicação do papilomavírus humano e suas ligações com a progressão do câncer: uma revisão abrangente. *Ciência clínica*, v. 131, n. 17, pág. 2201-2221, 2017.

GUPTA, Sadhana M.; MANIA-PRAMANIK, Jayanti. ARTIGO RETRATADO: Mecanismos moleculares na progressão da carcinogênese cervical associada ao HPV. *Revista de ciências biomédicas*, v. 26, n. 1, pág. 1-19, 2019.

<https://bmcimmunol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12865-022-00529-w#MOESM1>

<https://bmcimmunol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12865-022-00529-w#MOESM1>

HE, Fang et al. Jaw periosteum-derived mesenchymal stem cells regulate THP-1-Derived macrophage polarization. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 9, p. 4310, 2021.

HJORT, Matthew R. et al. Alveolar epithelial cell-macrophage interactions affect oxygen-stimulated interleukin-8 release. **Inflammation**, v. 27, p. 137-145, 2003.

HOURANI, Tetiana et al. Tumor associated macrophages: origin, recruitment, phenotypic diversity, and targeting. **Frontiers in Oncology**, v. 11, p. 788365, 2021.

Inovio . *A Inovio relata os resultados financeiros e destaques clínicos do quarto trimestre e do ano de 2022* (2022). Disponível em: <https://www.prnewswire.com/news-releases/inovio-reports-fourth-quarter-and-full-year-2022-financial-results-and-clinical-highlights-301759942.html> .

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Volume 100B: Biological Agents*. Lyon: IARC, 2012. Disponível em: https://publications.iarc.fr/_publications/media/download/3339/5020105479f90d89c3f60b0e64a3e0c7d1e86cd1.pdf. Acesso em: 12 jul. 2024.

JORJANI, Parisa; OZTURK, Sadettin S. Effects of cell density and temperature on oxygen consumption rate for different mammalian cell lines. **Biotechnology and bioengineering**, v. 64, n. 3, p. 349-356, 1999.

Keller, A. A., Maeß, M. B., Schnoor, M., Scheiding, B., & Lorkowski, S. (2018). Transfecção de macrófagos. *Macrófagos: Métodos e Protocolos*, 187-195.

KHAN, Arshad et al. Macrophage heterogeneity and plasticity in tuberculosis. **Journal of leukocyte biology**, v. 106, n. 2, p. 275-282, 2019.

KRAMER, P. R.; WRAY, S. 17- β -Estradiol regulates expression of genes that function in macrophage activation and cholesterol homeostasis. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 81, n. 3, p. 203-216, 2002.

KOCJAN, Boštjan J. et al. Métodos moleculares para identificação e caracterização de novos papilomavírus. *Microbiologia Clínica e Infecção* , v. 21, n. 9, pág. 808-816, 2015.

LEQUEUX, Audrey et al. O direcionamento da atividade transcricional alfa do HIF-1 direciona as células efectoras imunes citotóxicas para o melanoma e melhora a imunoterapia combinada. **Oncogene**, v. 40, n. 28, p. 4725-4735, 2021.

LI, Xiaoyun et al. Navegando por vias metabólicas para aumentar a imunidade antitumoral e a imunoterapia. **Nature reviews Oncologia clínica**, v. 16, n. 7, p. 425-441, 2019.

LI, Jianmin et al. Recent advances in targeted drug delivery strategy for enhancing oncotherapy. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 9, p. 2233, 2023.

Liu, T., Huang, T., Li, J., Li, A., Li, C., Huang, X., Li, D., Wang, S., & Liang, M. (2023). Optimization of differentiation and transcriptomic profile of THP-1 cells into macrophage by PMA. *PloS one*, 18(7), e0286056. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0286056>

LOPES, Alessandra; VANDERMEULEN, Gaëlle; PRÉAT, Véronique. Vacinas de DNA contra o câncer: desenvolvimentos pré-clínicos e clínicos atuais e perspectivas futuras. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, v. 38, p. 1-24, 2019.

MAEß, Marten B. et al. Reduced PMA enhances the responsiveness of transfected THP-1 macrophages to polarizing stimuli. **Journal of immunological methods**, v. 402, n. 1-2, p. 76-81, 2014.

LUND, Maria E. et al. A escolha do protocolo de diferenciação do forbol 12-miristato 13-acetato influencia a resposta dos macrófagos THP-1 a um estímulo pró-inflamatório. **Revista de Métodos Imunológicos**, v. 430, p. 64-70, 2016.

MARTINEZ-ZAPIEN, Denise et al. Estrutura do complexo E6/E6AP/p53 necessária para a degradação de p53 mediada por HPV. *Natureza*, v. 529, n. 7587, pág. 541-545, 2016.

MASSIMI, P. et al. Degradação de HPV E6 de substratos contendo p53 e PDZ em um fundo nulo de E6AP. *Oncogene*, v. 27, n. 12, pág. 1800-1804, 2008.

MAURYA, Mano Ram et al. Biologia de sistemas de macrófagos. **Tópicos Atuais em Imunidade Inata**, p. 62-79, 2007.

MORILLE, Marie et al. Progresso no desenvolvimento de vetores catiônicos para terapia gênica sistêmica não viral contra câncer. **Biomateriais**, v. 29, n. 24-25, p. 3477-3496, 2008.

MOSSER, David M.; EDWARDS, Justin P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature reviews immunology**, v. 8, n. 12, p. 958-969, 2008.

Murray, P. (2017) Macrophage Polarization. *Annual Reviews of Physiology*, vol.79, 541-566.

OKUNADE, Kehinde Sharafadeen. Papilomavírus humano e câncer do colo doútero. *Journal of Obstetrics and Gynecology* , v. 40, n. 5, pág. 602-608, 2020.

OGAWA, Yukari; INADA, Ken-ichi; TSUTSUMI, Yutaka. CD68+ Reactive histiocytosis complicating early gastric cancer. ***Pathology international***, v. 45, n. 9, p. 698-701, 1995.

PINTO, Sneha M. et al. A análise proteômica comparativa revela impacto variável nas respostas imunes na diferenciação de monócitos-para-macrófagos THP-1 mediada por forbol 12-miristato-13-acetato. ***Fronteras da imunologia***, v. 12, p. 679458, 2021.

POL, Fábio B. Vande; KLINGELHUTZ, Aloysius J. Oncoproteínas E6 do Papilomavírus. ***Virologia***, v. 445, n. 1-2, p. 115-137, 2013.

PAAVONEN, Jorma et al. Eficácia da vacina adjuvante do papilomavírus humano (HPV)-16/18 AS04 contra infecção cervical e pré-câncer causados por tipos oncogênicos de HPV (PATRICIA): análise final de um estudo duplo-cego, randomizado em mulheres jovens. *The Lancet* , v. 374, n. 9686, pág. 301-314, 2009.

PARK, E.K.; JUNG, H.S.; YANG, H.I.; YOO, M.C.; KIM, C.; KIM, K.S. Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. ***Inflamm Res.***, v.56, p. 45-50, 2007.

QIN, Zhenyu. O uso de células THP-1 como modelo para mimetizar a função e regulação de monócitos e macrófagos na vasculatura. ***Aterosclerose***, v. 221, n. 1, p. 2-11, 2012.

RAMESH, Anujan et al. CSF1R-and SHP2-inhibitor-loaded nanoparticles enhance cytotoxic activity and phagocytosis in tumor-associated macrophages. ***Advanced Materials***, v. 31, n. 51, p. 1904364, 2019.

RAU, Friederike C. et al. B7-1/2 (CD80/CD86) direct signaling to B cells enhances IgG secretion. ***The Journal of Immunology***, v. 183, n. 12, p. 7661-7671, 2009.

REYES, L.; DAVIDSON, M.K.; THOMAS L.C.; DAVIS, J.K. Effects of *Mycoplasma fermentans* incognitus on differentiation of THP-1 cells. ***Infect. Immun.***, v. 67, n. 7, p. 3188- 3192, 1999.

REGHU, Gayatri et al. Aproveitando o sistema imune inato revolucionando a imunoterapia do câncer mediada por macrófagos. ***Revista de Biociências***, v. 49, n. 2, p. 1-12, 2024.

Ribeiro, Roberto; POLLARD, Jeffrey W. Macrófagos associados a tumores: dos mecanismos à terapia. ***Imunidade***, v. 41, n. 1, p. 49-61, 2014.

SAKAMOTO, Hironosuke et al. Biomechanical strain induces class a scavenger receptor expression in human monocyte/macrophages and THP-1 cells: a potential mechanism of increased atherosclerosis in hypertension. **Circulation**, v. 104, n. 1, p. 109-114, 2001.

SCHWENDE, Heike et al. Diferenças no estado de diferenciação de células THP-1 induzidas por éster de forbol e 1,25-dihidroxitamina D3. **Revista de Biologia de Leucócitos**, v. 59, n. 4, p. 555-561, 1996.

SILVEIRA, Marcelle Moura; MOREIRA, Gustavo Marçal Schmidt Garcia; MENDONÇA, Marcelo. Vacinas de DNA contra a COVID-19: Perspectivas e desafios. *Ciências da vida*, v. 267, p. 118919, 2021.

SHAH, Pir Tariq et al. THP-1 cell line model for tuberculosis: a platform for in vitro macrophage manipulation. **Tuberculosis**, v. 136, p. 102243, 2022.

SHIRATORI, Hiromi et al. An in vitro test system for compounds that modulate human inflammatory macrophage polarization. **European Journal of Pharmacology**, v. 833, p. 328-338, 2018.

SMITH, Michael Peter e outros. Diferenciação de células THP1 em macrófagos para ensaio de co-cultura transwell com células de melanoma. *Bioprotocolo*, v. 5, n. 21, pág. e1638-e1638, 2015.

SMITH, Samuel R. et al. The phosphatase PPM1A controls monocyte-to-macrophage differentiation. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 902, 2018.

SPANO, Alessandra et al. Expressão da cinética celular e morte durante a diferenciação monócito-macrófago: efeitos dos tratamentos com Actinomicina D e Vinblastina. **Histoquímica e Biologia Celular**, v. 127, p. 79-94, 2007.

STROBL, Herbert et al. Flow cytometric analysis of intracellular CD68 molecule expression in normal and malignant haemopoiesis. **British journal of haematology**, v. 90, n. 4, p. 774-782, 1995.

STROJNIK, Tadej et al. Impacto prognóstico de CD68 e caliceína 6 no glioma humano. **Pesquisa anticâncer**, v. 29, n. 8, p. 3269-3279, 2009.

Sun, L., Wang, X., Saredy, J., Yuan, Z., Yang, X., & Wang, H. (2020). Innate- adaptive immunity interplay and redox regulation in immune response. *Redox biology*, 37, 101759. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101759>

Theus SA, Cave MD & Eisenach KD. **Activated THP-1 cells: an attractive model for the assessment of intracellular growth rates of *Mycobacterium tuberculosis* isolates**. *Infect Immun*. 2004; 72(2): 1169-117.

TRIVERS, Meghan et al. DFMO and 5-azacytidine increase M1 macrophages in the tumor microenvironment of murine ovarian cancer. **Cancer research**, v. 79, n. 13, p. 3445-3454, 2019.

TSUCHIYA, Shigeru et al. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). **International journal of cancer**, v. 26, n. 2, p. 171-176, 1980.

TSUCHIYA, Shigeru et al. Indução da maturação em cultura de células de leucemia monocítica humana por um forbol diester. **Pesquisa sobre o câncer**, v. 42, n. 4, p. 1530-1536, 1982.

UEKI, K. et al. A proteína de choque autotérmico 60 induz o fator de necrose tumoral α em macrófagos derivados de monócitos: possível papel na doença periodontal inflamatória crônica. **Imunologia Clínica Experimental**, v. 127, n. 1, p. 72-77, 2002.

VAN DOORSLAER, Koenraad; DILLNER, Joaquim. O lançamento de um centro de referência internacional de papilomavírus animal. **Vírus**, v. 11, n. 1, p. 55, 2019.

VANPOUILLE-BOX, Claire et al. Trial watch: bloqueadores de checkpoint imunológico para terapia do câncer. **Oncoimunologia**, v. 6, n. 11, p. e1373237, 2017.

VIARISIO, Daniele; GISSMANN, Lutz; TOMMASINO, Massimo. Papilomavírus humano e carcinogênese: modelos bem estabelecidos e novos. **Opinião atual em virologia**, v. 26, p. 56-62, 2017.

WEI, T. et al. Macrophage models for tuberculosis studies. **Air Water Borne Dis**, v. 5, n. 124, p. 2, 2016.

XIA, Longzheng et al. A reprogramação metabólica do câncer e a resposta imune. **Câncer molecular**, v. 20, p. 1-21, 2021.

YASIN, Zahidah Nasuha Mohd et al. Polarização de macrófagos em linhagem celular THP-1 e monócitos primários: uma revisão sistemática. **Diferenciação**, v. 128, p. 67-82, 2022.

YEO-TEH, Nicole SL; ITO, Yoshiaki; JHA, Sudhakar. Os oncogenes do papilomavírus humano de alto risco E6 e E7 têm como alvo as principais vias celulares para alcançar a oncogênese. **Revista Internacional de Ciências Moleculares**, v. 19, n. 6, p. 1706, 2018.

YE, Jun et al. Drug-free mannosylated liposomes inhibit tumor growth by promoting the polarization of tumor-associated macrophages. **International journal of nanomedicine**, p. 3203-3220, 2019.

ZHENG, Zhi-Ming; BAKER, Carl C. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, v. 11, p. 2286, 2006

ZHOU, Xinying et al. Different signaling pathways define different interferon-stimulated gene expression during mycobacteria infection in macrophages. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 3, p. 663, 2019.

ZHOU, Kun et al. HPV16 E6/E7-based mRNA vaccine is therapeutic in mice bearing aggressive HPV-positive lesions. **Frontiers in Immunology**, v. 14, p. 1213285, 2023.

ZHOU, Bei et al. Visando o ponto imunocheckpoint de macrófagos: uma nova visão sobre a imunoterapia de tumores sólidos. **Comunicação Celular e Sinalização**, v. 22, n. 1, p. 66, 2024.