



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

VACINAS CONTRA O HPV: PRESENTE E FUTURO
ARTIGO DE REVISÃO

ANA ISABEL PINTO RODOLFO

TRABALHO REALIZADO SOB A ORIENTAÇÃO DE:
FERNANDO LUIS DA CRUZ FERNANDES MOTA

Hospitais da Universidade de Coimbra

Serviço de Ginecologia
Praceta Prof. Mota Pinto
3000-075 COIMBRA
PORTUGAL

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Fernando Luís da Cruz Fernandes Mota, pela sua dedicação, disponibilidade e importante contribuição, que foram indispensáveis na realização desta tese.

Aos meus pais, a quem devo muito mais do que a vida. Devo uma educação rica em lições de vida que me tornaram na pessoa que sou hoje. Sem eles, nada do que consegui seria possível.

E finalmente a ti, Francisco Évora, pela tua generosidade, apoio e paciência inesgotáveis. A ti devo mais do que algum dia poderei retribuir.

A todos, o meu profundo agradecimento.

Índice

	Página
Resumo.....	3
1. Introdução.....	5
2. Estado da arte.....	13
2.1 Eficácia.....	13
2.1.1. Vacina quadrivalente.....	15
2.1.2. Vacina bivalente.....	20
2.2 Imunogenicidade e Segurança.....	24
2.3 Impacto no rastreio citológico.....	25
3. Futuro.....	27
3.1 Vacinas preventivas de segunda geração.....	27
3.2. Vacinas terapêuticas.....	33
3.2.1. Vacinas baseadas em vetores vivos.....	35
3.2.2. Vacinas baseadas em péptidos/proteínas.....	36
3.2.3. Vacinas baseadas em ácidos nucleicos.....	37
3.2.4. Vacinas celulares (de células inteiras).....	40
3.2.5. Vacinas baseadas em PVL.....	42
3.2.6. Terapêuticas combinadas.....	43
4. Conclusão.....	45
5. Bibliografia.....	48
6. Anexo.....	55

Resumo

A associação entre a infecção pelo vírus do papiloma humano (HPV) e o cancro do colo do útero é atualmente evidente. Sendo o cancro do colo do útero a segunda causa de morte por cancro na mulher, a sua morbilidade e mortalidade conduziram ao desenvolvimento de métodos de prevenção primária e secundária. A prevenção secundária é realizada sob a forma de um rastreio organizado, através do exame citológico, designado exame Papanicolau. Mais recentemente foi introduzida a prevenção primária através das vacinas contra o HPV (Gardasil® e Cervarix®). Prevê-se que num futuro, a médio prazo, a diminuição da prevalência da infecção persistente pelo HPV obrigue a uma revisão das *guidelines* da prevenção do cancro do colo do útero, nomeadamente no que diz respeito ao programa de rastreio.

O sucesso destas vacinas nos múltiplos ensaios clínicos realizados levou à sua inclusão nos programas nacionais de vacinação de vários países. No entanto o seu elevado preço impede a aplicação da vacinação nos países subdesenvolvidos, onde se encontram 80% das vítimas de cancro do colo do útero e, portanto, onde o impacto da infecção pelo HPV é maior. Por outro lado, foi também comprovado que estas vacinas não têm efeito sob a infecção já estabelecida, ou lesões a ela associadas. Por estes motivos, estão em desenvolvimento múltiplas vacinas de segunda geração, entre elas, novas vacinas preventivas e vacinas com efeito terapêutico.

Assim, as vacinas profiláticas contra o cancro do colo do útero são eficazes, seguras e imunogénicas, porém, o seu verdadeiro impacto só será contemplado a médio/longo prazo. Até lá é necessário manter a investigação científica, no sentido de adequar os programas de rastreio à nova realidade pós-vacinal, avaliar a eficácia das vacinas quadrivalente e bivalente a médio/longo prazo (de forma a analisar a

necessidade de aplicação de reforços vacinais) e promover o desenvolvimento de novas vacinas, quer com efeito profilático, quer com efeito terapêutico.

O objetivo final é englobar a população mundial num esforço conjunto para a diminuição da prevalência do cancro do colo do útero, através da adequação de programas combinados de vacinação, rastreio e tratamento precoce.

Palavras-chave: *Human Papillomavirus (HPV), prophylactic vaccines, therapeutic vaccines, Cervical cancer prevention, vaccination in developing countries*

1. Introdução

O vírus do papiloma Humano (HPV), pertencente à família *Papillomaviridae* (antiga *Papovaviridae*), de acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus. É um vírus pequeno (55 nm), contendo ácido desoxirribonucleico (ADN) de dupla cadeia e circular envolvido por uma cápside (Brotherton e Gertig, 2011).

A principal via de infecção é a transmissão sexual, sendo este um vírus extremamente contagioso (Garland e Smith, 2010). Alguns autores identificam inclusivamente a infecção por HPV como a doença sexualmente transmissível (DST) mais comum (Palmer et al., 2009). As adolescentes tornam-se susceptíveis a esta infecção após o início da atividade sexual, mesmo que não pratiquem penetração (Lu et al., 2011). Desta infecção podem resultar lesões benignas como os papilomas ou os condilomas, ou lesões malignas, como alguns carcinomas invasivos (Bonnez, 2007). O vírus infeta as células epiteliais basais da mucosa ano-genital, sendo portanto necessária uma solução de continuidade do epitélio estratificado, o que poderá ocorrer aquando da relação sexual, ou diretamente através do epitélio colunar do endocolo (Moscicki, 2008). Após a entrada do vírus nas células, este utiliza a maquinaria celular de replicação do ADN para a sua própria replicação. Ora, as regiões codificadoras do ADN viral são divididas em: região precoce e região tardia. A região precoce (E de *early*) codifica proteínas como a E6 e a E7. A região tardia (L de *late*) codifica proteínas da cápside viral como a L1 (proteína major da cápside) e a L2 (proteína minor da cápside). O ADN viral pode ser integrado no ADN celular e, conseqüentemente, apenas as proteínas E6 e E7 são expressas constitutivamente. Estas proteínas desempenham um papel fundamental na indução e manutenção das CIN (do inglês *cervical intraepithelial neoplasia*) alto grau e na sua malignização (Lowy et al., 2008). A proteína E6 liga-se à

p53 levando à sua destruição, enquanto a proteína E7 se liga à pRb provocando a sua inativação. Tendo em conta que quer a p53, quer a pRb são importantes reguladores do ciclo celular, facilmente se compreende que a infeção por HPV possa promover a sua desregulação, levando à imortalização celular que está na origem da malignização dos tecidos infetados (Moscicki, 2008). Os genes E6 e E7 funcionam, deste modo, como oncogenes.

A infeção não resulta em virémia pois é restrita às células epiteliais, daí que a apresentação dos antígenos virais ao sistema imunitário do hospedeiro seja limitada (Brotherton e Gertig, 2011). A intensidade da resposta humoral depende da carga viral e da persistência do vírus. A infeção natural do trato genital pelo HPV dá origem à produção de anticorpos séricos, de uma forma lenta e modesta, mas mensurável na maioria dos indivíduos. Cerca de 50% das mulheres infetadas pelo HPV sofrem seroconversão para a proteína L1 dos HPV 6, 16 e 18 em aproximadamente 18 meses, porém mais de 40% das mulheres infetadas não sofrem seroconversão o que significa que a pesquisa de anticorpos anti-L1 não é um teste de diagnóstico eficaz (Mariani e Venuti, 2010). Os anticorpos neutralizantes do HPV são essencialmente anticorpos anti-L1, sendo os anticorpos anti-L2 menos eficazes. Relativamente à resposta celular, as células dendríticas ou células de Langerhans do epitélio cervical, desempenham um papel decisivo no reconhecimento de células infetadas pelo HPV. As células dendríticas estimulam linfócitos T auxiliares tipo 1 (LTh1), que por sua vez ativam linfócitos T citotóxicos (LTc). Estes eliminam as células infetadas, contribuindo para a resolução da infeção (Dillner et al., 2010). De notar que a resposta imunitária é independente e específica para cada tipo de HPV, o que já foi demonstrado em mulheres infetadas por mais do que um tipo de HPV (Lowy et al., 2008).

A infecção do colo uterino pelo HPV pode provocar uma série de respostas patológicas (dependendo do tipo de HPV e de fatores relacionados com o hospedeiro), que podem ir desde a ausência de lesão, o estado de portador sem alterações citológicas ou uma variedade de alterações celulares. Na maioria das mulheres, estas infecções são assintomáticas e transitórias, ocorrendo resolução da infecção ao fim de 12 a 24 meses. No entanto, numa pequena percentagem de mulheres, a infecção irá persistir. Assim sendo, a infecção persistente por HPV oncogénicos aumenta consideravelmente a probabilidade de alterações citológicas que podem resultar em cancro do colo uterino (Brotherton e Gertig, 2011). A definição mais comum de persistência da infecção por HPV consiste na deteção do mesmo genótipo de HPV em pelo menos duas ocasiões, com pelo menos seis meses de intervalo. A infecção persistente por HPV constitui um pré-requisito necessário para o desenvolvimento neoplásico, no entanto outros cofatores foram identificados, os quais, em conjunto com a infecção por HPV oncogénicos, aumentam o risco de desenvolvimento de cancro. Estes cofatores incluem o tabagismo, idade jovem na primeira relação sexual, elevada paridade, uso de contraceptivos orais por longos períodos de tempo, assim como outras DST ou imunossupressão (adquirida ou congénita) (Garland et al., 2011 e Lowy et al., 2008).

O vírus HPV é encontrado nas neoplasias intraepiteliais, designação utilizada para descrever as alterações histológicas decorrentes da infecção por HPV. Estas constituem lesões precursoras do carcinoma do colo do útero, da vulva, da vagina, do ânus e do pénis conhecidas por CIN, VIN, VAIN, AIN e PIN, respetivamente. As neoplasias intraepiteliais são classificadas em graus histológicos de 1 a 3, estando o grau 3 associado a maior severidade e maior probabilidade de progressão para cancro invasivo (Bonnez, 2007). As lesões CIN3 são geralmente detetadas 5 a 15 anos após a

infecção pelo HPV. A progressão de CIN3 para cancro invasivo geralmente tem a duração de vários anos, ou mesmo décadas, sendo geralmente mais lenta que a progressão desde a infecção até CIN3 (Lowy et al.,2008). O cancro do colo do útero pode surgir sob a forma de carcinoma de células espinhosas se tiver origem no epitélio estratificado da zona de transformação, ou sob a forma de adenocarcinoma se tiver origem no epitélio colunar endocervical (Brotherton e Gertig, 2011).

Em 1988 foi adotado o sistema de Bethesda para a classificação da citologia cervical. Neste consideram-se as seguintes categorias: Lesão Escamosa de Baixo Grau (LEBG ou LSIL de *low-grade squamous intraepithelial lesion*), correspondendo à displasia ligeira, e Lesão Escamosa de Alto Grau (LEAG ou HSIL de *high squamous intraepithelial lesion*), correspondendo à displasia moderada, severa ou carcinoma *in situ* (Brotherton e Gertig, 2011). Considera-se ainda o tipo histológico “células escamosas atípicas de significado indeterminado” (CEASI ou ASCUS de *atypical squamous cells of undetermined significance*).

Mais de 40 tipos de HPV são capazes de infetar a mucosa do trato ano-genital e dos tratos respiratório e digestivo superiores. Estes podem ser divididos em dois grupos: alto risco (ou oncogénicos) e baixo risco. Relativamente aos HPV oncogénicos, em 1995 os genótipos 16 e 18 do HPV foram pela primeira vez categorizados como carcinogénios humanos pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC). Em 2009 a IARC adicionou à lista de carcinogénios humanos os genótipos 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59 do HPV (Brotherton e Gertig, 2011). Foram adicionados a este grupo os HPV 66, 68 e 73 (Kanda e Kondo, 2009). No grupo de baixo risco estão compreendidos os tipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 e 81, assim designados pelo respetivo baixo risco oncogénico (Bonnez, 2007). De notar que os HPV 6 e 11 já foram

associados a casos de cancro, embora raramente (Muñoz e tal., 2010). A prevalência da infeção do colo do útero por HPV a nível mundial é de aproximadamente 10%, enquanto na África Sub-Sahariana atinge os 24% (Smith e Travis, 2011). A prevalência varia também com a idade, variando entre 19% e 82% em mulheres com 30 anos ou menos, descendo abaixo dos 10% em mulheres com mais de 30 anos, ocorrendo um novo pico na quarta e quinta décadas de vida (Shepherd e Bryson, 2008).

O cancro do colo do útero é a segunda causa principal de morte por cancro a nível mundial na população feminina, com cerca de 493 000 novos casos e 274 000 mortes por ano (Waheed et al., 2011). Afeta principalmente mulheres entre os 30 e os 45 anos, conduzindo assim a uma grande perda de anos potenciais de vida (Rambout et al., 2007). Constitui, portanto, uma importante causa de morbilidade e mortalidade, daí que, atitudes preventivas sejam fundamentais. Uma atitude preventiva fundamental foi a introdução de programas de rastreio, recorrendo à citologia cervical. O rastreio organizado tem contribuído significativamente para uma diminuição da morbilidade e da mortalidade do cancro do colo do útero. No entanto, 80% das pacientes encontram-se em países em desenvolvimento, onde o rastreio é demasiado dispendioso para ser implementado (Kanda e Kondo, 2009).

Em 2008 o Professor Zur Hausen recebeu o prémio Nobel da medicina por provar a associação do HPV com o cancro do colo do útero (Palmer et al., 2009). A infeção pelo HPV está associada ao cancro da vagina, da vulva, do ânus e da orofaringe, sendo o mais frequente o cancro do colo do útero (Trimble e Frazer.,2009). É já reconhecido que virtualmente todos os casos de cancro do colo uterino são atribuíveis à infeção por HPV (Rambout et al., 2007). Desta forma, a identificação firme do papel causal do HPV no cancro do colo do útero constitui a base para o desenvolvimento de

vacinas com um papel profilático. Duas vacinas profiláticas foram introduzidas no mercado. Para a sua produção foi utilizada tecnologia de ADN recombinante, através da qual é produzida a proteína L1. As proteínas L1 são capazes de se organizar em pequenas partículas designadas Partículas Vírus-Like (PVL) (Villa et al., 2011). Estas são capazes de mimetizar uma infeção natural por HPV, porém não contêm ADN viral no seu interior, o que significa que não são infecciosas (Garland e Smith, 2010). Cerca de 90% dos condilomas são provocados pelos HPV 6 e 11 (Vandepapelière et al., 2005). Por outro lado o HPV 16 é responsável por aproximadamente 50% de todos os carcinomas do colo uterino, enquanto o HPV 18 é responsável por cerca de 20% (Jagu et al., 2010). Os HPV 16 e 18 estão associados a aproximadamente 50% das CIN2 e 3 (Romanowski et al., 2009). Estes conceitos são essenciais para a compreensão da constituição antigénica destas vacinas. Assim, existem duas vacinas profiláticas: uma vacina bivalente (Cervarix®, Glaxo SmithKline), constituída por PVL dos HPV 16 e 18, e uma vacina quadrivalente (Gardasil®, Merck Sharp e Dhome), constituída por PVL dos HPV 16 e 18, mas também por PVL dos HPV 6 e 11, para a prevenção dos papilomas e condilomas (Ma et al., 2010). Na vacina bivalente foi utilizado o adjuvante AS04, que contém o Lípido A3-O-desacilo-4'-monofosforilo (MPL), adsorvido em hidróxido de alumínio hidratado. Na vacina tetravalente foi utilizado sulfato de hidroxifosfato de alumínio como adjuvante (Lowy et al., 2008). Estas vacinas têm a capacidade de induzir a produção de títulos elevados de anticorpos neutralizantes HPV-específicos que impedem a entrada do vírus nas células (Lin et al., 2010). Estas vacinas são injetadas por via intra-muscular (IM) em três doses individuais, ao longo de seis meses (Villa et al., 2011).

A disseminação mundial das vacinas contra o HPV tem sido relativamente rápida, sendo até agora a vacina que mais rapidamente foi introduzida nos programas nacionais de imunização de países desenvolvidos, após a sua aprovação. No fim de 2007, sete países da União Europeia (UE) tinham integrado a vacinação contra o HPV no seu programa nacional de imunização (Áustria, Bélgica, França, Alemanha, Itália, Espanha e Reino Unido). No fim de 2009, mais onze países da UE tinham iniciado esta vacinação (Portugal, Dinamarca, Grécia, Irlanda, Letónia, Luxemburgo, Holanda, Roménia, Eslovénia e Suíça). As vacinas contra o HPV foram também incluídas em programas de vacinação fora da Europa, nomeadamente na Austrália, nos Estados Unidos da América (EUA) e no Canadá (Franceschi et al., 2011). Existe, no entanto, uma clara correlação entre o nível socioeconómico do país e a implementação de programas organizados de vacinação contra o HPV, visto esta ser uma vacina ainda muito dispendiosa. Ora, como já foi referido, é nos países em desenvolvimento que se verificam as maiores taxas de mortalidade por cancro do colo do útero, e é também nestes países que a introdução de programas de vacinação organizados contra o HPV é mais complexa. Isto significa que a vacinação contra o HPV não está a chegar à população que mais dela beneficiaria (Franceschi et al., 2011).

Dados acerca da cobertura da vacina contra o HPV (para as 3 doses) estão disponíveis para nove países (Figura 1). Destes, só três países conseguem uma cobertura para 3 doses superior a 70%, sendo que Portugal é o país que atinge maior cobertura (superior a 80%) (Franceschi et al., 2011). Nestes mesmos dados é possível verificar que uma maior cobertura é possível se a entrega à população não for feita no sector privado, mas sim no sector público. Alguns países em vias de desenvolvimento que já

introduziram estas vacinas nos seus programas nacionais de imunização incluem México, Panamá, Micronésia, República do Palau e o Nepal.

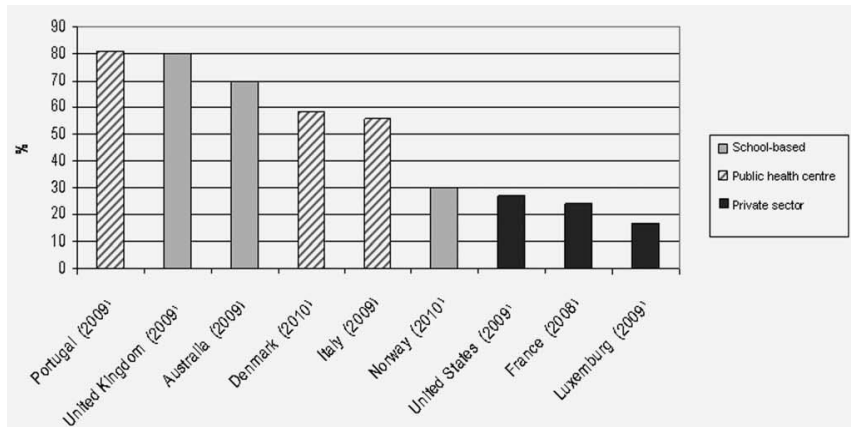


Figura 1. Cobertura vacinal contra o HPV em nove países. Relação com o meio de distribuição das vacinas à população. Adaptado de Franceschi et al., 2011.

2. Estado da arte

2.1. Eficácia

Múltiplos ensaios controlados e aleatorizados, duplamente cegos (RCT DB do inglês *randomized controlled trials double blind*), têm demonstrado de forma consistente a elevada eficácia destas vacinas em termos de prevenção da infeção por HPV e prevenção das CIN e adenocarcinoma *in situ* (AIS) associados aos tipos de HPV contidos na vacina (HPV 16 e 18), assim como a outros tipos de HPV oncogénicos filogeneticamente relacionados. No entanto, estes estudos ainda são incapazes de determinar a eficácia destas vacinas relativamente à prevenção do cancro associado à infeção pelo HPV, visto que o tempo desde a infeção até ao desenvolvimento de cancro é longo (Massad et al., 2009). Prevê-se que a máxima redução na prevalência do cancro do colo do útero só ocorrerá quando existir uma proteção contínua em pelo menos 70% da população feminina durante pelo menos 60 anos (Harper, 2009).

Lu et al (2011) realizaram uma meta-análise de forma a avaliar a eficácia e segurança das vacinas contra o HPV, no âmbito da prevenção de lesões precursoras do cancro do colo do útero. Neste estudo foi elaborada uma pesquisa para identificar RCT DB acerca destas vacinas, publicados até 31 de Julho de 2009.

O objetivo primário para a avaliação da eficácia consistiu na identificação de lesões cervicais CIN2+ (que incluem CIN de grau 2 e 3, AIS e carcinoma cervical). Este foi o objetivo primário considerado na maioria dos sete ensaios considerados nesta meta-análise, já que é aquele recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para a avaliação da eficácia destas vacinas. O objetivo secundário para avaliação da eficácia foram as infeções persistentes tipo-específicas por HPV, dado que estas são o

precursor obrigatório das CIN2 e 3 e do cancro cervical. A eficácia relativa a CIN1+ (que inclui CIN de grau 1, 2 e 3, AIS e carcinoma cervical) foi também considerada como um objetivo secundário. Desta forma, torna-se possível avaliar o impacto da vacinação nos gastos em cuidados de saúde. A segurança da vacina foi também avaliada, o que será analisado num capítulo próprio.

A maioria dos ensaios selecionados foi multinacional. As mulheres participantes não estavam grávidas, tinham idades compreendidas entre os 15 e 44 anos, com 6 ou menos parceiros sexuais em toda a vida e sem história de citologia cervical anormal. Nos sete ensaios avaliados, três vacinas profiláticas foram analisadas: a vacina bivalente em dois ensaios, a vacina quadrivalente em quatro ensaios e a vacina monovalente (contendo PVL do HPV-16) num ensaio. Em todos os ensaios as vacinas ou os controlos foram administrados em regimes de 3 doses, num espaço de 6 meses. Todos os ensaios utilizaram placebo como controlo, exceto dois, nos quais o controlo foi a vacina contra a Hepatite A ou placebo junto com a vacina contra a Hepatite B. As participantes foram submetidas ao teste de identificação de ADN do HPV a cada 6 meses e citologia a cada 6 ou 12 meses, sendo que a duração dos ensaios variou entre 26 e 60 meses. Aproximadamente 90% das participantes tinham citologia cervical normal no início dos ensaios.

Na presente tese pretende-se fazer uma revisão da literatura acerca da eficácia das vacinas bivalente e quadrivalente comercializadas em Portugal. Para tal, visto que os ensaios clínicos analisados na meta-análise supracitada eram os de maior qualidade e duração até então, foi feito um levantamento dos resultados dos ensaios contidos nesta meta-análise publicados de Agosto de 2009 até Setembro de 2011, dado que na meta-análise referida foi feita uma revisão da literatura até Julho de 2009. Desta forma é

possível obter resultados relativos a períodos de *follow-up* superiores, o que aumenta a precisão dos resultados.

2.1.1. Vacina quadrivalente

Dois RCT DB multinacionais de fase III da vacina quadrivalente foram conduzidos pela *Females United to Unilaterally Reduce Endo/Ectocervical Disease* (FUTURE), sendo designados respetivamente por FUTURE I e FUTURE II (Muñoz et al., 2010).

O FUTURE I decorreu em 16 países. Foram randomizadas 5455 mulheres com idades entre os 16 e 24 anos, com 4 ou menos companheiros sexuais até ao momento. Excluíram-se mulheres grávidas, com citologia cervical anormal ou condilomas. Foi administrado LPV do HPV 6 (20 µg), HPV 11 (40 µg), HPV 16 (40 µg) e HPV 18 (20 µg) ou placebo / placebo + vacina da Hepatite B aos 0, 2 e 6 meses. Realizou-se a pesquisa do ADN do HPV e citologia cervical de 6 em 6 meses, durante o período de 3,6 anos (em média). O objetivo primário era avaliar o efeito da vacina na incidência de CIN1-3, AIS, VIN1-3, VaIN1-3, condilomas e cancro cervical, vulvar ou vaginal, associados aos HPV 6, 11, 16 e/ou 18. Por sua vez, o objetivo secundário seria avaliar o efeito da vacina na incidência combinada de CIN1-3, AIS e cancro associados aos HPV 6, 11, 16 e/ou 18; infeção persistente, CIN1-3, e AIS associados aos HPV 31, 33, 45, 52, 58 (Garland et al., 2007).

No FUTURE II, realizado em 13 países, procedeu-se ao estudo de 12167 mulheres com idade compreendida entre os 15 e os 26 anos, sendo também o número de parceiros sexuais igual ou inferior a 4. Utilizou-se como critério de exclusão a

existência de gravidez ou de história pessoal de citologia alterada. Administraram-se os LPV do HPV 6, 11, 16 e 18 (nas mesmas doses que no FUTURE I) ou o placebo, aos 0, 2 e 6 meses. Esta população, também ao longo de 3,6 anos (em média), foi submetida de 6 em 6 meses ao teste de ADN do HPV e de 12 em 12 meses à citologia cervical. Em relação aos objetivos deste estudo, o primário passou por avaliar a eficácia da prevenção de CIN2-3, AIS e cancro cervical associados aos HPV 16 e/ou 18, enquanto o secundário consistiu em avaliar a infeção persistente, CIN1-3 e AIS associados aos HPV 31, 33, 45, 52 e 58 (The FUTURE II Study Group, 2007).

Neste estudo foi avaliado um sub-grupo que se aproximava da população de mulheres-*naive* (isto é, mulheres que nunca contactaram com o HPV). Este sub-grupo era constituído por mulheres que receberam pelo menos uma dose da vacina quadrivalente ou de placebo, que tiveram pelo menos uma consulta de *follow-up* após o dia inicial do estudo: apresentavam seronegatividade para os quatro tipos de HPV contidos na vacina, teste de ADN negativo para os 4 tipos de HPV contidos na vacina e 10 tipos não contidos na vacina e uma citologia normal. Esta não foi considerada uma população *Per-protocol* (PP), uma vez que mais de 40 tipos de HPV podem infetar o trato ano-genital. Desta forma, o grupo de mulheres com teste de ADN negativo para 14 tipos de HPV apenas se aproxima das características das mulheres-*naive*. A população *Intention-to-treat* (ITT) permite avaliar o impacto da vacina nas mulheres sexualmente ativas. Esta era uma população mista constituída por mulheres expostas e não expostas ao HPV, que receberam pelo menos uma dose da vacina quadrivalente ou do placebo, com pelo menos uma consulta de *follow-up*, independentemente da existência de infeção ou doença associada ao HPV no início do estudo.

Os resultados mais recentes destes dois RCT DB foram publicados em 2010 pelos autores Muñoz et al (2010), tendo sido apresentados em conjunto. Estes resultados são relativos a um período médio de *follow-up* de 3,6 anos (máximo de 4,9 anos). Neste estudo foi demonstrado que a vacina quadrivalente é altamente eficaz na prevenção de CIN, VIN, VAIN e condilomas, nas mulheres que no início do estudo tinham teste de ADN e serologia negativos para 14 tipos de HPV e citologia normal, isto é, no subgrupo cujas características se aproximam da população de mulheres que não foram expostas ao HPV. A eficácia variou entre 95% e 100% na prevenção de CIN3, AIS, VIN2-3 e VaIN2-3 associados aos HPV 16 e 18. Obteve-se também uma eficácia de 97% na prevenção de condilomas associados aos HPV 6 e 11.

No entanto, a eficácia da vacina na prevenção de CIN3 e AIS independentemente do tipo de HPV, na população com teste de ADN e serologia iniciais negativos, foi de 43%. Os autores afirmam, porém, que a incidência destas lesões no grupo placebo aumentou de forma contínua ao longo do estudo, enquanto no grupo vacinal foi atingido um *plateau*. Desta forma, segundo os mesmos, é de esperar que um *follow-up* de maior duração demonstre uma eficácia superior (*vide* Figura 2). A eficácia relativa à prevenção de lesões CIN3 e AIS, independentemente do tipo de HPV, na população ITT foi de 18%. Tal como a percentagem apresentada anteriormente, os autores esperam que um *follow-up* mais prolongado provasse uma eficácia superior. De qualquer forma, este valor sublinha a importância da vacinação antes do início da atividade sexual.

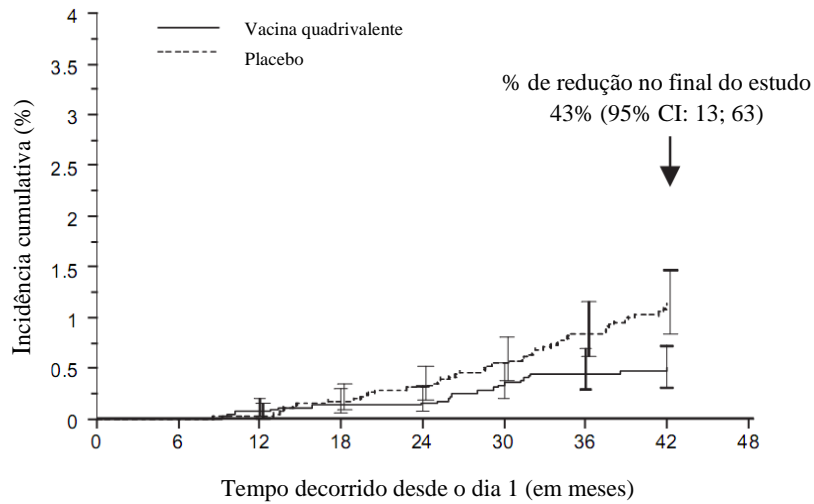


Figura 2 – Eficácia da vacina quadrivalente na prevenção de CIN3 e AIS, independentemente do tipo de HPV envolvido, no grupo com teste de ADN negativo para 14 tipos de HPV oncogénicos.

Relativamente à proteção cruzada, a vacinação da população com teste de ADN negativo para 14 serotipos de HPV promoveu uma diminuição de 32,5% na incidência de lesões de alto grau (CIN2-3 e AIS) associadas aos 10 tipos de HPV testados, mas que não são incluídos na vacina.

Muñoz et al (2009), conduziram um RCT DB de fase III, realizado em 7 países, no qual se randomizaram 3819 mulheres na faixa etária dos 24 aos 45 anos, sem restrições em relação ao número de parceiros sexuais. Os critérios de exclusão incluíram a existência de gravidez, imunodeficiência, antecedentes pessoais de condilomas genitais ou de doença cervical. Administraram-se os LPV do HPV 6 (20 µg), HPV 11 (40 µg), HPV 16 (40 µg) e HPV 18 (20 µg) ou do placebo, aos 0, 2 e 6 meses. Realizou-se também a pesquisa do ADN do HPV e citologia cervical de 6 em 6 meses. Em termos de objetivo primário, avaliou-se a incidência combinada da infeção persistente, CIN1-3, VIN1-3, VaIN1-3, AIS, cancro cervical, vulvar ou vaginal ou condilomas genitais associados aos HPV 6, 11, 16 ou 18, ou aos HPV 16 ou 18 isoladamente. O objetivo secundário avaliou a incidência combinada da infeção persistente, CIN1-3,

VIN1-3, VaIN1-3, AIS, cancro cervical, vulvar ou vaginal ou condilomas genitais associados aos HPV 6 ou 11. A infecção persistente foi definida como a deteção do mesmo tipo de HPV em esfregaços cervicovaginal ou anogenital, em 2 ou mais visitas consecutivas, com 6 ou mais meses de intervalo, ou então se existir doença cervical/genital associada a um tipo específico de HPV, cujo ADN foi detetado num esfregaço realizado na visita imediatamente antes ou depois da realização da biópsia.

Castellsagué et al (2011) publicaram os resultados relativos a um *follow-up* de 3,8 anos, deste mesmo estudo. A eficácia da vacina contra a incidência combinada de infecção persistente e doença cervical ou genital externa associadas aos HPV 6, 11, 16 e 18, na população PP foi de 88,7% (IC 95%: 78,1 - 94,8). A eficácia relativamente à incidência combinada de infecção persistente igual ou superior a 6 meses, e doença cervical ou genital externa associadas ao HPV 16 e 18 foi de 84,7% (IC 95%: 67,5 - 93,7). Nas mulheres que no início do estudo eram seropositivas mas tinham teste de ADN negativo, isto é, já haviam sido expostas, porém não se encontravam infetadas aquando da análise, também foi avaliada a eficácia. Esta foi de 66,9% (IC 95%: 4,3 - 90,6), atingindo o valor de 81,3% (IC 95%: 14,4 - 98) na sub-população com idade superior (35 - 45 anos). Isto sugere que mulheres que já tenham sido expostas ao HPV podem beneficiar da vacinação com a vacina quadrivalente.

Este estudo permite confirmar a elevada eficácia da vacina quadrivalente na prevenção de doenças do trato genital inferior associadas aos HPV 6, 11, 16 e 18, em mulheres até aos 45 anos. Os resultados obtidos neste estudo não variaram consideravelmente em relação aos resultados do estudo anterior, o que indica a persistência da eficácia ao fim de 3,8 anos. No entanto, estudos já provaram que a relação custo-benefício aumenta com o aumento da idade do grupo alvo da vacina, daí

que a prioridade seja a vacinação das mulheres jovens, sobretudo de adolescentes (Castellsagué et al., 2011). Porém, e dado o resultado deste estudo, as mulheres sexualmente ativas com mais de 26 anos (e até aos 45 anos, de acordo com o estudo supra-citado) devem ter a possibilidade de optar pela vacinação, uma vez que poderão beneficiar da mesma.

2.1.2. Vacina bivalente

Um RCT DB de fase III foi realizado em três países (Harper et al.,2004 e Harper et al.,2006). Foram selecionadas 1113 mulheres entre 15 e 25 anos, com 6 ou menos parceiros sexuais durante toda a vida. Foram excluídas mulheres nas seguintes condições: citologia cervical anormal, sujeitas a tratamento destrutivo ou excisional de lesões do colo do útero ou tratamento de condilomas, seropositividade para HPV 16 ou 18, teste de ADN positivo para qualquer um de 14 tipos oncogénicos de HPV nos passados 90 dias. Foi administrado LPV do HPV 16 e 18 (20 µg cada) ou placebo, aos 0, 1 e 6 meses. Foi realizada a pesquisa do ADN do HPV e citologia cervical de 6 em 6 meses, durante o período de 53 meses. O objetivo primário consistia na avaliação do impacto da vacina na incidência da infeção por HPV 16 e/ou 18. O objetivo secundário baseava-se na avaliação do impacto da vacinação na ocorrência de infeção persistente, LSIL, HSIL ou CIN 1-3 associados ao HPV 16 e/ou 18.

Neste ensaio foram analisadas duas populações: a população ATP (*according-to-protocol*) e a população TVC (*total vaccinated cohort*). A população ATP incluía mulheres que receberam as 3 doses da vacina/placebo, tinham teste de ADN negativo para 14 tipos de HPV oncogénicos, tinham citologia negativa e apresentavam

seronegatividade para os HPV 16 e 18 no dia inicial do estudo, tendo cumprido inteiramente o protocolo e tendo disponíveis dados de pelo menos uma análise serológica dos anticorpos anti-vacinais (para avaliação da imunogenicidade) ou dados disponíveis para a avaliação da eficácia. A população TVC incluía mulheres que receberam pelo menos uma dose da vacina bivalente ou do placebo e para as quais existiam resultados relativos aos objetivos do ensaio.

Romanowski et al (2009) publicaram os resultados relativos a um *follow-up* de 6,4 anos. A avaliação da eficácia foi feita na população ATP, relativamente aos objetivos virológicos (infecção incidente e persistente) e na população TVC, relativamente aos objetivos citohistológicos. Desta forma, na população ATP obteve-se uma eficácia de 95,3% (IC 95%: 87,4 – 98,7) na prevenção de infecção incidente e de 100% na prevenção de infecção persistente de 6 meses (IC 95%: 90,0 – 100) e de 12 meses (IC 95%: 81,8 – 100) associados aos HPV 16 e/ou 18. Na população TVC obteve-se uma eficácia de 96,7% (IC 95%: 87,3 – 99,6) na prevenção de ASCUS ou mais grave, 94,6% (IC 95%: 78,8 – 99,4) na prevenção de LSIL ou mais grave e 100% na prevenção de CIN1+ (IC 95%: 73,4 – 100) e de CIN2+ (IC 95%: 51,3 – 100) associados aos HPV 16 e/ou 18. A eficácia da vacina na prevenção de CIN2+, independentemente do tipo de HPV associado foi de 71,9% (IC 95%: 20,6 – 91,9). Este valor pode ser indicativo de um efeito protetor que abrange mais tipos de HPV para além dos HPV 16 e 18. Relativamente à proteção cruzada, obteve-se uma eficácia de 59,8% (IC 95%: 20,5 – 80,7) na prevenção de infecção por HPV31 e de 77,7% (IC 95%: 39,3 – 93,4) na prevenção de infecção por HPV45. Desta forma se verifica que o espectro de proteção da vacina bivalente vai para além dos HPV 16 e 18. A eficácia em relação ao ASCUS, CIN1+ e CIN2+ é fundamental porque reflete uma possível diminuição das

consequências associadas à descoberta destas lesões (em termos de diagnóstico e tratamento), nomeadamente financeiras e emocionais.

Sendo a eficácia a longo termo um aspeto fundamental na avaliação destas vacinas, este estudo será continuado durante mais tempo. Para tal, as mulheres do grupo placebo permanecerão sem receber a vacina, apesar de já ser claro o seu benefício. Esta atitude é justificada pelos autores visto estas mulheres serem alvo de um acompanhamento contínuo com citologia e cuidados ginecológicos durante o ensaio. Nenhuma vacina (bivalente ou quadrivalente) estava disponível quando as participantes iniciaram o estudo, no entanto foram alertadas quando uma das vacinas se tornou disponível nos respetivos países. Foi dada a opção de desistir do ensaio a qualquer momento para que pudessem receber a vacina, significando que a manutenção da participação no estudo foi baseada num consentimento informado. Um sub-grupo de mulheres deste estudo foi envolvido num estudo de *follow-up* de até 9,5 anos após vacinação.

A idade média do início da atividade sexual varia nos diferentes grupos populacionais, no entanto a maioria dos países recomenda que a vacinação contra o HPV seja efetuada entre os 10 e os 14 anos (Brotherton e Gertig, 2011). Em Portugal a vacinação contra o HPV está preconizada para todas as adolescentes com 13 anos, tendo sido também fornecida gratuitamente às jovens que completaram 17 anos em 2009, 2010 e 2011 (Direcção-Geral da Saúde, 2008). Porém, a maioria das mulheres que morrerão de cancro do colo do útero nos próximos 20 anos já foram infetadas pelo HPV. Uma possível resolução para este problema pode ser: as mulheres que não foram contempladas nos programas nacionais de vacinação seriam submetidas a vacinação contra um largo espectro de tipos de HPV. Esta vacinação seria seguida, pelo menos

dois anos depois, pelo teste de HPV e tratamento imediato de todas as infecções por HPV de alto risco. Qualquer infecção com um HPV de alto risco incluído na vacina administrada detetada 2 anos após a vacinação poderia ser considerada uma infecção persistente, justificando tratamento imediato. A partir de uma determinada idade (que teria de ser definida), o risco de cancro do colo do útero em mulheres que não têm uma infecção persistente por HPV, poderá ser tão baixo que a vacinação não seria custo-efetiva, independentemente do preço da vacina. A possibilidade de deteção de infecções persistentes com HPV de alto risco com apenas um teste de HPV constitui a grande vantagem da vacinação polivalente em mulheres de idade mais avançada (Franceschi et al., 2011).

Teoricamente existe a possibilidade de que a erradicação de alguns tipos de HPV promova um aumento da prevalência da infecção por outros tipos não incluídos na vacina. Este fenómeno é designado “*type replacement*” e ocorre quando duas premissas são cumpridas: existe competição parcial entre diferentes tipos de HPV aquando da infecção natural e a vacina não apresenta proteção cruzada contra os tipos de HPV envolvidos nesta mesma competição natural. Vários estudos foram realizados no sentido de avaliar este fenómeno, não parecendo haver competição natural entre os vários tipos de HPV, logo, o “*type replacement*” parece improvável. A taxa de mutação do HPV é muito baixa, portanto é pouco provável que surjam novos tipos de HPV. Se assim não fosse, seria necessária uma adaptação periódica da constituição da vacina para que esta correspondesse às necessidades populacionais no que toca à prevalência dos diversos tipos de HPV (Dillner et al, 2010). Este é outro motivo que corrobora a importância da continuação dos estudos epidemiológicos relativos à prevalência da infecção pelo HPV após a introdução da vacina.

2.2. Imunogenicidade e Segurança

Ambas as vacinas são altamente imunogénicas, provocando a produção de um elevado título de anticorpos em quase 100% dos indivíduos vacinados (Stanley, 2010). Num ensaio clínico observador-cego foram comparadas as duas vacinas profiláticas quanto à sua imunogenicidade, verificando-se que, apesar de serem ambas extremamente imunogénicas, a vacina bivalente apresentava maior imunogenicidade (Einstein et al., 2009). Porém não é claro se uma maior imunogenicidade se irá traduzir numa maior duração de ação. A determinação da duração do efeito protetor da vacina é essencial, para se averiguar a necessidade de aplicação de reforços vacinais (Ma et al., 2010b). A continuação dos ensaios clínicos revela-se, também por este motivo, essencial.

Comparativamente a outras vacinas, estas não são vacinas vivas nem contêm ADN do HPV, o que melhora o seu perfil de segurança (Villa et al., 2011).

Ambas as vacinas (quadrivalente e bivalente) são, de uma forma geral, bem toleradas, em mulheres de todas as idades (Romanowski e tal., 2009). O efeito adverso mais comum é a inflamação local (dor, rubor e edema). Estas vacinas foram, embora raramente, associadas a anafilaxia e síncope, tal como outras vacinas já existentes. Outros efeitos adversos, ainda mais raros, incluem eventos tromboembólicos, síndrome de Guillain-Barré e esclerose múltipla. Não são aconselhadas durante a gravidez, embora ainda não existam evidências conclusivas de efeitos adversos em mulheres grávidas às quais foi administrada uma destas vacinas inadvertidamente (Brotherton e Gertig, 2011).

2.3. Impacto no rastreio citológico

O impacto da vacinação na prevalência de anormalidades cervicais associadas ao HPV fará com que seja necessário adaptar os programas de rastreio citológico. A diminuição significativa da prevalência de lesões de alto risco poderá conduzir à diminuição da performance dos citologistas (que individualmente verão menos lesões deste tipo). O intervalo de rastreio terá de ser aumentado, já que os intervalos atuais deixarão de ser custo-efetivos. Num futuro próximo é provável que o teste de ADN do HPV seja integrado no algoritmo de rastreio como o primeiro exame de rastreio a ser efetuado (Brotherton e Gertig, 2011). Os testes de ADN do HPV são, de facto, mais reprodutíveis e fiáveis que a citologia ou a inspeção visual com ácido acético. (Franceschi et al., 2011)

Até que sejam feitos estudos de base populacional acerca da performance da citologia, dos testes de identificação do HPV e da eficácia da vacinação, com resultados consistentes, a alteração das atuais *guidelines* dos programas de rastreio é prematura. Eventualmente, num futuro próximo, poderá ser possível proceder a estas mesmas alterações, nomeadamente com um início mais tardio do rastreio e com maiores intervalos entre rastreios, particularmente em mulheres que foram vacinadas antes da primeira relação sexual.

O impacto mais imediato poderá resultar do início mais tardio do rastreio. Tendo em conta que o cancro do colo do útero é raro antes dos 25 anos, o atraso no início do rastreio iria resultar num número mínimo de casos de cancro não detetados antes dos 25 anos. Por outro lado, como a maioria das anormalidades na citologia são atribuíveis a infeções transitórias por HPV, com potencial oncogénico mínimo, o atraso no início do rastreio iria também resultar na diminuição de testes falsos positivos (associados a

situações destinadas a resolução espontânea, sem terapia). Menos falsos positivos significam menos testes de *follow-up*, logo menos custos e tratamentos com potencial efeito nefasto para o paciente. O aumento do intervalo entre rastreios teria um impacto semelhante, embora mais tardio. No entanto, mesmo que ocorra a eliminação dos carcinomas associados aos HPV 16 e 18, o rastreio terá de permanecer para a prevenção de carcinomas associados a outros tipos de HPV (Massad et al., 2009). De notar que as *guidelines* para o rastreio de mulheres não vacinadas teria de permanecer idêntico. A possibilidade destas alterações é relevante, já que o sobre-rastreio (*overscreening*) pode ser prejudicial para a mulher, nomeadamente pela necessidade de faltar ao emprego, deslocações incómodas, custos, ansiedade, entre outras.

3. Futuro

3.1. Vacinas preventivas de segunda geração

O fabrico de vacinas de segunda geração visa três objetivos essenciais: alargar o espectro de proteção da vacina de forma a incluir o máximo de tipos de HPV oncogénicos possível; induzir uma proteção de longo termo contra os tipos de HPV contidos na vacina, mantendo a elevada eficácia das vacinas atuais e a construção de vacinas económicas (termo-estáveis, administradas por métodos não injetáveis e que mantenham uma proteção de longo termo com uma única dose) (Kwak et al., 2011). Qualquer nova vacina profilática que seja desenvolvida, terá que forçosamente ser comparada com as disponíveis atualmente (Stanley, 2010).

As vacinas PVL atuais são eficazes contra os tipos de HPV nelas contidos, porém, a sua eficácia contra outros tipos de HPV está dependente da existência de proteção cruzada que, por sua vez, depende de proximidade filogenética de outros tipos de HPV aos tipos contidos na vacina (Mariani e Venuti, 2010).

De acordo com a figura 3, a inclusão dos 15 tipos de HPV oncogénicos, conhecidos até hoje, numa só vacina poderia permitir a prevenção de cerca de 94,8% dos casos de cancro do colo do útero, caso a eficácia desta potencial vacina fosse semelhante às vacinas bivalente e quadrivalente analisadas (Moscicki, 2008 e Stanley, 2010). Nos EUA decorreu um ensaio clínico de fase III que avaliou uma vacina nonavalente, a V503. Os resultados deste ensaio deverão ser publicados em 2012 (Kwak et al., 2011). Existem contudo desvantagens associadas ao aumento da valência de L1, nomeadamente uma maior complexidade técnica associada a um incremento do custo da vacina, a possibilidade da competição antigénica dificultar a seleção da dosagem e

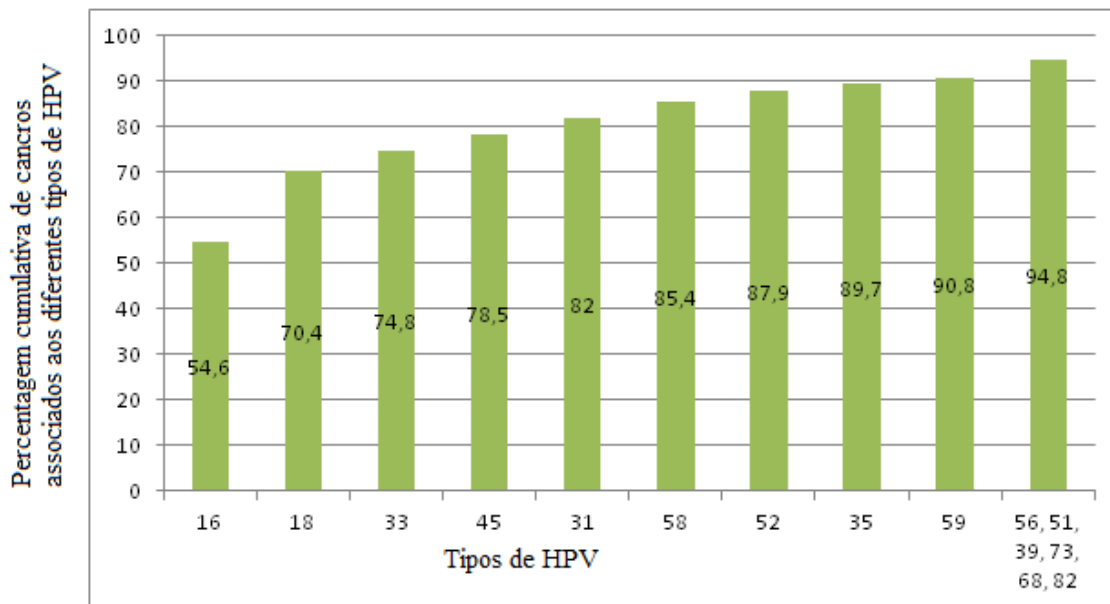


Figura 3 – Percentagem cumulativa do cancro do colo do útero associado aos vários tipos de HPV oncogénicos. Adaptado de Moscicki (2008).

promover ainda uma maior reatividade, visto que quantidades relativamente grandes de proteína serão administradas (Huh e Roden, 2008). Dado que a incidência da infeção pelos outros tipos de HPV é significativamente mais baixa que a dos HPV 16 e 18, serão necessários ensaios clínicos com um grande número de participantes para que se possam obter resultados com poder estatístico (Stanley et al., 2008).

O custo das vacinas profiláticas continua a ser o principal obstáculo para a implementação de programas de vacinação contra o HPV em vários países, particularmente nos países em vias de desenvolvimento, onde a prevalência da infeção pelo HPV é particularmente preocupante (Jagu et al., 2010). Uma das formas de minimizar o custo seria a aplicação de um programa de vacinação com apenas 2 doses de vacina ao invés das 3 doses habituais. Alguns estudos já realizados comprovam que a aplicação de apenas 2 doses da vacina (quadrivalente ou bivalente) apresenta uma imunogenicidade e eficácia comparáveis, relativamente à incidência e persistência da infeção pelos HPV 16 e 18 (Franceschi et al., 2011). No entanto a proteção a longo

termo contra CIN2+ permanece desconhecida (Massad et al., 2009). A introdução de vacinas contra o HPV em locais onde as necessidades humanas essenciais como alimentação e água potável não existem, obriga a que estas vacinas estejam disponíveis a preços muito acessíveis (Palmer et al., 2009). A GAVI (*Global Alliance for Vaccines Immunisation*), uma sociedade que subsidia a vacinação nos países mais pobres do mundo, classificou a vacinação contra o HPV como uma prioridade em 2009. Ambos os produtores das vacinas quadrivalente e bivalente comprometeram-se a efetuar uma venda com preços diferenciados ou sem fins lucrativos para os países subdesenvolvidos. Desta forma, o preço destas vacinas nos países subdesenvolvidos é inferior àquele verificado nos EUA. Ainda assim, a despesa necessária para a implementação de programas vacinais contra o HPV mantém-se incomportável numa grande parte dos países subdesenvolvidos (Franceschi et al., 2011). Consequentemente, é da maior importância que sejam encontradas soluções, no sentido de tornar a vacinação contra o HPV mais acessível. O aumento progressivo da população-alvo das vacinas assim como o surgimento de vacinas profiláticas de segunda geração deverão resultar na diminuição do preço das vacinas atuais (Brotherton e Gertig, 2011).

Alguns estudos demonstraram que as PVL do HPV podem ser produzidas em algumas espécies de plantas como tabaco, tomateiros e batatas. Estas são técnicas económicas que poderiam inclusivamente permitir a produção de vacinas nos países subdesenvolvidos (Waheed et al., 2011). A produção de PVL em tomates permite o desenvolvimento de vacinas orais, termo-estáveis e económicas, que seriam administradas sob a forma de suspensões orais a serem consumidas sob vigilância. Todavia, as PVL L1 demonstraram uma imunogenicidade relativamente fraca, quando administradas por via oral (Mariani e Venuti, 2010).

A diminuição do custo das vacinas preventivas pode ser também obtida com recurso a vacinas de capsómeros L1 (a subunidade pentamérica da PVL), já que a organização em PVL não é necessária para a indução da síntese de anticorpos neutralizantes (Stanley et al., 2008 e Waheed et al., 2011). Estas são produzidas com recurso à *Escherichia coli* (*E. coli*), método de produção muito económico, que permite o fabrico de vacinas estáveis à temperatura ambiente, não sendo necessário o recurso à refrigeração, facilitando o seu transporte e armazenamento (Lin et al., 2010). Permitem também a incorporação das proteínas E6 e/ou E7 para obtenção de efeito terapêutico (Stanley, 2010). Estas vacinas são menos imunogénicas que as vacinas PVL. São, ainda assim, capazes de gerar uma proteção significativa em ensaios pré-clínicos, que pode ser potenciada com o uso de adjuvantes (Kwak et al., 2011). Pesquisas recentes comprovaram a alta imunogenicidade dos capsómeros de HPV 16 derivados de *E. coli* e mostraram igualmente uma elevada correlação entre a imunogenicidade e a capacidade intrínseca da proteína se organizar em estruturas macromoleculares estáveis. Num estudo recente foi expresso um gene mutado da proteína L1 do HPV 16 (L1_2xCysM) que retém a capacidade de formação de capsómeros nos cloroplastos de plantas transplastómicas de tabaco. Estas plantas são designadas transplastómicas porque os genes pretendidos são inseridos nos cloroplastos e não no ADN nuclear. Neste ensaio a proteína recombinante atingiu uma produção de 1,5% do total de proteínas solúveis da planta (Waheed et al., 2011). Noutro estudo foi expressa uma proteína derivada da L2 do HPV 16 na superfície do vírus do mosaico do tabaco (VMT). Este é um vetor altamente imunogénico que pode ser produzido economicamente em plantas *Nicotiana* em larga escala. Num período de duas semanas, desde a inoculação das plantas até à sua colheita, numa estufa de 5000 m², foi possível purificar 500 gramas de VMT recombinante. Esta quantidade é suficiente para 5 milhões de doses de 100 µg de

vacinas contra o HPV. Apesar da vacinação em animais com estas vacinas ter induzido um título de anticorpos neutralizantes inferior ao verificado com as vacinas PVL L1, estes resultados não deixam de ser promissores (Palmer et al., 2009). O caminho a trilhar poderá passar por desenvolver vacinas resultantes da combinação de capsómeros dos diferentes tipos de HPV, de forma a atingir a multivalência (Stanley, 2010).

No que diz respeito ao limitado espectro de proteção das vacinas atuais, as vacinas L2 poderão ser uma boa solução, a um preço relativamente modesto. Aquando da infeção natural pelo HPV a resposta humoral L2-específica é fraca ou mesmo indetetável (Jagu et al., 2010). Algumas sequências de aminoácidos (aa) das proteínas L2 são altamente conservadas potenciando o fenómeno de proteção cruzada (Moscicki, 2008). Estas vacinas são menos imunogénicas que as vacinas PVL L1, já que a organização em PVL é altamente imunogénica, no entanto esta limitação é ultrapassada pelo recurso a adjuvantes potentes como os agonistas TLR (*Toll-like receptor*) do tipo 2 (Lin et al., 2010a). Estudos pré-clínicos demonstraram que a imunização de vacas e coelhos com a proteína L2 protegeu contra a infeção mucosa e cutânea, respetivamente, pelo papillomavirus animal homólogo (Mariani e Venuti, 2010). A proteína L2 foi incluída numa vacina prospetivada para efeito terapêutico, a TA-CIN, uma vacina terapêutica que será discutida no respetivo capítulo (Mariani e Venuti, 2010). A sua capacidade de induzir a síntese de anticorpos L2-específicos indica a possível aplicabilidade com efeito preventivo. Se esta vacina for aplicada após a exposição ao HPV, o componente L2 pode participar no efeito terapêutico e gerar imunidade contra outros tipos de HPV que não o/os contido/os na infeção pré-existente (Stanley et al., 2008). Até agora, as vacinas proteicas L2 adequadamente adjuvadas são as mais promissoras no que diz respeito às premissas assumidas para novas vacinas preventivas,

através de um alargamento do espectro, baixo preço, termo-estabilidade e administração não invasiva (Stanley, 2010).

A vacinação não injetável, aplicada diretamente nas mucosas, apresenta variadas vantagens, nomeadamente uma administração mais fácil e indolor, aumentar a capacidade de vacinação em massa, reduzir os custos associados à produção, armazenamento e transporte e induzir respostas imunes locais ótimas (Stanley et al., 2008). A administração intranasal e inalatória são uma possibilidade, no entanto existem algumas preocupações quanto à sua segurança. A via rectal é outra opção, podendo ser utilizado o imiquimod como adjuvante (que já é comercializado para aplicação rectal) (Stanley et al., 2008). A via oral parece manter-se a mais prática, mas requer uma elevada quantidade de antígenos, dada a sua degradação no estômago (Bermúdez-Humarán et al., 2011). Uma possibilidade é a utilização de vetores vivos que naturalmente infetam o Homem pela via oral. Um exemplo são as estirpes recombinantes de L1 dos HPV 16 e 18 de *Salmonella typhi* da vacina oral já existente contra a febre tifóide, que já foi avaliada em ensaios pré-clínicos (Palmer et al., 2009). De salientar que a vacina oral contra a febre tifóide já é comercializada há décadas, pelo que o seu perfil de segurança é bem conhecido, assim como a vacina do rotavírus, por exemplo, pelo que esta via será a que provavelmente tem maior lugar para exploração (Kwak et al., 2011).

Uma das principais dificuldades na produção de vacinas de segunda geração é o desconhecimento do nível de anticorpos necessário para produzir imunidade, o que contribuiu para os elevados custos associados aos ensaios clínicos das vacinas atualmente comercializadas, facto este que transpareceu no custo das mesmas. O mesmo se verifica, então, para a produção de novas vacinas, o que terá de ser contornado pelos

investigadores. Há inclusive quem considere que seria mais produtivo o investimento na subsídio das vacinas já comercializadas do que propriamente da produção e investigação de novas vacinas (Palmer et al., 2009).

3.2. Vacinas terapêuticas

As estratégias atuais de rastreio de lesões pré-invasivas do colo do útero necessitam de infraestruturas e financiamento que estão para além dos recursos disponíveis nos países onde o cancro do colo do útero é mais prevalente (Trimble e Frazer.,2009). Apesar da elevada eficácia das atuais vacinas preventivas, a alta prevalência do cancro do colo do útero não foi, ainda, alterada. Estima-se que serão precisos aproximadamente 20 anos desde a implementação da vacinação preventiva em massa para que esta tenha impacto na prevalência do cancro do colo do útero, dada a elevada incidência da infeção pelo HPV e a lentidão do processo de carcinogénese (Ma et al., 2010a). No entanto, a vacinação em massa revela-se um processo difícil, particularmente por motivos financeiros (Lin et al., 2010). Portanto, o benefício profilático no que diz respeito ao cancro do colo do útero será a longo prazo, enquanto o benefício terapêutico poderá ser a curto/médio prazo. Por conseguinte, o impacto global da infeção pelo HPV enfatiza a importância da produção de vacinas terapêuticas (Ma et al., 2010a).

Ao contrário da resposta humoral produzida pelas vacinas preventivas contra o HPV, o objetivo essencial das vacinas terapêuticas é gerar uma resposta imune mediada por linfócitos T contra as células infetadas pelo HPV (Daayana et al., 2010). Pretende-se, assim, a ativação de LTc e LTh1 HPV-específicos (van der Burg e Melief, 2011).

Quando ocorre integração do genoma viral no ADN das células infetadas pelo HPV, estas podem não expressar as proteínas L1 e L2. A expressão destas proteínas após a infeção primária pelo HPV é indetetável ao nível das células basais e das lesões malignas associadas ao HPV. De facto, as vacinas Gardasil® e Cervarix® não têm efeito terapêutico em infeções por HPV pré-existentes nem nas lesões a ele associadas (Hung et al., 2008).

Deste modo as vacinas terapêuticas necessitam de outro alvo antigénico que seja expresso constitutivamente nas células tumorais associadas ao HPV e não nas células saudáveis. Para além de serem sintetizadas constitutivamente nas células infetadas pelo HPV, as proteínas E6 e E7 são essenciais para a indução e manutenção da transformação celular, pelo que é improvável que sejam perdidas numa tentativa de fuga ao sistema imunitário, representando alvos ótimos para as vacinas terapêuticas (Chuang et al., 2009). Por outro lado, dado que as proteínas E6 e E7 são proteínas estranhas ao organismo humano, a utilização de vacinas contra tumores associados ao HPV ultrapassa um problema comumente associado a vacinas utilizadas no cancro: a tolerância imunitária. (Hung et al., 2008). De notar que o cancro do colo do útero em fase mais avançadas será provavelmente um alvo fraco para terapias antigénio-específicas, já que nesta fase os tumores frequentemente apresentam mutações e deleções de genes envolvidos no processamento e apresentação de antigénios (Trimble e Frazer.,2009).

As vantagens e desvantagens dos vários tipos de vacinas terapêuticas são sistematizadas na tabela em anexo.

3.2.1. Vacinas baseadas em vetores vivos

Estes vetores são altamente imunogênicos pois a sua replicação no interior das células hospedeiras facilita a disseminação intercelular dos antígenos. Estas vacinas são capazes de apresentar os antígenos E6 e E7 às células dendríticas, estimulando assim a expressão antigênica através do MHC (*Major Histocompatibility Complex*) de classe I (para a ativação dos LTc) e classe II (para a ativação dos LTh) (Hung et al., 2008).

Existem dois tipos de vetores vivos: bacterianos e virais. Vários vetores bacterianos têm sido analisados para a produção de vacinas terapêuticas contra o HPV, nomeadamente a *Listeria monocytogenes*, o *Lactobacillus lactis*, o *Lactobacillus plantarum*, a *Salmonella entérica* e a *Salmonella typhimurium* (Hung et al., 2008 e Ma et al., 2010a). Destes, a *Listeria monocytogenes* é o vetor mais promissor, dada a sua capacidade de infectar macrófagos e monócitos, sendo também capaz de segregar listeriolisina O, permitindo a sua evasão aos fagossomas. A presença desta bactéria quer nos endossomas quer no citoplasma permite-lhe transportar antígenos estranhos quer pela via MHC-I quer pela via MHC-II, induzindo assim uma forte resposta celular e também humoral (Hung et al., 2008). A potência destas vacinas pode ser aumentada através da produção de proteínas recombinantes compostas pelos antígenos E6 ou E7 associados a moléculas imunoestimuladoras como a listeriolisina O (Lin et al., 2010).

Alguns vetores virais considerados incluem o adenovírus, vírus adeno-associados, o vírus vaccinia, alfavirus (como o vírus da encefalite equina venezuelana) e o vírus da estomatite vesicular (Ma et al., 2010a e Lin et al., 2010). Os ensaios clínicos focaram-se no vírus vaccinia dada a sua excelente capacidade de infeção e por possuir um grande genoma (Ma et al., 2010a). Alguns estudos foram também realizados para avaliar a eficácia do adenovírus como vetor em ratos: num destes ensaios foi utilizado o

adenovírus capaz de expressar a proteína de fusão CRT/E7 (onde CRT significa calreticulina), que conferiu imunidade em relação a um tumor que expressava a E7 e erradicou tumores estabelecidos. O vírus da Floresta Semliki (SFV) pode também ser utilizado como vetor, através da expressão da E7 do HPV 16, sendo capaz de induzir a ativação de LTc E7-específicos em ratos HPV-transgênicos (Lin et al., 2010).

De futuro pretende-se aumentar a imunogenicidade destas vacinas através do uso de adjuvantes e de proteínas de fusão. É também fundamental a investigação no sentido de ultrapassar a produção de anticorpos neutralizantes vetor-específicos, para que a administração repetida seja possível (Lin et al., 2010).

3.2.2. Vacinas baseadas em péptidos/proteínas

As vacinas com péptidos são seguras, estáveis e fáceis de produzir. São, no entanto, vacinas pouco imunogénicas pelo que devem ser administrados simultaneamente adjuvantes como quimocinas, citocinas e ligandos de TLR. Uma das principais limitações das vacinas baseadas em péptidos é que estas são MHC-específicas (Hung et al., 2008). Dada a natureza polimórfica do HLA, torna-se necessário identificar epítomos imunogénicos específicos nos antígenos do HPV, antes do desenvolvimento da vacina. Por conseguinte, poderá ser difícil produzir uma vacina baseada em péptidos que seja efetiva numa variedade de pacientes com diferentes HLA, tornando a vacinação em larga escala impraticável (Moscicki, 2008). As perspetivas futuras para estas vacinas incluem o aumento da imunogenicidade e o aprimoramento dos epítomos (Lin et al., 2010).

As vacinas proteicas são também pouco imunogênicas, requerendo a co-administração de adjuvantes. Os antígenos proteicos podem ser processados e apresentados na superfície das células dendríticas, contendo todos os epítopos do HLA possíveis, ultrapassando assim o problema da especificidade para o MHC dos peptídeos (Lin et al., 2010). Porém, estas vacinas são apresentadas via MHC classe II, portanto geram fundamentalmente uma resposta humoral. Assim, o desenvolvimento de vacinas proteicas exige um aumento da sua imunogenicidade e da resposta dos LTc, através do uso de adjuvantes e proteínas de fusão (Gissmann e Nieto, 2009). Ao fundir o antígeno de interesse com determinadas proteínas como a CyaA, a EXA ou a hsp65, é possível aumentar a internalização dos antígenos pelas células dendríticas, potenciando a apresentação antigénica pelas vias MHC I e II (Hung et al., 2008).

3.2.3. Vacinas baseadas em ácidos nucleicos

As vacinas de ADN são seguras, estáveis, relativamente fáceis de produzir em grande escala e capazes de manter a expressão antigénica nas células durante mais tempo, comparativamente às vacinas proteicas ou de ARN (ácido ribonucleico). Como não induzem a produção de anticorpos anti-vetor, podem ser administradas repetitivamente, para que se possa atingir o efeito terapêutico desejado (Ma et al., 2010a). Uma das principais preocupações relativas às vacinas de ADN era a possível integração do ADN estranho no genoma das células humanas com a sua consequente transformação. Para ultrapassar este problema, o ADN dos genes E6 e E7 é alterado de forma a gerar proteínas que não condicionam a transformação oncogénica das células (Brinkman et al., 2007). Estas vacinas são pouco imunogênicas, no entanto várias estratégias podem ser utilizadas para ultrapassar esta limitação, tendo em conta o papel essencial das células dendríticas neste contexto (Lin et al., 2010).

Em primeiro lugar é possível aumentar a quantidade de células dendríticas que apresentam os antígenos e aumentar a quantidade de antígenos no seu interior. Este objetivo pode ser atingido utilizando métodos de administração da vacina que permitam direcionar o ADN para áreas ricas em células dendríticas (Hung et al., 2008). A administração intradérmica é uma das possibilidades. Esta é conseguida através de uma “pistola de genes” (*gene gun*) que dispara partículas de ouro revestidas pelo ADN pretendido, para o interior da derme direcionando o ADN para as células dendríticas imaturas da pele (as células de Langerhans) (Chuang et al., 2009). Outro modo eficaz de administração consiste na combinação da injeção intramuscular com a eletroporação. Esta última técnica permite a aplicação de uma pequena corrente elétrica que irá aumentar a entrada do ADN nas células musculares. A eletroporação provoca também uma inflamação local condicionando um microambiente favorável à manutenção da resposta imunitária induzida pela vacina (Ma et al., 2010a). Os antígenos são produzidos e libertados para o meio envolvente onde existem células dendríticas que os processam e apresentam aos linfócitos T. Num ensaio onde foram comparados diferentes métodos de administração de ADN foi demonstrado que a combinação da injeção intramuscular com a eletroporação condicionava uma maior quantidade de LTC₄-E7-específicos (Lin et al., 2010). Outras formas de administração potenciais para as vacinas terapêuticas de ADN incluem a injeção intradérmica seguida de pulsos de laser, injeção intramuscular de ADN de plasmídeos microencapsulado em biopolímeros (para proteger o ADN das nucleases), injeção intradérmica através de tatuagem, adesivos cutâneos e microagulhas (Ma et al., 2010a).

Outra forma de aumentar a quantidade de células dendríticas que expressam antígenos é facilitar a disseminação intercelular dos antígenos. Uma possibilidade

neste contexto é a formação de uma proteína quimérica constituída pela E7 e pela VP22 do Vírus Herpes Simplex tipo 1 (HSV-1). A VP22 é uma proteína capaz de mobilizar os antígenos através de transporte intercelular para células vizinhas (Hung et al., 2008). É também possível fabricar ADN que codifica antígenos ligados a moléculas que se ligam preferencialmente às células dendríticas, tais como alguns ligandos de receptores das células dendríticas (o ligando da tirosina cinase 3 *FMS-like* e algumas chaperones) (Chuang et al., 2009 e Ma et al., 2010a).

O aumento da imunogenicidade destas vacinas pode também ser conseguido aperfeiçoando a expressão dos antígenos pelas células dendríticas, o que pode ser conseguido através da otimização dos codões (Brinkman et al., 2007). Esta técnica substitui codões que não são utilizados frequentemente pelas células hospedeiras, por codões usados frequentemente de forma a aumentar a tradução dos genes em células transfectadas com o ADN (Hung et al., 2008). O aumento da expressão dos antígenos é também possível utilizando agentes capazes de desmetilação (como a 5-aza-2'-deoxicistidina), aumentando assim a expressão do ADN. Outra estratégia possível é a ligação dos antígenos a proteínas que têm como alvo o retículo endoplasmático, favorecendo uma ativação da via MHC-I e, portanto, da resposta imune celular (Ma et al., 2010a). Como exemplo temos a proteína Sig e a Hsp 70 (ver tabela em anexo). A molécula PADRE (um epítipo dos LTh), impulsiona a resposta CD4+, que por sua vez promove a ativação dos LTc (Hung et al., 2008).

Ao intensificar a interação entre as células dendríticas e os linfócitos T, é também possível aumentar a imunogenicidade. Como já foi referido, os linfócitos T induzem a apoptose das células dendríticas. Desta forma, a utilização do siARN (*short interfering RNA*) permite uma inibição temporária da apoptose destas células, para que

estas sejam capazes de ativar mais LTc (Lin et al., 2010). Qualquer uma das estratégias mencionadas tem lugar para futuros desenvolvimentos.

As vacinas de ARN auto-replicante são também promissoras. Estas vacinas derivam de alfavirus (vírus Sindbis, vírus da Floresta Semliki), sendo mais imunogénicas que as vacinas de ADN, já que se replicam no interior das células, permitindo produzir maior quantidade de antígenos. O ARN auto-replicante é modificado de forma a excluir genes estruturais do vírus, impedindo a produção de partículas virais (Hung et al., 2008). No entanto o ARN é menos estável que o ADN. Para ultrapassar esta limitação utiliza-se "*suicidal DNA*" (assim designado porque induz a apoptose das células), que é traduzido sob a forma de ARN auto-replicante nas células transfectadas. Dado que as células transfectadas entram em apoptose, não se coloca o problema da transformação celular (o que pode ocorrer nas vacinas de ADN). Para que a interação entre células dendríticas e LTc não seja prejudicada, a apoptose pode ser atrasada recorrendo à fusão do gene E7 com genes de proteínas anti-apoptóticas, o que prolonga a sobrevivência das células dendríticas (Lin et al., 2010).

3.2.4. Vacinas celulares (de células inteiras)

Existem atualmente vários métodos para a preparação de células dendríticas *ex-vivo*, nomeadamente através de vetores virais ou da transfeção de ADN codificante de antígenos, permitindo a introdução de antígenos diretamente nas células dendríticas. Mais uma vez, para que a apoptose das células dendríticas não prejudique a resposta imune celular, pode recorrer-se à transfeção das células dendríticas com siARN de forma a interferir com a expressão de moléculas que promovam a apoptose (Hung et al.,

2008). Os ensaios clínicos realizados até ao momento com este tipo de vacinas possuíam poucos participantes, portanto são necessários ensaios de maior dimensão. Não existe ainda um consenso relativamente às técnicas de cultura para o fabrico destas vacinas. A sua preparação é também dispendiosa e demorada, dada a sua natureza autóloga, por isso a sua generalização é atualmente improvável (Ma et al., 2010a). Visto que as células dendríticas carregadas com antígenos têm de se deslocar até aos órgãos linfóides, de forma a ativar os LTc, a via de administração é um assunto relevante. Deste modo, é necessário manter a investigação destas vacinas relativamente às possíveis vias de administração, ao aumento da imunogenicidade, ao desenvolvimento de técnicas eficientes para introduzir os antígenos no interior das células dendríticas, assim como promover o aumento da sua sobrevivência (Ma et al., 2010a e Lin et al., 2010).

Foram também consideradas vacinas constituídas por células tumorais manipuladas *ex-vivo*, de forma a expressarem proteínas imunomoduladoras, aumentando assim a sua imunogenicidade *in-vivo*. A principal vantagem deste tipo de vacinas, constitui o facto de não ser necessário identificar os antígenos tumorais (Hung et al., 2008). No caso do cancro do colo do útero, já são conhecidos os principais antígenos tumorais (nomeadamente a E6 e a E7), pelo que esta vantagem não se aplica. Já existem ensaios clínicos com vacinas baseadas em células tumorais para o tratamento de várias formas de cancro, como por exemplo o melanoma e o carcinoma pancreático. O uso destas vacinas causa alguma relutância, dado o risco de poderem provocar o desenvolvimento de metástases (Lin et al., 2010). Vacinas autólogas individuais são dispendiosas e de difícil produção em larga escala. Por todos estes motivos, as vacinas baseadas em células tumorais têm uma importância limitada no futuro.

3.2.5. Vacinas baseadas em PVL

Segundo Chen et al (2011) uma das teorias que explica a ineficácia terapêutica das atuais vacinas profiláticas relaciona-se com os seus adjuvantes. A proposta do autor referido é que os adjuvantes das vacinas profiláticas atualmente utilizadas promovem a secreção da IL-10, que por sua vez inibe a resposta imune por parte dos LTc. Isto é, há uma ativação da via MHC-II e uma inativação da via MHC-I.

A possibilidade de utilização de vacinas PVL quiméricas terapêuticas poderá estar dependente da produção de vacinas que não induzam a síntese de IL-10, ou com a administração concomitante de inibidores temporários da síntese de IL-10. No entanto, a neutralização da IL-10 pode ter efeitos secundários relevantes, já que esta citocina protege o hospedeiro de respostas imuno-patológicas. Um exemplo deste efeito foi verificado num estudo com ratos IL-10^{-/-} que desenvolveram colite crónica, devido à insuficiente regulação da resposta citotóxica (Chen et al., 2011). Salienta-se a necessidade do carácter temporário da inibição da síntese de IL-10. Note-se que estas vacinas mantêm como alvo antigénico a proteína L1 (para além da proteína E7). Recorde-se que as proteínas L1 e L2 não são expressas nas células basais que ancoram a infeção nos tecidos pré-neoplásicos ou neoplásicos, sugerindo portanto que não são bons alvos para uma vacina terapêutica (Huh e Roden, 2008).

Ora, os PVL quiméricos são PVL do HPV compostos pela proteína L1 ou L1 e L2 fundidas com outros epítomos ou polipéptidos (Moscicki, 2008). A possibilidade de fusão com as proteínas E6 e/ou E7 confere-lhe um possível carácter terapêutico (Stanley et al., 2008). Foi realizado um ensaio clínico para avaliação da eficácia da vacina PVL HPV 16 L1/E7. Porém os resultados foram desanimadores (Kaufmann et al., 2007).

3.2.6 Terapêuticas combinadas

As vacinas terapêuticas poderão ser associadas, administrando uma vacina terapêutica primária e outra vacina sob a forma de reforço para aumentar a sua eficácia, intensificando a resposta celular CD8+ HPV-específica. Estas vacinas poderão também ser associadas a outras terapias, nomeadamente quimioterapia (como a apigenina), radioterapia ou adjuvantes tópicos (Lin et al., 2010).

A eficácia terapêutica destas vacinas, no que diz respeito à regressão imuno-mediada das neoplasias associadas à infeção pelo HPV, depende não só duma resposta imune celular eficaz, como também do controlo dos mecanismos regulatórios (nomeadamente relativamente aos linfócitos T reguladores) e do microambiente que envolve o tumor (Daayana et al., 2010). Um exemplo deste efeito consiste na libertação de citocinas imunossupressoras por parte das células T reguladoras, que podem paralisar os LTc, impedindo a eliminação de lesões associadas ao HPV. Assim, a terapia imunomoduladora poder ser utilizada a fim de aumentar a eficácia destas vacinas. A eliminação das células T reguladoras do microambiente tumoral aumenta significativamente a eficácia das vacinas terapêuticas (Lin et al., 2010). A ciclofosfamida em pequenas doses promove a eliminação seletiva dos linfócitos T reguladores (isto é, sem afetar as restantes populações de linfócitos T) (van der Burg e Melief, 2011). O imiquimod é eficaz na modificação do microambiente tumoral e tem vindo a ser utilizado em ensaios clínicos em associação a algumas vacinas terapêuticas (Ma et al., 2010^a) (ver tabela em anexo). O efeito da cisplatina e da radiação na alteração do microambiente tumoral potenciam também a eficácia das vacinas terapêuticas (van der Burg e Melief, 2011)

Num futuro próximo espera-se um maior conhecimento acerca do microambiente tumoral, o desenvolvimento de melhores adjuvantes e o estudo de potenciais terapias combinadas sinérgicas, para que a eficácia das vacinas terapêuticas seja significativamente melhorada (Lin et al., 2010).

A terapia de lesões associadas ao HPV é uma área em franca expansão científica e clínica, existindo neste momento em estudo uma multiplicidade de vacinas terapêuticas em ensaios clínicos, quer utilizadas isoladamente, quer associadas a outras vacinas ou outras terapêuticas.

4. Conclusão

As vacinas profiláticas Gardasil® e Cervarix® são eficazes, imunogénicas e seguras. Contudo, a evolução desde a infeção até ao desenvolvimento de cancro invasivo é um processo prolongado, o verdadeiro impacto em termos de redução da incidência de cancro do colo do útero só será perceptível algumas décadas após a introdução da vacina. Por este motivo, os ensaios clínicos de fase III não podem utilizar o cancro como um objetivo de estudo para avaliação da eficácia, já que não é viável do ponto de vista ético (as mulheres são alvo de citologias frequentes, portanto as lesões pré-invasivas são devidamente tratadas, não chegando a ocorrer cancro). Desta forma, os estudos desenvolvidos atualmente não são ainda capazes de determinar a eficácia destas vacinas relativamente à proteção contra o cancro do colo do útero. Os estudos de base populacional a decorrer presentemente, terão de durar várias décadas para que a eficácia da vacina na proteção contra o cancro seja demonstrada. No entanto, o impacto nos precursores de cancro são já conhecidos. A determinação da duração do efeito protetor da vacina é essencial, para se averiguar a necessidade de aplicação de reforços da vacina. A continuação dos ensaios clínicos revela-se, também por este motivo, essencial

O objetivo futuro essencial será utilizar a vacinação e o rastreio citológico como técnicas complementares na prevenção do cancro do colo do útero. Tendo em conta que as vacinas quadrivalente e bivalente são apenas eficazes contra alguns tipos de HPV, o rastreio citológico terá de manter-se. É também importante eliminar nas mulheres a falsa sensação de segurança após a vacinação, quer em relação à possível infeção por outros tipos de HPV não contidos nas vacinas, quer relativamente às outras DST para que haja uma maior adesão ao rastreio e uma manutenção da proteção durante as

relações sexuais. Tendo em conta a eficácia do teste de ADN do HPV como exame de rastreio, é possível que este venha a substituir a citologia como método de rastreio do cancro do colo do útero. A aplicação da vacinação preventiva contra o HPV e dos testes de HPV genéticos como técnicas preventivas complementares terá, num futuro próximo, um grande impacto na prevenção do cancro do colo do útero (Franceschi et al., 2011). A diminuição dos custos de ambas as técnicas é fulcral para a sua aplicação. O objetivo último é a implementação destes programas de vacinação e rastreio combinados, particularmente nos países em desenvolvimento, onde estes são mais precisos.

O elevado preço das vacinas preventivas dificulta ou impossibilita a sua introdução nos países subdesenvolvidos, onde estão 80% das vítimas de cancro do colo do útero. Por outro lado, as mulheres que não foram abrangidas pelos programas de vacinação não devem ser esquecidas. E é também necessário reter que as vacinas profiláticas não abrangem todos os tipos de HPV oncogénicos, pelo que algumas mulheres, mesmo que vacinadas, irão desenvolver cancro do colo do útero. Por todos estes motivos, a produção de vacinas terapêuticas revela-se essencial. O sucesso relativo dos múltiplos ensaios clínicos realizados até hoje para o estudo das vacinas terapêuticas contra lesões associadas ao HPV, faz adivinhar estratégias futuras nas quais as vacinas terapêuticas, os bloqueadores de mecanismos imunossupressores e as terapias convencionais serão utilizados em esquemas terapêuticos extremamente eficazes na regressão tumoral (van der Burg e Melief, 2011). Esta possibilidade deverá despertar, no seio científico, a necessidade de maior investigação das vacinas terapêuticas já em estudo e de novas vacinas com base, por exemplo, nas características do microambiente que envolve o tumor, no sentido de se apurar a aplicabilidade, eficácia e segurança

destas terapêuticas. O recente progresso na vacinação terapêutica discutida serve também de ponto de partida para o desenvolvimento de vacinas terapêuticas noutras patologias, nomeadamente noutras formas de cancro.

O papel dos clínicos na diminuição da prevalência do cancro do colo do útero é fulcral, não só através de cuidados preventivos, mas também através das estratégias terapêuticas necessárias para eliminar lesões pré-invasivas. Esta é uma patologia com grande impacto na sociedade, pela sua prevalência, morbilidade e mortalidade. Assim, é essencial a educação dos profissionais de saúde, pais e adolescentes para que haja um maior sucesso na redução das doenças associadas ao HPV.

5. Bibliografía

Bermúdez-Humarán B, Kharrat P, Chatel J, Langella P (2011) Lactococci and lactobacilli as mucosal delivery vectors for therapeutic proteins and DNA vaccines. *Microbial Cell Factories* 10(1):S4

Bonnez W (2007) Human papillomavirus vaccine – recent results and future developments. *Current Opinion in Pharmacology* 7:470-477

Brinkman J, Xu X, Kast W (2007) The efficacy of a DNA vaccine containing inserted and replicated regions of the E7 gene for treatment of HPV-16 induced tumors. *Vaccine* 25:3437-3444

Brotherton J e Gertig D (2011) Primary prophylactic human papillomavirus vaccination programs: future perspective on global impact. *Expert Review of Anti-infective Therapy* 9 (8):627-639

Castellsagué X, Muñoz N, Pitisuttithum P, Ferris D, Monsonego J, Ault K, Luna J, Myers E, Mallery S, Bautista O, Bryan J, Vuocolo S, Haupt R, Saah A (2011) End-of-study safety, immunogenicity, and efficacy of quadrivalent HPV (types 6, 11, 16, 18) recombinant vaccine in adult women 24–45 years of age. *British Journal of Cancer* 105:28-37

Chen J, Ni G, Liu X (2011) Papillomavirus virus like particle-based therapeutic vaccine against human papillomavirus infection related disease: Immunological problems and future directions. *Cellular Immunology* 269:5-9

Chuang C, Hoory T, Monie A, Wu A, Wang M, Hung C. (2009) Enhancing therapeutic HPV DNA vaccine potency through depletion of CD4+CD25+ T regulatory cells. *Vaccine* 27:684-689

Daayana S, Elkord E, Winters U, Pawlita M, Roden R, Stern P, Kitchener K (2010) Phase II trial of imiquimod and HPV therapeutic vaccination in patients with vulval intraepithelial neoplasia. *British Journal of Cancer* 102:1129-1136

Dillner J, Arbyn M, Unger E, Dillner L (2010) Monitoring of human papillomavirus vaccination. *Clinical and Experimental Immunology* 163:17-25

Direcção-Geral da Saúde (2008) Programa Nacional de Vacinação (PNV) Introdução da vacina contra infecções por Vírus do Papiloma Humano. Circular Normativa Nº: 22/DSCS/DPCD de 17/10/08

Ferrara A, Nonn M, Sehr P, Schreckenberger C, Pawlita M, Dürst M, Schneider A, Kaufmann A (2003) Dendritic cell-based tumor vaccine for cervical cancer II: results of a clinical pilot study in 15 individual patients. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 129(9): 521-30

Franceschi S, Denny L, Irwin K, Jerónimo J, Lopalco P, Monsonogo J, Peto J, Ronco G, Sasieni P, Wheeler C (2011) EUROGIN 2010 roadmap on cervical cancer prevention. *International Journal of Cancer* 128:2765-2774

Garcia F, Petry K, Muderspach L, Gold M, Braly P, Crum C, Magill M, Silverman M, Urban R, Hedley M, Beach K (2004) ZYC101a for treatment of high-grade cervical intraepithelial neoplasia: a randomized controlled trial. *Obstetrics & Gynecology* 103(2): 317-26.

Garland S, Hernandez-Avila M, Wheeler C, Perez G, Harper D, Leodolter S, Tang G, Ferris D, Steben M, Bryan J, Taddeo F, Railkar R, Esser M, Sings H, Nelson M, Boslego J, Sattler C, Barr E, Koutsky L (2007) Quadrivalent Vaccine against Human Papillomavirus to Prevent Anogenital Diseases. *The New England Journal of Medicine* 356:1928-1943

Garland S e Smith J (2010) Human Papillomavirus Vaccines Current Status and Future Prospects. *Drugs* 70:1079-1098

Gissmann L, Nieto K (2009) The therapeutic vaccine: is it feasible? *Archives of Medical Research* 40:493-498

Harper D (2009) Current prophylactic HPV vaccines and gynecologic premalignancies. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* 21:457-464

Harper D, Franco E, Wheeler C, Ferris D, Jenkins D, Schuind A, Zahaf T, Innis B, Naud P, De Carvalho N, Roteli-Martins C, Teixeira J, Blatter M, Korn A, Quint W, Dubin G (2004) Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial. *Lancet* 364(9447):1757-65

Harper D, Franco E, Wheeler C, Moscicki A, Romanowski B, Roteli-Martins C, Jenkins D, Schuind A, Costa Clemens S, Dubin G (2006) Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial. *Lancet* 367(9518):1247-1255

Huh W, Roden R (2008) The future of vaccines for cervical cancer. *Gynecologic Oncology* 109 (2):S48-S56

Hung C, Ma B, Monie A, Tsen S, Wu T (2008) Therapeutic human papillomavirus vaccines: current clinical trials and future directions. *Expert Opinion on Biological Therapy* 8(4):421-439

Jagu S, Kwak K, Garcea R, Roden R (2010) Vaccination with multimeric L2 fusion protein and L1 VLP or Capsomeres to broaden protection against HPV infection. *Vaccine* 28 (28):4478-4486

Kanda T e Kondo K (2009) Development of an HPV vaccine for a broad spectrum of high-risk types. *Human Vaccines* 5:43-45

Kwak K, Yemelyanova A, Roden R (2011) Prevention of cancer by prophylactic human papillomavirus vaccines. *Current opinion in Immunology* 23:244-251

Lin K, Doolan K, Hung C, Wu T (2010) Perspectives for Preventive and Therapeutic HPV Vaccines. *Journal of the Formosan Medical Association* 109 (1):4-24

Lowy D, Solomon D, Hildesheim A, Schiller J, Schiffman M (2008) Human Papillomavirus Infection and the Primary and Secondary Prevention of Cervical Cancer. *Cancer* 113 (7) 1980-1993

Lu B, Kumar A, Castellsagué X, Giuliano A (2011) Efficacy and Safety of Prophylactic Vaccines against Cervical HPV Infection and Diseases among Women: A Systematic Review & Meta-Analysis. *BioMed Central Infectious Diseases* 11:13

Ma B, Roden R, Wu T (2010) Current Status of HPV Vaccines. *Journal of the Formosan Medical Association* 109:481-483 (Ma et al.,2010b)

Ma B, Xu Y, Hung C e Wu T (2010) HPV and Therapeutic Vaccines: Where are We in 2010? *Current Cancer Therapy Reviews* 6:81-103 (Ma et al.,2010a)

Mariani L e Venuti A (2010) HPV vaccine: an overview of immune response, clinical protection, and new approaches for the future. *Journal of Translational Medicine* 8:105

Massad L, Einstein M, Myers E, Wheeler C, Wentzensen N, Solomon D (2009) The impact of human papillomavirus vaccination on cervical cancer prevention efforts. *Gynecologic Oncology* 114(issue 2):360-364

Moscicki A (2008) HPV vaccines: Today and in the future. *Journal of Adolescent Health* 43(4):S26-S40

Muñoz N, Manalastas M, Pitisuttithum P, Tresukosol D, Monsonogo J, Ault K, Clavel C, Luna J, Myers E, Hood S, Bautista O, Bryan J, Taddeo F, Esser M, Vuocolo S, Haupt R, Barr E, Saah A (2009) Safety, immunogenicity, and efficacy of quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, 18) recombinant vaccine in women aged 24—45 years: a randomised, double-blind trial. *Lancet* 373 (9679):1949-1957

Muñoz N, Kjaer S, Sigurdsson K, Iversen O, Hernandez-Avila M, Wheeler C, Perez G, Brown D, Koutsky L, Tay E, Garcia P, Ault K, Garland S, Leodolter S, Olsson S, Tang G, Ferris D, Paavonen J, Steben M, Bosch F, J Dillner J, Huh W, Joura E, Kurman R, Majewski S, Myers E, Villa L, Taddeo F, Roberts C, Tadesse A, Bryan J, Lupinacci L, Giacoletti K, Sings H, James M, Hesley T, Barr E, Haupt R (2010) Impact of Human Papillomavirus (HPV)-6/11/16/18 Vaccine on All HPV-Associated Genital Diseases in Young Women. *Journal of the National Cancer Institute* 102:325-339

Palmer K, Jenson A, Kouokam J, Lasnik A, Ghim S (2009) Recombinant vaccines for the prevention of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Experimental and Molecular Pathology* 86:224-233

Rambout L, Hopkins L, Hutton B, Fergusson D (2007) Prophylactic vaccination against human papillomavirus infection and disease in women: a systematic review of randomized controlled trials. *Canadian Medical Association Journal* 177:469-479

Romanowski B, Borba P, Naud P, Roteli-Martins C, De Carvalho N, Teixeira J, Aoki F, Ramjattan B, Shier R, Somani R, Barbier S, Blatter M, Chambers C, Ferris D, Gall S, Guerra F, Harper D, Hedrick J, Henry D, Korn A, Kroll R, Moscicki A, Rosenfeld W, Sullivan B, Thoming C, Tyring S, Wheeler C, Dubin G, Schuind A, Zahaf T (2009) Sustained efficacy and immunogenicity of the human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine: analysis of a randomised placebo-controlled trial up to 6.4 years. *Lancet* 374:1975-1985

The FUTURE II Study Group (2007) Quadrivalent Vaccine against Human Papillomavirus to Prevent High-Grade Cervical Lesions. *The New England Journal of Medicine* 356:1915-1927

Trimble C e Frazer I (2009) Development of therapeutic HPV vaccines. *Lancet Oncology* 10(10):975-980

Santin A, Bellone S, Palmieri M, Ravaggi A, Romani C, Tassi R, Roman J, Burnett A, Pecorelli S, Cannon M (2006) HPV16/18 E7-pulsed dendritic cell vaccination in cervical cancer patients with recurrent disease refractory to standard treatment modalities. *Gynecologic Oncology* 100(3): 469-78

Shepherd L e Bryson S (2008) *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada* 30 (11):1025-1033

Smith G e Travis L (2011) Getting to Know Human Papillomavirus (HPV) and the HPV Vaccines. *Journal of the American Osteopathic Association* 111 (3, suppl 2): S29-S34

Stanley M (2010) Prospects for new human papillomavirus vaccines. *Current opinion in Infectious Diseases* 23:70-75

Stanley M, Gissmann L, Nardelli-Haeffliger D (2008) Immunobiology of Human Papillomavirus Infection and Vaccination – Implications for Second Generation Vaccines. *Vaccine* 26 (10):K62-K67

van der Burg S e Melief C (2011) Therapeutic vaccination against human papilloma virus induced malignancies. *Current Opinion in Immunology* 23:252-257

Vandepapelière P, Barrasso R, Meijer C, Walboomers J, Wettendorff M, Stanberry L, Lacey C (2005) Randomized Controlled Trial of an Adjuvanted Human Papillomavirus (HPV) Type 6 L2E7 Vaccine: Infection of External Anogenital Warts with Multiple HPV Types and Failure of Therapeutic Vaccination. *The Journal of Infectious Diseases* 192:2099-2107

Villa L (2011) HPV prophylactic vaccination: The first years and what to expect from now. *Cancer Letters* 305:106-112

Waheed M, Thönes N, Müller M, Hassan S, Razavi N, Lössl E, Kaul H, Lössl A (2011) Transplastomic expression of a modified human papillomavirus L1 protein leading to the assembly of capsomeres in tobacco: a step towards cost-effective second-generation vaccines. *Transgenic Research* 20:271-282

6. Anexo

Tabela 1. Vantagens e desvantagens dos diversos tipos de vacinas terapêuticas. Adaptado de Hung et al.,2008; Lin et al., 2010; Ma et al., 2010, van der Burg e Melief, 2011 e Chen et al., 2011.

Tipo de vacina	Vantagens	Desvantagens
Baseada em vetores vivos	<ul style="list-style-type: none"> - Elevada imunogenicidade; - Promovem a difusão intercelular dos antígenos; - Grande variedade de vetores disponíveis; - Propriedades imunológicas dos vetores podem ser úteis; - Podem ser alvo de engenharia genética de forma a expressar moléculas imunomoduladoras (eg citocinas). 	<ul style="list-style-type: none"> - Problemas de segurança (particularmente em indivíduos imunocomprometidos); - Desenvolvimento de imunidade ou imunidade pré-existente podem diminuir a eficácia destas vacinas e impedir a administração repetida; - Possível dominância da resposta imune aos antígenos virais em vez dos antígenos do HPV.
Baseadas em péptidos	<ul style="list-style-type: none"> - Produção fácil, estáveis e seguras; - Podem combinar múltiplos 	<ul style="list-style-type: none"> - Baixa imunogenicidade; - É necessário definir os epítomos; - Têm de ser compatíveis com o HLA

	<p>epítomos;</p> <p>- Os péptidos podem ser manipulados para aumentar a estimulação MHC.</p>	do paciente.
Baseada em proteínas	<p>- Produção fácil, estáveis e seguras;</p> <p>- Sem restrição HLA;</p> <p>- Múltiplos adjuvantes possíveis.</p>	<p>- Baixa imunogenicidade (são necessários adjuvantes);</p> <p>- A maioria gera sobretudo uma resposta imune humoral e não celular.</p>
Baseada no ADN	<p>- Seguras, estáveis;</p> <p>- Permitem administrações repetidas;</p> <p>- Produção fácil, com um elevado grau de pureza;</p> <p>- Expressão antigénica de maior duração comparativamente aos péptidos/proteínas;</p> <p>- A engenharia genética permite adicionar ao ADN genes alvo e/ou co-estimuladores;</p> <p>- Variedade de métodos de administração.</p>	<p>- Fraca imunogenicidade (não há difusão intercelular);</p> <p>- Algum risco de integração no genoma da célula hospedeira, ou transformação celular.</p>
Baseadas no ARN	<p>- Não infecciosas, não há risco de integração cromossómica ou</p>	<p>- Pouco estáveis (armazenamento e transporte difíceis);</p>

	<p>transformação celular;</p> <ul style="list-style-type: none"> - Permitem administrações repetidas; - Capacidade de auto-replicação com consequente amplificação intracelular com aumento da expressão antigénica; - Múltiplos vetores disponíveis. 	<ul style="list-style-type: none"> - Produção difícil (nomeadamente no que diz respeito à produção em larga escala); - Sem difusão intercelular.
<p>Baseadas em células dendríticas</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Elevada imunogenicidade (utiliza as células apresentadoras de antígenos mais potentes); - Existem múltiplos métodos para a introdução dos antígenos nestas células; - Potência pode ser aumentada com a transfecção de genes (nomeadamente de proteínas imunomodadoras). 	<ul style="list-style-type: none"> - Produção difícil (processamento individual de células), dispendiosas (difícil produção em larga escala); - Não existem critérios <i>standard</i> para a qualidade destas vacinas, devido ao seu carácter autólogo; - As células dendríticas podem não se dirigir para os gânglios linfáticos, onde estão a maioria dos linfócitos T (premissa necessária para uma eficácia substancial); - Possibilidade de tolerância por células dendríticas imaturas.
<p>Baseadas em células</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Útil se os antígenos tumorais não são conhecidos (pouco 	<ul style="list-style-type: none"> - Segurança (injeção de células tumorais poderá originar

tumorais	<p>relevante neste caso);</p> <ul style="list-style-type: none"> - Potência pode ser aumentada com a transfecção de genes (nomeadamente de proteínas imunomodadoras); - Aumento da probabilidade de expressão de antigénios tumorais relevantes. 	<p>metastização);</p> <ul style="list-style-type: none"> - Produção difícil, dispendiosas; - Fraca capacidade de apresentação antigénica por parte das células tumorais; - Requer a disponibilidade de linhas de células tumorais ou células tumorais autólogas.
Baseadas em PVL	<ul style="list-style-type: none"> - Seguras, produção fácil. 	<ul style="list-style-type: none"> - Aplicação em ensaios clínicos demonstra que é ineficaz.