PRISCILA LIE TOBOUTI

Expressão dos receptores Toll-like em carcinoma espinocelular de orofaringe

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Patologia e Estomatologia Básica e Aplicada

Orientador: Profa. Dra Suzana C. Orsini Machado de Sousa

São Paulo

2015

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

Catalogação da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Tobouti, Priscila Lie.
Expressão dos receptores Toll-like em carcinoma espinocelular de orofaringe / Priscila Lie Tobouti; orientadora Suzana Cantanhede Orsini Machado de Sousa. -- São Paulo, 2015.
100 p. : tab., fig.; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Patologia e Estomatologia Básica e Aplicada. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.
Versão Corrigida

1. Carcinoma de células escamosas. 2. HPV. 3. Toll-like. 4. Interleucina 6. 5. Interleucina 8. I. Sousa, Suzana Cantanhede Orsini Machado de. II Título.

Tobouti PL. Expressão dos receptores Toll-like em carcinoma espinocelular de orofaringe Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Aprovado em: / /2015

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição:_____ **Julgamento:**_____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição:_____ **Julgamento:**_____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição:_____ **Julgamento:**_____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição:_____ **Julgamento:**_____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição:_____ **Julgamento:**_____

Dedico esse trabalho ao meu marido, **Stênio Severino da Silva**, por seu carinho, compreensão e apoio durante a elaboração deste trabalho. Também dedico à **Henrietta Lacks** (*in memoriam)* e aos pacientes, estes desconhecidos, que doaram e doam células para os avanços nas pesquisas.

AGRADECIMENTOS

A ***Deus*** que até aqui esteve comigo, direcionando cada passo e cada decisão. Sou grata por todas as bençãos, cada pessoa que Ele colocou em minha vida, as quais foram essenciais para que eu chegasse até aqui. Agradeço pelo amor, pela paz que excede todo o conhecimento.

Ao meu marido **Stênio Severino da Silva** e a minha mãe **Lie Khaw Njan Tobouti** pelo amor incondicional e por estarem sempre presentes. Por sempre me apoiarem e me levantarem quando eu mais precisava.

Aos meu irmãos **Alexandre Tobouti, Isabela Tobouti, Patricia Tobouti, Filipe França** e aos meus pequenos sobrinhos **Milena e Thomas** agradeço por todo carinho.

Aos meus **tios**, **tias**, **primos**, **primas** e **avós** por sempre estarem por perto me dando todo o apoio durante estes três anos em São Paulo.

Às minhas grandes amigas, **Carol Mussi** e **Fernanda Pigatti**, por estarem presentes em tantos momentos da minha vida. Sem vocês meus dias seriam mais tristes. Obrigada por todo o apoio emocional e profissional, obrigada por sonharem comigo.

À minha orientadora, **Profa. Dra. Suzana Sousa**, por ter me proporcionado imensas oportunidades. Sem dúvida a sra. deixou marcas que serão inesquecíveis. Vi na sra. uma professora que tem qualidades que almejo ao menos chegar perto de ser. Obrigada pela confiança e toda ajuda e empenho para que este projeto fosse realizado.

Ao **Dr. Keith Hunter**, por ter aberto as portas de seu laboratório e ter me tratado com imenso carinho e atenção. Sua orientação foi de grande contribuição para este trabalho. Além disso, fui imensamente abençoada por ter tido a oportunidade de conhecer pessoas do mundo todo, as quais deixaram marcas profundas que levarei sempre comigo.

Ao **Prof. Dr. Raghu Radhakrishnan**, amigo, que sempre me motivou a me dedicar ao ensino e pesquisa.

Aos **amigos da Universidade de Sheffield**, pois eles me fizeram sentir bem em uma cidade que para mim até então era desconhecida. A distância e o tempo foram amenizados com a presença de vocês.

Aos professores da disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, **Profa. Dra. Marina Helena Cury Gallottini, Prof. Dr. Fábio**

Daumas Nunes, Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Júnior, Profa. Dra. Marilia Trierveiler Martins, e **Profa. Dra. Karem Lopez Ortega** pelos ensinamentos e incentivos

À **Zilda**, **Néia**, **Vinicius, Fátima** e **Nair** por toda atenção e cuidado. Obrigada por estarem sempre prontos a nos ajudar. Aos técnicos do laboratório de Patologia Bucal, **Juvani, Adriana** e **Elisa** por toda dedicação e competência.

Aos queridos amigos, **Bruno e Nelise**, pela amizade que se eternizará. Obrigada por sempre estarem por perto, mesmo muitas vezes estando em continentes diferentes. Agradeço ao apoio, conversas, risadas, pois com elas esses 3 anos tornaram-se mais leves. Amizade que levarei comigo e que com certeza deixaram marcas.

Aos demais colegas de **Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia** da Universidade de São Paulo pela convivência e trocas de experiências durante esses anos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo fornecimento da bolsa "Doutorado Sanduiche"

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro durante o doutorado.

Sola scriptura

Sola fide

Sola gratia

Solus Christus

Soli Deo gloria

RESUMO

Tobouti PL. Expressão dos receptores Toll-like em carcinoma espinocelular de orofaringe [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015. Versão Corrigida.

Nos últimos anos, notou-se aumento da incidência de carcinoma espinocelular de orofaringe (CECOF) associado ao HPV. Sabe-se que CECOF associado ao HPV apresenta melhor prognóstico do que CECOF não infectado por HPV. Inúmeros estudos em carcinoma cervical demonstram alterações de TLRs, isto provavelmente devido às associações das oncoproteínas E6 e E7 com estes receptores. Em humanos, existem 10 TLRs identificados, os quais colaboram na resposta imune contra bactérias, fungos e vírus, bem como colaboram na promoção ou regressão do tumor. Esta influência do TLR na carcinogênese tem sido alvo de inúmeros estudos devido à ligação entre inflamação e o câncer. O presente trabalho teve como objetivo verificar diferenças na expressão e função de receptores *Toll-like* em carcinoma espinocelular de orofaringe (CECOF). Para tal, foram utilizados trinta e sete espécimes diagnosticados como CECOF e a expressão imuno-histoquímica das proteínas p16 e TLR4 analisadas. Duas linhagens de CECOF HPV16 + e duas CECOF HPV-. foram utilizadas para análise da expressão de TLR1-10, IL-6 e IL-8, por qPCR. A detecção dos principais TLRs (TLR1, TLR2, TLR6 e TLR4) foi feita por citometria de fluxo. Para ativação da via de sinalização de TLR2, e posterior análise da expressão de IL6 e IL8, as células foram estimuladas com peptidoglicano. Para verificar a expressão e função de TLR4, as células foram estimuladas com LPS e LPS UP para posterior análise de IL-6 e IL-8, por ELISA. Os resultados demonstraram diferenças na expressão gênica de TLR1 e TLR6 entre as linhagens HPV- e o grupo HPV+ e diferenças na expressão proteica de TLR9. TLR2 apresentou aumento da expressão proteica em todas as linhagens e demonstra desencadeamento da resposta imune, com secreção de IL6 e IL8 nas linhagens HPV- (SCC72 e SCC89) e em uma das linhagens HPV+ (SCC2). Interessantemente, TLR4 não apresentou diferenças significativas na expressão gênica e proteica. Entretanto, as linhagens HPV+ não demonstraram resposta pró-inflamatória mesmo quando estimuladas com LPS e LPS ultra puro, agonista específico de TLR4. Assim, este trabalho contribui para estabelecer o perfil da expressão dos receptores *Toll-like* em linhagens celulares de CECOF HPV- e HPV+, e

aponta para alterações ocorridas na via de sinalização mediada por TLR4. Além disso, nossos resultados abrem portas para futuros estudos na avaliação de alterações causadas no sistema imune inato pelo HPV, em carcinomas espinocelulares de orofaringe.

Palavras-chave: Carcinoma de células escamosas. HPV. Toll-like. Interleucina 6. Interleucina 8.

ABSTRACT

Tobouti PL. Expression of Toll-like receptor in oropharynx squamous cell carcinoma [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015. Versão Corrigida.

The incidence of HPV- associated oropharynx squamous cell carcinoma (OPSCC) has increased in recent years. HPV- associated OPSCC has a better prognosis than OPSCC not infected with HPV. In cervical carcinoma, HPV oncoproteins E6 and E7 influence the expression of Toll-like receptors (TLR). To date, 10 TLRs have been identified in humans and many are important for the detection of bacteria, fungi and viruses, as well as regression and tumor promotion. This influence of TLR in carcinogenesis has been the subject of numerous studies, due to the connection between inflammation and cancer. This study aimed to determine differences in the expression and function of Toll-like receptor in OPSCC. Thirty-seven tumours were selected and immunohistochemistry for p16 and TLR4 was performed. Two HPV16-associated OPSCC and two OPSCC not associated to HPVcell lines were used. qPCR was performed to analyze the expression of TLR1-10, IL-6 and IL-8. The detection of the main TLRs (TLR1, TLR2, TLR6 and TLR4) was performed by flow cytometry. For activation of the TLR2-signaling pathway and subsequent analysis of IL6 and IL8 expression, cells were stimulated with peptidoglycan. To verify the expression and function TLR4 cells were stimulated with LPS and LPS UP and subsequent analysis of IL-6 and IL-8 by ELISA. The results showed differences in the expression of TLR1 and TLR6 between the HPV- group and the HPV+ group and differences in protein expression of TLR9. TLR2 has increased protein expression in all cell lines and demonstrates the trigger of the immune response, with the secretion of IL6 and IL8 in HPV- cell lines (SCC72 and SCC89) and one HPV+ cell line (SCC2). Interestingly, TLR4 showed no significant differences in gene and protein expression. However, HPV+ cell lines showed no pro-inflammatory response even when stimulated with LPS and LPS UP, a specific agonist of TLR4. This work helps to establish the profile of the expression of Toll-like receptors in OPSCC (SCC72 and SCC89) and HPV- associated OPSCC (SCC2 and SCC90), *in vitro*, and points to changes in the signaling pathway mediated by TLR4. In addition, our results open new avenues for future studies to assess changes in the innate immune system caused by HPV in oropharynx carcinomas.

Keywords: Squamous cell carcinoma. HPV, Toll-like. IL6. IL8.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Ciclo de vida do HPV 25

Figura 2.2 - Receptores *Toll-like* presentes em mamífero 31

Figura 4.1 - Figura ilustrativa de uma das membranas coradas com Ponceau S 49

Figura 5.1 - Figuras representativas da expressão imuno-histoquímica de p16 e TLR4 no Grupo CECOF-p16- positivo para TLR4. 56

Figura 5.2 - Figuras representativas da expressão imuno-histoquímica de p16 e TLR4 no Grupo CECOF-p16- negativo para TLR4. 57

Figura 5.3 - Figuras representativas da expressão imuno-histoquímica de p16 e TLR4 no Grupo CECOF-p16+ negativo para TLR4.. 58

Figura 5.4 - Figuras representativas da expressão imuno-histoquímica de p16 e TLR4 no Grupo CECOF-p16+ positivo para TLR4 59

Figura 5.5 - Expressão proteica de p16 na linhagens SCC2, SCC72, SCC89, SCC90 e THP1 por Western blot 60

Figura 5.6- Expressão de TLR1 em linhagens HPV- (SCC72 e SCC89), HPV16+ (SCC2 e SCC90) e HPV18+ (Hela) 61

Figura 5.7- Expressão gênica de TLR3 62

Figura 5.8- Expressão gênica de TLR5. 63

Figura 5.9 - Expressão de TLR6 nas linhagens HPV- (SCC72 e SCC89), HPV16+ (SCC2 e SCC90) e HPV18+ (Hela): 64

Figura 5.10 - Expressão de TLR9 nas linhagens HPV- (SCC72 e SCC89), HPV16+ (SCC2 e SCC90) e HPV18+ (Hela) 66

Figura 5.11 - Expressão de TLR2 nas linhagens HPV- (SCC72 e SCC89), HPV16+ (SCC2 e SCC90) e HPV18+ (Hela). 68

Figura 5.12 - Comparação da expressão de TLR2 entre diferentes estímulos (PGN, LPS e LPS UP) em uma mesma linhagem 69

Figura 5.13 - Expressão de TLR2 após estímulo com Peptidoglicano (PGN).. 70

Figura 5.14 - Expressão de IL6 e IL8 após estímulo com peptidoglicano (PGN) 72

Figura 5.15 - Expressão de TLR4 nas linhagens HPV- (SCC72 e SCC89), HPV16+ (SCC2 e SCC90) e HPV18+ (Hela) 73

Figura 5.16- Comparação da expressão de TLR4 entre diferentes estímulos (PGN, LPS e LPS UP) em uma mesma linhagem 74

Figura 5.17 - Expressão de TLR4 após estímulo com lipopolissacarideo ultra puro (LPS) 75

Figura 5.18 - Expressão de IL6 e IL8 após estímulo com lipopolissacarideo (LPS) 76

Figura 5.19 - Expressão de TLR4 após estímulo com lipopolissacarideo ultra puro (LPS UP)77

Figura 5.20 - Expressão de IL6 e IL8 após estímulo com lipopolissacarideo ultra puro (LPS UP) 79

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1– Especificações dos anticorpos utilizados nas reações de imunohistoquímica..36

Tabela 4.2- Linhagens celulares utilizadas neste presente trabalho 38

Tabela 4.3 – Sequência nucleotídica dos *primers* utilizados nas reações de PCR em tempo real..... 42

Tabela 4.4 - Concentrações dos anticorpos..... 48

Tabela 4.5- Anticorpos utilizados para a análise da presença dos receptores Toll-like 1, 2, 4, 6 e 9..... 51

Tabela 5.1- Resultados da marcação dos tumores do Grupo CECOF-p16+ 55

Tabela 5.2- Expressão de TLR4 nos grupos CECOF-p16+ e CECOF-p16- 57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAA	Célula apresentadora de antígeno
CDK	Ciclina
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CEC	Carcinoma espinocelular
CECOF	Carcinoma espinocelular de orofaringe
CO_2	Dióxido de Carbono
CP	Cabeça e pescoço
Ct	*Cycle Threshold*
DAMP	Padrões moleculares associados aos danos
DMEM	*Dulbecco`s Modified Eagle Medium*
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E	Gene precoce (*Early)*
EDTA	Etilenodiaminotetracético
h	Horas
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
HPV	Papiloma vírus Humano
HPV-	Células negativas para HPV
HPV+	Células positivas para HPV
IFN	Interferon
IL	Interleucina
kDa	kilodaltons
L	Gene tardio (*Late*)
LCR	Região reguladora (*Long Control Region)*
LPS	Lipopolissacarideo
LPS UP	Lipopolissacarideo Ultra Puro
mg	miligrama
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
min	Minutos
ml	mililitro
N_2	Nitrogênio

NK	*Natural Killer*
p	nível de significância
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	Tampão fosfato salino
PGN	Peptidoglicano
PRR	Receptor de reconhecimento padrão
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RB	Retinoblastoma
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotação por minuto
RPMI	*Roswell Park Memorial Institute medium*
s	Segundos
SFB	Soro Fetal Bovino
TBS-T	Tampão Salina Tris-Tween
TH	Células T auxiliares (*helper)*
TIR	Receptor de interleucina
Tm	Temperatura de *Melt*
µg	microgramas
µl	Microlitro

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
C°	graus Celsius
>	maior
<	menor

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 20

2 REVISÃO DE LITERATURA 22

2.1 Carcinoma espinocelular de orofaringe 22
2.2 Papiloma vírus humano (HPV) 23
2.3 ...da infecção ao tumor... 24
2.3.1 Resposta do sistema imune do hospedeiro frente ao HPV 26
2.3.2 Ultrapassando a barreira do sistema imune 29
2.4 Receptores Toll-like, HPV e Câncer 30

3 PROPOSIÇÃO 34

4 MATERIAL E MÉTODOS 35

4.1 Amostra tecidual 35
4.2 Imunohistoquímica 35
4.2.1 Análise de dados 37
4.3 Cultivo celular e reagentes 38
4.4 Estímulos das células com lipopolisacarídeo de Escherichia coli, (LPS) lipopolisacarídeo de Escherichia ultra puro (LPS UP) e com peptidoglicano (PGN) de Staphylococcus aureus 39
4.4.1 Estímulo das células com LPS e LPS ultra puro *in vitro* 39
4.4.2 Estímulo das células com PGN *in vitro* 40
4.5 Análise da expressão gênica dos receptores *Toll-like* 1-10, IL-6, IL-8, através da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) 41
4.5.1 Desenho dos *primers* 41
4.5.2 Eficiênca dos *primers* 43
4.5.3 Extração de RNA 43
4.5.4 Determinação dos níveis quantitativos de RNAm dos receptores Toll-like 1-10, IL-6, IL-8 e IFN- β 44
4.6 *Western Blot* **46**
4.6.1 Extração proteica 46
4.5.2 Quantificação proteica 46
4.5.3 Eletroforese e *Western blot* 47
4.7 Análise da presença dos receptores TLR1, 2, 4, 6 e 9 por citometria de fluxo 49
4.8 Ensaio imunoenzimático (ELISA) para as citocinas IL6 e IL8 51
4.9 Análise estatística 52
4.9.1 Análise dos resultados da expressão gênica dos experimentos realizados pela metodologia qPCR 53

4.9.2 Estatística dos resultados dos experimentos realizados pela metodologia Citometria de fluxo 53

4.9.3 Estatística dos resultados dos experimentos realizados pela metodologia ELISA.....53

5 RESULTADOS 54

5.1 Avaliação imuno-histoquímica da expressão de p16 e TLR4 em carcinomas espinocelulares de orofaringe 54

5.2 Avaliação da expressão de p16 nas linhagens SCC72, SCC89, SCC2, SCC90 e THP1 por Western blot. 60

5.3 Avaliação quantitativa da expressão gênica e proteica do receptor *Toll-like*-1 (TLR1) nas linhagens SCC72, SCC89, SCC2, SCC90 e HELA 61

5.4 Avaliação quantitativa da expressão gênica do receptor *Toll-like* -3 (TLR3) nas linhagens SCC72, SCC89, SCC2, SCC90 e HELA 62

5.5 Avaliação quantitativa da expressão gênica do receptor *Toll-like* -5 (TLR5) nas linhagens SCC72, SCC89, SCC2, SCC90 e HELA 63

5.6 Avaliação quantitativa da expressão gênica e proteica do receptor *Toll-like* -6 (TLR6) nas linhagens SCC72, SCC89, SCC2, SCC90 e HELA 64

5.7 Avaliação quantitativa da expressão gênica do receptor *Toll-like* -7 (TLR7) nas linhagens SCC72, SCC89, SCC2, SCC90 65

5.8 Avaliação quantitativa da expressão gênica do receptor *Toll-like*-8 (TLR8) nas linhagens SCC72, SCC89, SCC2, SCC90 e HELA 65

5.9 Avaliação quantitativa da expressão gênica e proteica do receptor *Toll-like*-9 (TLR9) nas linhagens SCC72, SCC89, SCC2, SCC90 e HELA 66

5.10 Avaliação quantitativa da expressão gênica do receptor *Toll-like*-10 (TLR10) nas linhagens SCC2, SCC90, SCC72, SCC89 e HELA 67

5.11 Avaliação da expressão gênica e da expressão proteica do receptor *Toll-like* -2 (TLR2), IL6 e IL8 nas linhagens SCC2, SCC90, SCC72, SCC89 após estimulo com LPS, LPS-ultra puro e PGN 67

5.11.1 Expressão gênica e proteica de TLR2 nas linhagens SCC72, SCC89, SCC2, SCC90 e HELA sem estímulo 67

5.11.2 Análise qualitativa da expressão proteica de TLR2 nas linhagens SCC72, SCC89, SCC2, SCC90 e HELA estimuladas com peptidoglicano (PGN), lipopolissacarideo (LPS) e lipopolissacarideo ultra-puro (LPS UP), analisadas por Western Blot 69

5.11.3 Análise quantitativa da expressão gênica e qualitativa da expressão proteica de TLR2 nas linhagens SCC72, SCC89, SCC2, SCC90 e HELA estimuladas com peptidoglicano (PGN) 70

5.11.4 Resposta pró inflamatória de IL6 e IL8 após o estimulo com peptidoglicano (PGN)71

5.12 Avaliação da expressão gênica e proteica do receptor *Toll-like*-4 (TLR4), IL6 e IL8 nas linhagens SCC2, SCC90, SCC72, SCC89 após estimulo com LPS ultra puro e LPS 73

5.12.1 Expressão gênica e proteica de TLR4 nas linhagens SCC72, SCC89, SCC2, SCC90 e HELA sem estímulo. 73
5.12.2 Análise qualitativa da expressão proteica de TLR4 nas linhagens SCC72, SCC89, SCC2, SCC90 e HELA estimuladas com peptidoglicano (PGN), lipopolissacarideo (LPS) e lipopolissacarideo ultra-puro (LPS UP), analisadas por Western Blot 74
5.12.3 Expressão gênica e proteica de TLR4 nas linhagens SCC72, SCC89, SCC2, SCC90 e HELA estimuladas com lipopolissacarideo de *E. Coli* (LPS) 75
5.12.4 Avaliação quantitativa da expressão gênica e qualitativa da expressão proteica de TLR4 nas linhagens SCC72, SCC89, SCC2, SCC90 e HELA estimuladas com lipopolissacarideo de E. Coli ultra puro (LPS UP)..... 77
5.12.4.1 Ausência de resposta pró inflamatória de IL6 e IL8 nas linhagens positivas para HPV, após o estimulo com lipopolissacarideo de *E. Coli* ultra puro (LPS UP)..... 78
6 DISCUSSÃO 80
7 CONCLUSÃO..... 86
REFERÊNCIAS[1] 87
ANEXO A- Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa 100

1 INTRODUÇÃO

O câncer de cabeça e pescoço (CP) é o quinto tipo de câncer mais comum e o oitavo em causas de morte. Oitenta e cinco por cento (85%) dos CPs são carcinomas espinocelulares (CEC) e mais da metade destes estão associados ao consumo de tabaco e álcool (1-3). No entanto, nas últimas décadas a incidência de CECs em indivíduos não tabagistas e não etilistas aumentou, e o principal fator de risco esta associado ao HPV (1). É consenso que a maior prevalência desses CECs ocorre em indivíduos jovens, não fumantes, não etilistas, infectados por HPV e o sítio mais afetado é a orofaringe.

O CEC de orofaringe (CECOF) associado ao HPV é um tumor que apresenta características clínicas, patológicas e biológicas distintas (4). Essas características são, principalmente, pela atividade do HPV na lesão. A detecção do DNA do HPV, por si, não significa que este induziu o carcinoma. Somente o DNA do HPV de alto risco, transcrito, o qual demonstra estar ativo, tem relevância clínica e biológica na causa do CECOF (5). Isso é representado quando ocorrem mudanças moleculares causadas pelo HPV que induzem a transformação maligna. Assim, o HPV interage no genoma do hospedeiro e expressa o fator de transcrição e replicação E2, e as oncoproteínas E6 e E7, que reprimem alguns fatores de transcrição. Estas oncoproteínas se ligam e inativam a p53, regulador da p21, e retinoblastoma (Rb), regulador negativo de p16 (4, 6-8).

O HPV parece, também, modificar a expressão de receptores *Toll-like* em carcinoma de colo de útero. Alguns autores observaram redução do TLR4 e aumento dos TLRs 2, 3, 7, 8 e 9 (9, 10). Achados demonstram que em mucosa de colo de útero, o aumento da expressão de TLRs pode resultar na produção de citocinas e subsequente eliminação do vírus, enquanto que a diminuição da expressão pode colaborar para a persistência do vírus, pois debilita a resposta imune ligada aos *Tolls-like* (11). Os TLRs são mediadores centrais na resposta imune inata e adaptativa, estando envolvidos com o aumento da resposta imunológica local, principalmente por meio da estimulação e do recrutamento de células inflamatórias polimorfonucleares e mononucleares (12, 13). Assim, a resposta imune epitelial contra muitos patógenos depende do tipo de TLR expresso pelas células epiteliais (13).

Além deste papel protetor, os receptores *Toll-like* possuem um papel importante na regressão e promoção do câncer. Em particular, TLR3, TLR5, TLR7/TLR8 e TLR9 tem

efeitos anti-tumorais e, por outro lado, TLR2 e TLR4 colaboram no crescimento do tumor (14, 15). Este último, principalmente, em colo de útero, fígado, pâncreas e pele (15).

Sabe-se que os CECOFs associados ao HPV demonstram maior taxa de sobrevida, menor recorrência local e prognóstico favorável quando comparados a outros CECs (1, 2, 16), mas não há, até o momento, explicações para estes dados. Com isso, é do nosso interesse verificar se existem alterações da expressão de TLRs em carcinomas espinocelulares de orofaringe positivas e negativas para HPV.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Para melhor compreensão esta revisão foi subdivida em subseções: carcinoma espinocelular; papiloma vírus humano; ...da infecção ao tumor...; receptores *Toll-like,* HPV e Câncer.

2.1 Carcinoma espinocelular de orofaringe

O carcinoma espinocelular (CEC) em cabeça e pescoço sempre esteve associado a fatores de risco como o uso de tabaco, álcool e à predisposição genética. Entretanto, nas últimas décadas houve um aumento na incidência de CEC, principalmente em orofaringe (CECOF). Estudos epidemiológicos estimam que, mundialmente, em média, há 355 mil mortes e 633 mil casos por ano, sendo que 30-50% destes casos ocorrem em homens, leucodermas, com menos de 50 anos, não fumantes, e não etilistas. Esta porcentagem está hoje atribuída à presença do papiloma vírus humano (HPV) (17, 18).

Em uma revisão sistemática publicada há dez anos, Kreimer, et al, demonstraram uma prevalência significativamente maior de HPV em CEC de orofaringe (35.6%), quando comparados a outras localizações em cabeça e pescoço. Dentre estes casos, o tipo de HPV prevalente em CECOF foi o HPV de alto risco 16. Já o HPV18, outro HPV de alto risco, foi raro com somente 2.8% de prevalência. Outros subtipos de HPV foram mais raramente encontrados (17).

Outros sítios como cavidade bucal e laringe também são alvos dos HPVs. Estudos epidemiológicos apontam a detecção do HPV em 23,5% dos casos e, 58,2% destes casos eram HPV16+ e 34,1% HPV18+ (17). Entretanto, baseados na teoria de que a presença do HPV não quer dizer que este esteja ativo, assim como cada tecido possui uma resposta imunológica diferente (19), o potencial do HPV em induzir carcinoma em cavidade bucal ainda é bastante controverso.

Histologicamente, os carcinomas espinocelulares de CP são caracterizados por serem queratinizantes e moderadamente diferenciados, mas os carcinomas positivos para HPV

possuem um padrão diferente. São geralmente tumores pouco diferenciados, não queratinizados, com crescimento lobular e uma proeminente morfologia basalóide (20).

O tratamento de escolha para o CECOF, na maioria das situações, é a cirurgia e radioterapia, ou ainda quimioterapia ou quimiorradiação. Achados sugeriram que indivíduos com CECOF positivos para HPV, possuem melhor resposta à quimioterapia, radiação e aumento da taxa de sobrevida. Assim, HPV16 pode ser um indicador de maior sobrevida e sobrevida livre de doença (16).

2.2 Papiloma vírus humano (HPV)

É importante conhecer o vírus para melhor entender sua ação. O HPV é um DNA vírus da família *Papillomaviridae* composto por um capsídeo, não envelopado, com cerca de 7900 pares de bases (21, 22). Existem aproximadamente 200 tipos diferentes (21), dos quais 30 foram isolados da região de cabeça e pescoço (23). De acordo com o potencial oncogênico, os tipos de HPV são classificados em baixo risco ou alto risco. O grupo de baixo risco – ex. HPV6, 11 - tem o potencial de causar lesões benignas como os condilomas e papilomas, já os do grupo de alto risco – ex. HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 73 - são capazes de colaborar para o desenvolvimento de carcinomas (22). Estudos epidemiológicos e moleculares demonstraram que o HPV16 e HPV18 são os tipos mais prevalentes nos pacientes com CECOF. Outros genótipos como HPV31, 33, 39, 45, 52, 58 e 69 apresentam-se em menor porcentagem (6).

O genoma do HPV é composto por: i) genes precoces (E- *Early*), cuja função primária é a replicação episssomal, E1-E8; ii) genes tardios (L- *Late*), que codificam as proteínas do capsídeo viral, L1-L2 e iii) região regulatória (LCR- *LongControlRegion*) (24). E1 e E2 controlam o ciclo de replicação sendo E1, uma helicase que possui atividade enzimática que separa a dupla fita de DNA, colaborando, assim, para o inicio da replicação (21, 25, 26). A proteína E2 é um fator de transcrição viral, sendo essencial para a replicação e controle da expressão dos genes precoces (21, 24, 26, 27), entretanto, a proteína E3 parece não expressar em todos os tipos de HPV e sua função ainda é pouco conhecida.

A proteína E4 parece possuir importantes funções nas fases tardias, na interação com proteínas do citoesqueleto e liberação de novos virions (28), mas também parece colaborar nas fases inicias na replicação viral (29). E5 colabora com E6 e E7 para promover a hiperproliferação de células infectadas, levando assim à uma progressão maligna (30, 31), enquanto E6 e E7 são oncoproteinas fundamentais para o desenvolvimento do carcinoma e desregulam o controle do ciclo celular (19, 30-32).

Já as proteínas da fase tardia, L1 e L2 colaboram para a formação do capsídeo e liberação dos virions (30, 33).

2.3 ...da infecção ao tumor...

Para que ocorra uma infecção por este vírus é necessário mais do que um contato com a camada superficial epitelial, é necessário que haja uma microlesão, na qual o HPV irá alcançar os queratinócitos da camada basal (30, 33). Isto porque o HPV usa a diferenciação epitelial para regular sua replicação. Assim, o HPV perde o capsídeo e libera o DNA viral, como episssomo, o qual permanece no núcleo. Os genes precoces começam, então, a serem expressos e E2, a proteína que se liga ao DNA, recruta a helicase E1, a qual forma um complexo di-hexamérico que replica o genoma viral via interação com o hospedeiro (26).

A expressão de E2 também funciona como repressor da transcrição de E6 e E7 e, nas fases mais tardias, a expressão desta proteína pode ser inibida, levando a uma alta expressão das oncoproteinas E6 e E7 (26, 33). Uma das formas de inibição de E2 é quando há integração do genoma viral ao genoma da célula hospedeira, levando à perda do *Open Reading frame* de E2 (6). A perda do controle de E2 sobre a expressão de E6 e E7 pode levar à oncogênese (27). E6 e E7 possuem um papel fundamental na desregulação do ciclo celular. Essas oncoproteínas são capazes de interferir em importantes mecanismos de controle como apoptose e manutenção da estabilidade cromossômica, o que pode explicar a patogênese das doenças associadas à infecção por HPV (31, 32, 34) (Figura 2.1).

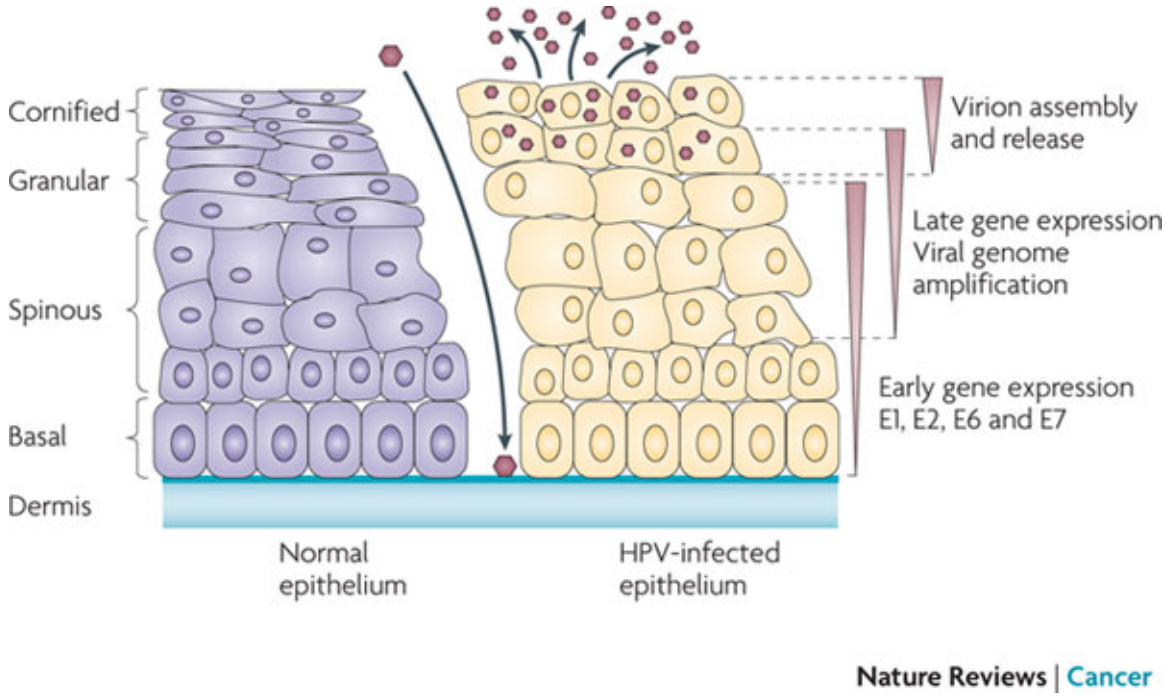


Figura 2.1- Ciclo de vida do HPV

Do lado esquerdo é mostrado epitélio estratificado pavimentoso sem infecção. Do lado direito, observa-se epitélio estratificado pavimentoso infectado por HPV. Após microlesão, o HPV infecta as células da camada basal do tecido epitelial e baixas copias do episssomo e genes precoces são expressos. A replicação viral ocorre em sincronia com a divisão celular. Após a divisão, uma filha separa-se da camada basal e sofre diferenciação. Esta diferenciação, induz a fase produtiva do ciclo de vida viral. A expressão de E6 e E7 desregula o controle do ciclo celular induzindo a diferenciação da célula para a fase S. Na fase tardia, há produção de L1 e L2 que colaboram para encapsular os novos genomas virais e virions que são excretados da camada superficial do epitélio (Fonte: Moody et al., 2010, p. 553)

Acredita-se que as células tumorais resultem da desregulação de duas grandes vias de controle do ciclo celular: a via do p53 e a via do RB e, é justamente nessas duas vias que as oncoproteínas produzidas pelo HPV têm sua ação (7).

Normalmente, o ciclo celular é controlado por ciclinas, quinases dependentes de ciclina (CDK) e seus inibidores. Existem dois grupos principais de inibidores: as famílias Cip/Kip (p21 e p27) e INK/ARF (p16 e p14). Estes grupos funcionam como supressores tumorais e estão frequentemente alterados em tumores. Essas proteínas ligam-se ao complexo ciclina/CDK, inativam e assim param o ciclo celular. A p21 liga-se às ciclinas D e E e, também, atua como uma proteína inibidora. p53 exerce papel fundamental na regulação de p21, na apoptose, bem como na diferenciação terminal do epitélio escamoso (35). p27 kip1 interage com o complexo ciclina E/*CDK2* e ciclina D/*CDK4,6* e causa uma parada no ciclo celular (35, 36). A proteína 16ink4a é uma proteína codificada pelo gene *CDKN2A* e atua como um supressor tumoral. Esta inibe *CDK4* (cyclin-dependentkinase 4), uma proteína quinase importante na fase G1 do ciclo celular. Esta quinase é responsável pela fosforilação

do gene retinoblastoma (Rb), um supressor tumoral que se liga no fator de transcrição E2F. Quando ocorre a fosforilação de RB, E2F torna-se livre para promover a transcrição (8). Inativações, degradações ou mutações em qualquer destas vias de supressão tumoral colaboram para o desenvolvimento e progressão do câncer.

Sendo assim, HPV tem como alvo as vias de supressão tumoral. A oncoproteina E7 liga-se ao supressor tumoral RB e outros membros desta família, como p107 e p130, inativando-os e permitindo a liberação do fator de transcrição E2F que permitirá a progressão do ciclo celular da fase G1 para a S (6, 30). Todos os HPVs possuem a capacidade de expressar E7, mas somente as expressas pelo HPV de alto risco tem o potencial de ligar-se fortemente às proteínas da família RB. Esta intensa afinidade leva ao aumento de p53. Sendo assim, E6 atua inibindo e destruindo p53 prevenindo, assim, apoptoses que poderiam limitar a eficiência de produção viral (30, 32).

Com isso, uma das formas de desenvolvimento do carcinoma espinocelular de orofaringe é através da integração do genoma viral com a do hospedeiro, levando à perda de E2 e aumento da expressão de E6 e E7 e consequentemente alteração do ciclo celular. Dado que nem todas as pessoas infectadas com HPV de alto risco desenvolvem câncer, demonstra que são necessárias alterações adicionais para que ocorra o desenvolvimento de uma lesão maligna (19). Sendo assim, o fracasso da defesa do sistema imune em eliminar o HPV pode levar à infecção e integração do genoma viral com a do hospedeiro.

2.3.1 Resposta do sistema imune do hospedeiro frente ao HPV

O ser humano apresenta-se sob constantes agressões, que são letais caso não haja um sistema de defesa eficiente. Por exemplo, um microrganismo que é comensal, se torna rapidamente patológico, se este sistema encontrar-se deprimido. Esta defesa é composta pela associação de dois sistemas: imunidade inata- uma imunidade imediata- e imunidade adaptativa, a qual é ativada pelo sistema inato. A primeira é composta principalmente pelo tecido epitelial, fagócitos, citocinas e complementos. Já o segundo, um sistema mais complexo, é composto por anticorpos e células como T e B. Estes sistemas estão divididos mais por questões didáticas do que de fato, pois células de um sistema podem fazer parte do outro (12) e ambos interagem para promover uma defesa efetiva.

Inúmeros estudos estão em andamento para melhor compreender o papel deste sistema frente à presença do HPV e como este consegue ser eliminado ou persistir no hospedeiro, levando a diversas lesões, tanto benignas, quanto malignas.

É importante ressaltar que a resposta imune do hospedeiro elimina em semanas ou meses grande parte das infeções por HPV em colo de útero e, somente, 10-15% das mulheres falham em conseguir desenvolver uma resposta imune adequada e desenvolvem uma infecção persistente. A persistência do vírus é um dos principais fatores de risco para o carcinoma de colo de útero (33, 37, 38).

Do mesmo modo a persistência deste vírus é um importante fator de risco para o desenvolvimento do carcinoma espinocelular de orofaringe de cabeça e pescoço (39).

2.3.1.1 resposta imune adaptativa

A maioria dos pacientes que apresentam CEC-HPV+ possui uma reposta imune adaptativa marcante no tumor. Nota-se um intenso infiltrado inflamatório de células T, o que leva a acreditar numa intensificação da resposta imune local (40), assim como existe uma maior presença de células T CD4+ e CD8+ no sangue de pacientes com CECOF-HPV+ comparados a pacientes com CECOF-HPV- ou pacientes sem tumor (40). Esta intensificação é correlacionada com a resposta imune antitumoral. Pacientes que apresentam maior número de células linfocitárias no tumor, possuem maior sobrevida (41, 42), e achado de altos números de células T CD8+ no tumor, podem indicar até três anos a mais de sobrevida (43).

A localização do tumor-HPV+ em cabeça e pescoço contribui para esta alta presença de linfócitos uma vez que a orofaringe apresenta tecidos linfóides (40). Entretanto, os achados de células CD8+ funcionais contra o HPV, mostram que estes não são meros espectadores na defesa contra o vírus (41). Pacientes que possuem melhor prognóstico e ausência de metástase demonstraram aumento da razão de CD8+/CD4+, CD8+/célula T reguladora e maior infiltrado inflamatório de células CD8+ no tumor.

CD4+ também possui um papel importante na eliminação de microrganismos. Estes são apresentados a células T após interagirem com MHC de classe 2 e diferenciam-se em subtipos, como células T auxiliares (TH) 1, TH2, TH17, células T reguladoras e TH9. Esta diferenciação é dependente das citocinas liberadas, diferenciações epigenéticas e presença de fatores de transcrição (44). de Jong, et al., 2004 demonstraram que pacientes com carcinoma de colo de útero possuíam deficiência na função das células CD4+, pois estas não secretavam ou secretavam em baixas quantidades as citocinas IFNγ e IL5.

Infiltrados de células T e citocinas como IFNγ, interleucinas (IL)-5, IL-10 estão sendo alvo de estudo em carcinoma HPV+ (40, 41, 45, 46), pois a presença destes no local ou no sistema influencia no prognóstico.

2.3.1.2 resposta imune inata

As principais células envolvidas no sistema imune inato são as células epiteliais, células dendriticas, *Langerhans* e *Natural killer* (NK). Estas células promovem o recrutamento de células inflamatórias via liberação de citocinas e conectam o sistema imune inato com a resposta adaptativa (12). O papel de cada uma delas na defesa contra o HPV não está bem estabelecido.

As partículas virais do HPV, usadas nas vacinas contra HPV de alto risco, induzem a expressão de CD86, HLA-DR, CD80 e CD83 nas células dendríticas. Em seguida, há secreção de IL-10 e IL12, esta estimula CD69 e HLA-DR das NKs, as quais secretam maiores quantidade de IFN-γ, que ajudam na resposta imune adaptativa (47). Já as células de Langerhans parecem estar reduzidas na presença de HPV de alto risco, criando um ambiente favorável à infecção (48).

As células epiteliais tem um papel fundamental na resposta imune inata, como "guardiões do portal". É dada a elas a função homeostática e a coordenação das respostas imunológicas contra microrganismos. Esses queratinócitos, como primeira barreira de defesa e células especificas de infecção do HPV, possuem um papel fundamental na persistência ou

eliminação do HPV (49). Assim como nas células dendríticas, os queratinócitos possuem diversos receptores de reconhecimento padrão (PRR- *Pattern Recognition Receptor*), que identificam os padrões moleculares associados a patógenos (PAMP), presentes em microrganismos, e padrões moleculares associados a danos (DAMPS- *Damage-Associated Molecular Patterns*). Este reconhecimento ativa as vias de sinalização para a produção de citocinas e recrutamento de células inflamatórias dos sistemas imune inato e adaptativo (50, 51).

2.3.2 Ultrapassando a barreira do sistema imune

O sistema imune possui um papel fundamental na eliminação de infecções, mas alguns microrganismos driblam ou alteram o sistema e conseguem persistir (52). Como é o caso dos HPVs de alto risco, os quais tem o potencial de modificar o sistema imune a seu favor.

A infecção por HPV é exclusiva em células epiteliais, células da primeira linha de defesa da resposta imune inata. Teoricamente, este vírus deveria ser detectado pelas células apresentadoras de antígenos (CAA) presentes nos epitélios, bem como pelo próprio sistema de reconhecimento de vírus das células epiteliais, as quais liberam citocinas para recrutamento de células inflamatórias. As CAAs levariam o antígeno do HPV para um linfonodo onde apresentariam o antígeno para as células T *naive*. Assim, as células T se diferenciariam e migrariam de volta para o local da infecção para destruir os queratinócitos. Isto é o que normalmente ocorre quando um microrganismo invade o hospedeiro. Mas o HPV de uma forma eficaz, interrompe a resposta imune inata e, consequentemente, atrasa a resposta imune adaptativa, debilitando o reconhecimento do mesmo.

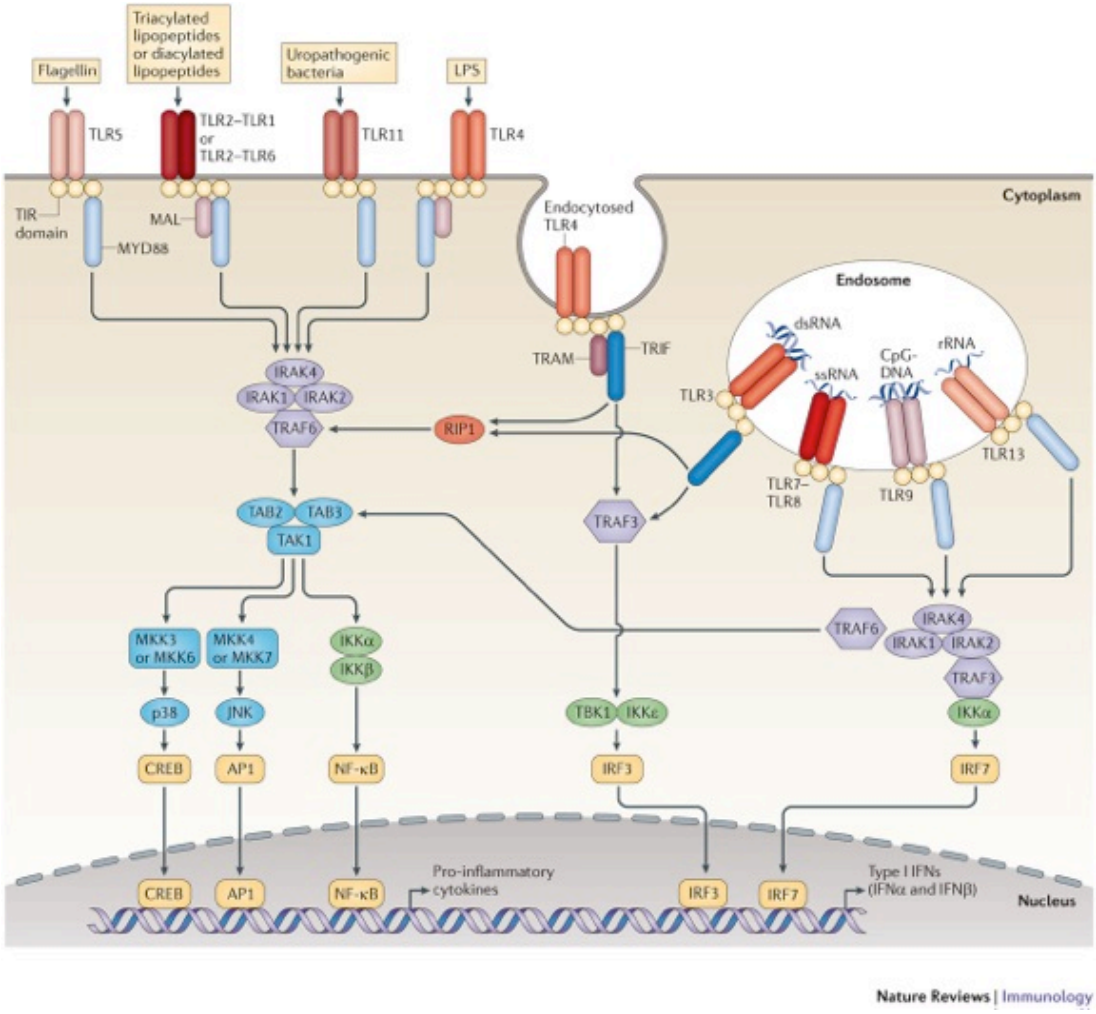
E5 e E7 do HPV de alto risco parecem ter a capacidade de reprimir a expressão de MHC de classe I (38, 41), assim, não há apresentação do antígeno e, consequentemente, leva a um menor reconhecimento pelas células T CD8+ (41). E7 do HPV16 interfere na via de tradução de sinais de JAK1/JAL2/STAT1/IRF-1, mediada por IFN, usando disto como escape e permanência na célula hospedeira (38).

Outra forma de escape ocorre pelo fato da replicação do vírus ocorrer em células que estão destinadas à morte, "morte natural", estas não emitem "sinais de alerta", assim não há recrutamento de células inflamatórias (53).

Além disto, o HPV pode permanecer latente. O vírus em sua forma latente, serve como uma estratégia, pois esse não libera proteínas virais que poderiam ser reconhecidas pelo sistema imune (19). Isto frequentemente acontece nos tumores, onde produtos virais ficam ausentes ou em menores quantidades. O vírus persiste como um episssomo e se apoia da maquinaria do hospedeiro para sua replicação. Entretanto, o vírus consegue voltar à sua forma ativa a qualquer momento.

2.4 Receptores Toll-like, HPV e Câncer

Os receptores *Toll-like* (TLR) são proteínas transmembrana tipo I presentes em inúmeras células do sistema inume, como queratinócitos e CAA. Os TLRs apresentam um ectodomínio com repetições ricas em leucina e um domínio citoplasmático homólogo ao da IL-1R (TIR) (12). Esses receptores colaboram no reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMP), os quais estão presentes em inúmeros agentes infecciosos. Até o momento foram identificados 10 tipos de TLRs em humanos (54) dentre os quais alguns atuam como homo ou heterodímeros, e são expressos tanto em membrana plasmática (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 e TLR10), quanto dentro dos endossomos (TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9) (55). Isto confere a cada TLR propriedades e funções distintas no reconhecimento de PAMPs e na resposta imune (54, 55) (Figura 2.2).



Fonte: O`Neill et al. (2013, p. 456)

Figura 2.2- Receptores *Toll-like* presentes em mamífero

Para iniciar a resposta imune, é necessária a interação receptor-ligante e a ativação do domínio TIR, a qual interage com moléculas adaptadoras, desencadeando assim, a ativação de fatores de transcrição que irão regular a reposta inflamatória. Depois da descoberta da ativação do domínio TIR ligada à molécula adaptadora MyD88, as vias de sinalização começaram a ser intensamente estudadas. Subsequentemente, foram identificados outros domínios de TIR ligados a outras moléculas, demonstrando que cada tipo de TLR recruta uma molécula adaptadora distinta. A maioria dos sinais desencadeados pelos TLRs são dependentes de MyD88. Somente o TLR3 e TLR4 utilizam uma outra molécula adaptadora, a Trif. TLR4 utiliza tanto MyD88 quanto Trif, mas ambas as moléculas ativam a cascata de

sinais pro-inflamatórios, através dos fatores de transcrição NF-κB e fator regulador de Interferon (56).

Uma vez proposto que esses sinais pró-inflamatórios podem colaborar na carcinogênese (15), estes receptores estão sendo alvo de muitos estudos. Hoje, já está bem estabelecido que existe uma ligação entre inflamação e câncer (57, 58). Apesar da inflamação ser controlada por inúmeros mediadores e vias, algumas vias possuem papel central na regulação do processo, incluindo as vias desencadeadas pelos TLRs.

Os TLRs parecem colaborar para a promoção do tumor através da ativação de sinais pro-inflamatórios, anti-apoptóticos, proliferativos e pro-fibrinogênicos, tanto no microambiente, como das próprias células tumorais, bem como parece atuar na reposta imune anti-tumoral, promovendo regressão do câncer (15). De fato, existe uma divergência de funções atribuídas aos TLRs de acordo com os órgãos e células estudadas, denotando uma dualidade no papel dos TLRs (59). Um mesmo receptor pode ter funções opostas dependendo do órgão e células afetadas, mas, na maioria dos tumores estudados, os TLRs que promovem o tumor são TLR4 e TLR2 e os que têm função de regredir são TLR3, TLR5, TLR7/8, TLR9 (15).

A função do TLR4 como colaborador na promoção do tumor está melhor estabelecida em intestino, fígado, pâncreas e pele (15). Em modelo animal, constatou-se que a super-expressão deste receptor, em intestino, modula a inflamação e colabora para a neoplasia associada à colite (60), assim como a redução de TLR4, diminui drasticamente a inflamação e colabora para a regressão do tumor. Esta regressão se aplica, também, se houver deleções na via de sinalização desencadeada por TLR4, como deleções da molécula adaptadora MyD88, ou até mesmo na eliminação da microbiota do intestino, a qual deixaria de ativar TLR4 pela interação a um PAMP, reduzindo assim, o desenvolvimento de câncer (15). Mesmo com uma vasta literatura demonstrando a função de TLR4 na carcinogênese, ainda não está totalmente compreendido como ocorre essa influência, mesmo porque, carcinomas de mama que apresentam TLR4 tem melhor resposta na quimioterapia e radioterapia, mostrando, desse modo, que em mama, o prognóstico parece ser mais favorável na presença deste receptor (61).

O TLR2, assim como o TLR4, parece promover o crescimento do tumor em alguns órgãos, como no câncer de estômago e fígado. Sua presença faz com que haja desenvolvimento de mais tumores e diminui a sobrevida do animal (15).

Os TLR3, TLR5, TLR7 e TLR8 demonstraram funções de supressão tumoral na maioria dos estudos (15). Camundongos deficientes em TLR3 demostraram possuir maior taxa de crescimento do câncer de próstata (62), assim como a ativação de TLR5 parece induzir uma potente resposta antitumoral. Sendo assim, a implantação de agonistas de TLR5, retarda o crescimento do tumor (63). Em fígado, estudo sugere aplicação clínica do agonista de TLR5 como proteção hepática e agente anti-metastático (64). Agonistas de TLR7 e TLR8 estão sendo estudados para terapia antitumoral (15), mas assim como os outros tipos de receptores, estes podem atuar de forma oposta dependendo do órgão afetado, como por exemplo o pâncreas, no qual TLR7 acelera a formação do tumor (65).

Outro receptor muito investigado como alvo na terapia antitumoral é o TLR9. Este reconhece DNA de vírus e bactérias e a sua ausência em lesões infectadas com retrovirus endógeno resulta no desenvolvimento da leucemia linfoblástica de células T. Isto sugere que TLR9, em especial, parece ser relevante em tumores induzidos por vírus. Em carcinomas de colo positivos para HPV16 houve inibição da transcrição de TLR9 e, consequentemente, da via de sinalização (15, 66).

Os TLRs são os receptores da resposta imune inata mais estudados e, nos últimos anos, estudos demonstraram que existem interações entre TLRs e HPV. Yu et al. (10), analisaram, por imuno-histoquímica, a expressão de TLR4 e notaram que havia uma diminuição deste receptor em neoplasia cervical, causada pelo HPV, assim como, notaram que esta diminuição parece estar inversamente associada com a expressão de p16INK4A, um marcador crucial de HPV (10). Daud et al. (9), analisaram TLR1-4 TLR-6-9, por RT PCR, também em neoplasia cervical, e notaram que HPV16 interfere na resposta imune inata, contribuindo para a persistência viral e o aumento da expressão de TLR2, 3, 7, 8 e 9, exceto TLR-4 (9). Por outro lado, Cannela et al. (67), demostraram que não há diferenças significativas na expressão de TLR2, 3, 4 e 7 em carcinoma de colo de útero HPV+, quando comparados aos HPV-. Além disso, TLR9 estava mais expresso nos carcinomas HPV+ (67).

Em CECOF, TLR7 e TLR9 demonstraram diferenças significativas entre HPV+ e HPV-, *in vivo* (68).

Outros estudos demonstraram que outros vírus, como o papiloma vírus bovino (69) e HTLV-1 (70), possuem a capacidade de diminuir a expressão do TLR4 em fibroblastos e macrófagos, respectivamente.

Ainda existem inúmeras controvérsias sobre o aumento ou diminuição da expressão de TLRs causadas pelo HPV e quais seriam as consequências destes eventos.

3 PROPOSIÇÃO

O presente trabalho teve como objetivo geral: verificar diferenças na expressão de receptores *Toll-like* em amostras de carcinoma espinocelular de orofaringe e em linhagens celulares derivadas HPV positivos e de carcinoma espinocelular de orofaringe negativos para HPV

Os objetivos específicos foram:

1. Avaliar a expressão proteica de TLR4 nos carcinomas espinocelulares de orofaringe positivos e negativos para a proteina16, por imunohistoquímica.

2. Avaliar quantitativamente a expressão gênica dos receptores *Toll-like* 1-10 em linhagens de carcinoma espinocelulares de orofaringe HPV- e HPV+

3. Avaliar a expressão proteica de TLR1, 2, 4, 6 e 9 nas linhagens de carcinoma espinocelulares de orofaringe HPV- e HPV+, por citometria de fluxo.

4. Avaliar a expressão gênica e proteica de TLR2 e TLR4 nas células estimuladas com Lipopolissacarideo de *Escherichia coli* (LPS), Lipopolissacarideo de *Escherichia coli* ultra puro (LPS-UP) e Peptidoglicano (PGN)

5. Avaliar a expressão das citocinas IL6 e IL8 nas células das linhagens tumorais estimuladas ou não por Lipopolissacarideo de *Escherichia coli* (LPS), Lipopolissacarideo de *Escherichia coli* ultra puro (LPS UP) e Peptidoglicano (PGN)

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (Anexo A).

4.1 Amostra tecidual

As amostras teciduais foram obtidas dos arquivos do serviço de patologia da Faculdade de Odontologia- Universidade de São Paulo.

Foram obtidos 37 casos diagnosticados de carcinoma espinocelular de orofaringe. Os casos foram analisados histomorfologicamente em hematoxilina e eosina, a fim de confirmar o diagnóstico de CEC.

Os casos selecionados foram submetidos à reação de imunohistoquimica para p16 e TLR4.

4.2 Imunohistoquímica

Foram realizados cortes de 3µm de espessura de cada espécime emblocado em parafina e estendidos em água a 37^0C. Os cortes foram transferidos para lâminas de vidro previamente tratadas com 3-aminopropiltrietoxilisano (Sigma St. Louis, MO, EUA) a 20% em etanol absoluto.

Os cortes foram desparafinizados em xilol a 60°C por 30 minutos, xilol a temperatura ambiente por 15 minutos e hidratadas em álcool, em cadeia decrescente, sendo 3 vezes em etanol absoluto e uma vez em etanol 95%, 90%, 85% e 80%. Cada banho foi de 3 min. Para remoção do pigmento formólico, foi realizado banho de 10 min em 10% hidróxido de amônio, seguido de 2 lavagens em água destilada por 5 min.

A seguir foi realizada a recuperação antigênica por meio de incubação dos espécimes e solução tampão citrato 10mM e pH 6.0, por 30min a 95^0C. Em seguida, as lâminas foram resfriadas com água destilada até temperatura ambiente. Os cortes foram então submetidos ao bloqueio da peroxidase endógena em solução de 3% de peróxido de hidrogênio diluído e 97% de álcool metílico por 30 minutos e, logo após, imersão na solução salina tamponada com solução TRIS (Tris 50mM e NaCl 150mM), pH 7,6, por 5 minutos.

Posteriormente, foi realizado o bloqueio dos sítios inespecíficos com BSA (albumina de soro bovino) a 1% por 30min. Após esta etapa e em câmara úmida, foi incubado o anticorpo primário diluído em 1% BSA conforme a Tabela 4.1 e mantida a uma temperatura de aproximadamente 4°C.

Os espécimes foram incubados com polímero Envision Link (EnVision+Dual Link System-HRP, Dako, Carpinteira, Califórnia, EUA) por um período de 30 minutos em temperatura ambiente e, posterior lavagens com tampão TRIS. Para visualização da reação antígeno-anticorpo, os espécimes já marcados com os anticorpos, foram incubados com a solução de 3,3'Diaminobenzidina Tretrahidroclorido (DAB, SIGMA, St Louis, EUA), por 5 minutos ao abrigo da luz. Os cortes microscópicos das lesões foram lavados em água destilada e, em seguida, contra- corados com hemaoxilina de Harris (SIGMA, 63103, St Louis, EUA) por 1 minuto.

As lâminas foram lavadas em água corrente e desidratadas em concentração graduais com imersão inicial em álcool 70%, 75% e 80% por 3 min cada, seguidos de imersão em álcool absoluto, mergulhados em xilol, por 5min. Por fim, as lâminas foram montadas com pelo sistema automatizado (Tissue-Tek Film Coverslipper).

Tabela 4.1- Especificações dos anticorpos utilizados nas reações de imunohistoquímica

Anticorpo	**Fabricante**	**Diluição**	**Recuperação Antigênica**	**Incubação**
P16ink4a	Abcam (ab108349)	1:1000	Ácido cítrico pH6,0	18h
TLR4	Abcam ab13556	1:1000	Ácido cítrico pH6,0	18h

4.2.1 Análise de dados

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico de luz convencional (Olimpus® CH2 – Olimpus Optical Co. Ltd – Japan) sob foco fixo e clareza de campo.

A expressão de p16 e TLR4 foi quantificada por um estudo com dois observadores independentes. As análises foram semiquantitativas.

Para análise da marcação de p16, os casos foram classificados em 0=negativo; 1+1-25% das células tumorais positivas; 2+ 26-50% das células tumorais positivas; 3+=51-75% das células tumorais imunopositivas; 4+ ≥76% das células tumorais imunomarcadas. As células tumorais precisavam apresentar positividade tanto nuclear quanto citoplasmáticas para serem consideradas positivas. Foram, também, avaliadas quanto a intensidade e classificadas em leve, moderada ou intensa. Para análise da confluência, marcações com mais de 10 células tumorais foram consideradas positivas. Neste caso, a porcentagem das células positivas para p16 foi avaliada. Foram considerados positivos os tumores que apresentaram marcação ≥76% ou >50% associada a confluência >25%. Este método foi baseado no trabalho de Lewis et al. (71). Os tumores foram divididos em 2 grupos:

- ✓ Grupo CECOF-p16+= Tumores que apresentaram ≥76% das células tumorais marcadas ou >50% com confluência maior que 25%
- ✓ Grupo CECOF-p16-= Tumores que apresentaram <76% das células tumorais marcadas ou com confluência menor que 25%.

Para análise semiquantitativa de TLR4, foram observados os cortes como um todo, excluindo as margens. A porcentagem de células positivas para TLR4 foi categorizada por meio dos scores: 0=negativo; 1+=1-25% das células tumorais positivas; 2+ 26=50%; 3+=51-75%; 4+≥76%.

As imagens foram obtidas com vídeo-câmera de alta resolução (AxioCam, Carl Zeiss MicrolmagingGmbH, Alemanha).

4.3 Cultivo celular e reagentes

Foram utilizadas 4 linhagens de células de carcinoma espinocelular de orofaringe, sendo duas positivas para HPV (SCC2 e SCC90) e duas negativas para HPV (SCC72 e SCC89). Foram utilizadas como controle células THP1 e HELA (Tabela 4.1). As linhagens celulares SCC2, SCC90, SCC72 e SCC89 foram gentilmente cedidas e testadas previamente pelo grupo do Dr. Keith Hunter da Universidade de Sheffield, Sheffield, Reino Unido. para a detecção da expressão das oncoproteinas E6 e E7. Somente as linhagens SCC2 e SCC90 apresentam expressões gênicas de E6 e E7. Também verificamos a expressão proteica de p16 nas linhagens SCC2, SCC90, SCC72, SCC89 e THP1 pela técnica de Western Blot.

Todas as células, com exceção da THP1 foram mantidas congeladas em Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), 1% penicilina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), 1% L-glutamina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em nitrogênio líquido (N_2). Depois de descongeladas, foram cultivadas em frascos plástico descartáveis de cultura de 75cm^2 (T75) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) contendo DMEM com 10% de SFB, 1% penicilina e 1% L-glutamina e deixadas na estufa à 37^{0}C contendo 5% de CO_2. O meio de cultura foi trocado 24h após o descongelamento das células e depois a cada dois dias até atingir a confluência de 70-80% da sua densidade de saturação. Em seguida, estas células foram sub-cultivadas e após a primeira passagem, as células foram utilizadas. As células THP1 foram cultivadas em RPMI *Roswell Park Memorial Institute medium* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

Tabela 4.2- Linhagens celulares utilizadas

Linhagem	**TNM**	**Localização**	**Sexo**	**HPV**
UD-SCC2	T1N2M0	Hipofaringe	Masculino	HPV16
UPCI-SCC90	T2N1M0	Base de língua	Masculino	HPV16
UPCI-SCC72	T3N2	Tonsila	Feminino	HPV-
SCC89	T4N2	Tonsila	Masculino	HPV-
HELA		Colo de útero	Feminino	HPV18
THP1				HPV-

4.4 Estímulos das células com lipopolisacarídeo de Escherichia coli, (LPS) lipopolisacarídeo de Escherichia ultra puro (LPS UP) e com peptidoglicano (PGN) de Staphylococcus aureus

Lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano é um componente estrutural presente na camada externa de bactérias gram negativas e um potente ativador do sistema imune. LPS é reconhecido por TLR4 e ativa a cascata de sinalização, levando à ativação de NF-κ B e à produção de citocinas pró-inflamatórias como IL6 e IL8. Ambos LPS e LPS UP ativam TLR4, sendo o LPS UP com maior afinidade e especificidade para TLR4.

Peptidoglicano, um componente da parede celular de bactérias Gram positivas, é reconhecido por TLR2 e ativa o sistema imune inato do hospedeiro, induzindo e liberando citocinas e quimiocinas, como IL6 e IL8.

4.4.1 Estímulo das células com LPS e LPS ultra puro *in vitro*

Cada linhagem celular (SCC2, SCC90, SCC72 e SCC89) foi cultivada, em triplicata, em um frasco T75 até chegar à confluência de 70%. Dado a devida confluência, o meio de cultura foi trocado por DMEM suplemementado com 10% FBS, 1% penicilina, 1% L-glutamina e 1μg/ml de LPS de *Escherichia coli* 0111:B4 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) ou 1μg/ml de LPS de *Escherichia coli* 0111:B4 Ultra Puro, agonista do TLR4, (InvivoGen, San Diego, California, EUA), por 24h.

Após este período, as células foram desprendidas do frasco utilizando Tripsina (Sigma-Aldrich, 0,5g de tripsina e 0,2g de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA)), transferidas para um tubo universal e centrifugadas a 1000rpm por 5 min. O precipitado (*pellet*) foi ressuspenso em 1ml de tampão fosfato-salino (PBS) e transferido para um microtubo (*eppendorf*). Este tubo foi centrifugado a 5000rpm por 4min. O sobrenadante foi removido e o precipitado congelado em -80^{0}C. Este precipitado foi utilizado para as análise da expressão gênica, por RT-qPCR, e proteica, por Western blot.

A mesma preparação foi realizada para as células utilizadas para a análise da expressão proteica por citometria de fluxo, mas ao invés de serem ressuspensas em PBS e congeladas, as células foram ressuspendidas em tampão de FACs (descrito no item 4.6).

4.4.2 Estímulo das células com PGN *in vitro*

Cada linhagem de célula (SCC2, SCC90, SCC72 e SCC89) foi cultivada, em triplicata, em frascos T75 até chegar à confluência de 70%-80%. Dado a devida confluência, o meio de cultura foi trocado por DMEM suplemementado com 10%FBS, 1% penicilina, 1% L-glutamina e 10μg/ml de PGN de *Staphylococcus aureus* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), por 24h.

As células foram desprendidas do frasco utilizando Tripsina-EDTA (Sigma- Aldrich, 0,5g de tripsina e 0,2g de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), transferidas para um tubo universal e centrifugadas a 1000 rpm por 5 min. O precipitado (*pellet*) foi ressuspenso em 1ml de tampão fosfato-salino (PBS) e transferido para um tubo de *eppendorf*. Este tubo foi centrifugado a 5000rpm por 4min. O sobrenadante foi removido e o precipitado congelado em -80^0C. Este precipitado foi utilizado para as análise da expressão gênica, por qPCR, e proteica, por Western blot.

A mesma preparação foi realizada para as células utilizadas para a análise da expressão protéica por citometria de fluxo, mas ao invés de serem ressuspensas em PBS e congeladas, as células foram ressuspendidas em tampão de FACs (descrito no item 4.6).

4.5 Análise da expressão gênica dos receptores *Toll-like* 1-10, IL-6, IL-8, através da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)

Foram realizados 4 experimentos, em triplicata, sendo:

1. Estímulo das células com 1μl/ml de LPS;
2. Estímulo das células com 1μl/ml de PGN;
3. Estímulo das células com 1μl/ml de LPS ultra puro
4. Células não estimuladas (controle)

4.5.1 Desenho dos *primers*

Os *primers* foram obtidos baseados no Banco de Dados NCBI-GenBank (National Center for Biotechnology Information), de acordo com a sequência individual de cada região gênica de TLR 1-10 e IFN-β. Os *primers* IL-6, IL-8 e U6 foram cedidos gentilmente pelo Dr. Daniel Lambert (Tabela 4.2). Para a escolha do gene endógeno foram testados 2 genes β-actina e U6. Ambas apresentaram pouca variação na expressão, mas U6 foi o gene de escolha.

Para o desenho dos *primers*, foi verificada a especificidade dos *primers* através do Primer-BLAST (ncbi.nim.nih.gov). A sequência de nucleotídeos de cada gene foi obtida através da busca de cada proteína no banco de dados da *Ensembl* (www.esembl.org). A escolha da sequência foi inicialmente aleatória e posteriormente confirmada pelo Primer-BLAST. Foram considerados os *primers* que continham de 40-60% dos nucleotídeos GC, temperatura de *melting* (Tm) entre 52-58^{0}C e diferença máxima entre a temperatura do *primer senso e antissenso* de 3^{0}C. Também, evitou-se qualquer sequência de nucleotideo que fosse complementar (ex. GATC), para evitar anelamento próprio.

Tabela 4.3- Sequência nucleotídica dos *primers* utilizados nas reações de PCR em tempo real

Gene	Senso 5`- 3`	Antissenso 5`-3	Tamanho do produto	Genbank
TLR1	CTGTGAACCTCAAGCACTTGG	GAGCAATTGGCAGCACACTA	144	NM_003263.3
TLR2	TAACAGGCTGCATTCCCAAGA	TAGTAACATGGGTAAGAGGGAGG	155	NM_001318796.1
TLR3	GTGGATAGCTCTCCTTCACCA	CAGAGCCGTGCTAAGTTGTTA	155	NM_003265.2
TLR4	AGTTTCCTGCAATGGATCAAGG	CTGCTTATCTGAAGGTGTTGCAC	84	NM_138554.4
TLR5	GATTCTTGCCCACCACATCAT	CAGGTGTCTCACTGAACTTCTG	106	NM_003268.5
TLR6	GATATCCTGCCATCCTATTGTGAG	CAGCTTCATAGCACTCAATCCC	133	NM_006068.4
TLR7	TGGAAATTGCCCTCGTTGTT	GTCAGCGCATCAAAAGCATT	99	NM_016562.3
TLR8	CAGCCTGGGAAAGGAGACTA	TCTTCGGCGCATAACTCACA	105	NM_016610.3
TLR9	AGTCAATGGCTCCCAGTTCCT	CGTGAATGAGTGCTCGTGGTA	94	NM_017442.3
TLR10	TCCAGAATGAGTGGTGCCAT	CCTTGGGCCATTCCAAGTATG	177	NM_030956.3
IL-6	AATAAAACAACCTGAACCTTCCA	TTATTGATTTTCACCAGGCAAGT	94	NM_001318095.1
IL-8	TGTGTGAAATTATTGTAAAGCTT	TAAATCTTCTCCACAACCCTCTG	91	NM_000584.3
U6	CTCGCTTCGGCAGCACA	AACGCTTCACGAATTTGCGT	96	NM_020810.3

4.5.2 Eficiênca dos *primers*

Foram feitas curvas padrão dos genes para a verificação da eficiência dos *primers* e especificidade de amplificação verificada pela curva de *Melting*. Para tal, as amostras de cDNA foram diluídas em série: não dilúida, 1:2; 1:4; 1:8; 1:16 e 1:32. Como controle negativo foi utilizada água ultra pura, descartando assim, possíveis contaminações.

Os *primers* apresentaram eficiência entre 94,17%-110%. TLR8 apresentou eficiência de 77% (Apêndice A). Apêndice B mostra a curva de *Melting* (Tm) das amostras.

Para a utilização do método comparativo por $2^{-\Delta\Delta Ct}$, foi avaliada a eficiência dos *primers* de acordo com a inclinação da reta (slope) e seguida da eficiência do *primer*. Para tal, foi utilizada a ferramenta de análise (qPCR Calculator efficiency- Thermo Fisher) disponibilizada no site https://www.thermofisher.com. (Thermo Scientific Web Tool)

4.5.3 Extração de RNA

Para a extração do RNA, as células foram cultivadas em frascos de $75cm^2$ até chegarem a uma confluência de 70%. De acordo com cada experimento as células foram estimuladas por 24h, as células foram lavadas com PBS estéril, desprendidas do frasco com Tripsina-EDTA, lavadas novamente com PBS estéril, centrifugadas a 1000rpm por 5 min e congeladas em -80^0C.

Foi utilizado o kit de extração de RNA (RNeasy mini kit, Qiagen, cat.n. 74104, Valecia, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

Para tal, o *pellet* de cada linhagem foi ressuspenso em 350µl de tampão, fornecido pelo fabricante, acrescidos de 3,5µl de mercaptano e 350µl de 100% etanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). O conteúdo foi misturado através de leve pipetagem e transferido para um microtubo acoplado com uma coluna com filtro. Este tubo foi centrifugado por 1min a 13000rpm para retenção do RNA no filtro. Em seguida, o material foi lavado com solução fornecida pela fabricante e centrifugado por 1min a 13000rpm. Nesta fase, foi realizado o

tratamento da DNase (Qiagen) adicionando 80µl (10µl de DNaseI + 70µl de tampão) de solução à coluna por 15min em temperatura ambiente.

Posteriormente, o filtro foi lavado por duas vezes com 500µl de solução fornecida pelo fabricante e centrifugado por 2min a 13000rpm. Na sequência, a coluna com o filtro foi transferida para um novo microtubo e 50µl de água livre de RNase foram adicionadas no interior da coluna, para eluição do RNA. Novamente, o tubo foi centrifugado a 13000rpm por 1min. Com isso, o RNA foi transferido para o fundo do microtubo e a coluna foi descartada.

Após a extração, a quantificação do RNA e a qualidade das amostras de RNA foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis, Thermo Scientific). Para tal, alíquotas de 1µL da amostra contendo o RNA foram transferidas para o aparelho. As amostras de RNA foram então armazenadas em -80^{0}C, para posterior utilização nas reações de transcrição reserva.

Para descartar a possibilidade de contaminação por DNA, as amostras de RNA foram amplificadas com todos os *primers* selecionados. As amostras que apresentaram amplificação foram descartadas

4.5.4 Determinação dos níveis quantitativos de RNAm dos receptores Toll-like 1-10, IL-6, IL-8 e IFN-β

Assim, prosseguiu-se para a transcrição reversa e posterior quantificação da expressão gênica.

4.5.4.1 transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)

A síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada a partir das amostras diluídas em uma concentração final de 300ng de RNA total.

Em seguida, para a reação de transcrição reversa, foi utilizado o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Thermo Fisher, Foster City, California, USA). Foram adicionados aos tubos de microcentrífuga com as amostras, 2µl de 10x RT Buffer, 0,8µl de dNTP Mix (100mM), 2µl 10x RT Random Primers, 1 µl MultiScribe Reverse Transcriptase, 1µl RNase Inhibitor e 3,2µl de água ultra pura e, posteriormente, incubadas no termociclador (Termo ciclador DYAD, DNA Engine) 25^0C por 10 min, 37^0C por 2h, 85^0C por 5 min e mantidas a 4^0C. Após a transcrição reversa, as amostras foram submetidas à reação em cadeia da polimerase em tempo real.

Os produtos da RT serviu como molde para a amplificação dos genes *TLR1-10, IL-6 e IL-8*. Para o sistema de detecção, foi utilizado o fluoróforo SYBR Green (SYBR Green Master Mix®, Applied Byosistems)

Para a realização dos ciclos de reações, foram misturados: 5µl de SYBR Green Mastermix, 3,5µl de água ultra pura, 0,5µl do *primer* senso e 0,5µl do *primer* antissenso. 9,5µl desta mistura foram adicionados em cada poço e acrescidos 0,5µl de cDNA em cada poço. O experimento foi realizado em triplicata em uma placa de 96 poços, com volume final de 10µl em cada poço. Para cada par de *primer,* foi realizado controle negativo com água ultra pura. Em seguida, as placas foram seladas com adesivo óptico (MicroAmp-Applied Biosystem), centrifugadas a 1000rpm por 2min e levada ao termociclador (7900HT Fast real time PCR).

O processo de ciclagem constistiu de desnaturação inicial, seguida de 40 ciclos de amplificação. Cada ciclo apresentou: fase inicial (50^0C por 2min), fase de desnaturação inicial (95^0C por 10min), condição de ciclagem térmica (95^0C por 15 seg) e anelamento e extensão (60^0C por min) e estágio da análise da curva de dissociação (curva de *Melt*), conferindo ausência de qualquer curva bimodal ou sinal anormal de amplificação (Apêndice B).

A análise dos dados foi realizada por meio de quantificação relativa pelo método do Ct comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), utilizando o gene U6 para controle de normalização dos dados. Como amostra calibradora foi utilizado a linhagem SCC72.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata. A média dos valores de Ct está descrita no Apêndice C. As amostras que apresentaram valores de Ct>35 foram consideradas negativas para a amplificação.

4.6 *Western Blot*

Cada linhagem (SCC2, SCC90, SCC72, SCC89, HELA e THP1) foi cultivada em um frasco de 75cm^2 e em duplicata.

Foram realizados 4 experimentos, sendo:

1. Estímulo das células com 1μl/ml de LPS;

2. Estímulo das células com 1μl/ml de peptidoglicano;

3. Estímulo das células com 1μl/ml de LPS ultra puro;

4. Células não estimuladas (controle).

4.6.1 Extração proteica

Foram adicionados aos tubos com o precipitado, 200μl de radioimunoprecipitação (RIPA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), acrescidos de inibidor de protease (PhosStop, Roche, Mannhein, Alemanha) e homogeneizadas por sonicação. As amostras foram sempre mantidas a 4^{0}C.

As amostras foram então centrifugadas a 13000rpm por 20min a 4^{0}C. Após, o sobrenadante foi coletado, transferido para um novo tubo de eppendorf e congelado em -80^{0}C até o momento do experimento. O precipitado foi descartado.

4.5.2 Quantificação proteica

Para a determinação da quantidade de proteína foi realizado o ensaio com ácido bicinconínico (BCA). O princípio deste ensaio é a formação de um complexo proteína-Cu^{+2} em condições alcalinas, seguida da redução de Cu^{+2} para Cu^{+1}. A quantidade de redução é proporcional à quantidade de proteína presente. O peptídeo ligante é capaz de reduzir Cu^{+2} para $Cu^{+1.}$ BCA forma uma reação arroxeada a qual é possível verificar por absorbância a redução de Cu^{+2}.

Para tal quantificação foi utilizado o kit comercial BCA Protein Assay kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, EUA). A diluição para a curva padrão foi 2mg/ml, 1.5mg/ml, 1mg/ml, 0,75mg/ml, 0,50mg/ml e 0,125mg/ml.

Foram utilizadas placas de 96 poços de fundo chato e adicionados 200µl do reagente A e B do kit do BCA (em uma razão de 1:50). 10ul das amostras, diluídas em 1:10, foram adicionadas em triplicata. Após, a placa permaneceu incubadas por 30min a 37^0C.

A leitura foi realizada em espectofotômetro de placas (Polarstar Galaxy) por absorbância a 540nm. Os dados de absorbância da curva padrão foram plotados, e um gráfico correspondente à absorbância e concentração proteica foi obtido. Os dados de absorbância das amostras deste trabalho foram substituídos na equação dada pela curva padrão, obtendo assim, a concentração proteica de cada amostra. Assim, foram utilizados 20ug de proteína de cada amostra.

4.5.3 Eletroforese e *Western blot*

Uma solução final de 30µl (20ug de proteína + água + *loading buffer*) de cada amostra foi mantida por 5min a 95^0C e transferida para cada poço do gel de poliacrilamida 4-12% (NuPage Bis-tris mini gels, Novex, California, EUA). O gel foi submetido a uma corrente de 120V.

Foi realizada a transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose utilizando o kit iBlot nitrocelulose (iBlot nitrocelulose regular stacks, Novex, Life Technology, Rockford, IL, EUA) pelo sistema de transferência iBlot a seco (iBlot Dry Blotting, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, EUA), por 7 min.

Após a transferência, as membranas foram lavadas 2 vezes por 5min com 10ml tampão salina Tris com 0,1% Tween 20 (TBS-T) e posteriormente bloqueadas com 10ml de 5% de leite diluídos em TBS-T por 1h. Em seguida, as membranas foram lavadas 2 vezes por 5min com 10ml de TBS-T e incubadas por 1h em 5% de leite diluídos em 5ml de TBS-T (Leite-TBS-T). O primeiro ensaio foi para verificar a presença de β-actina, com isso, o anticorpo anti- β-actina foi incubado por 1h em temperatura ambiente, lavados 3x em TBS-T por 5 min cada lavagem e adicionados o anticorpo secundário, diluídos em Leite-TBS-T, por 1h. As membranas foram então lavadas por 2 vezes com 10ml de TBS-T e colocadas em solução reveladora (Pierce ECL Western Blotting Substrate, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, EUA) por 1min e imediatamente reveladas.

Novos testes foram realizados na mesma membrana, para tal, estas foram lavadas 3x em 10ml de TBS-T por 5min e cada anticorpo alvo foi diluído em Leite-TBS-T, de acordo com as instruções do fabricante (Tabela 4.3), por 16 h a 4^0C. Após a incubação, o mesmo procedimento até a revelação, executado na membrana tratada com anti- β-actina, sendo, 3 lavagens com 10ml de TBS-T por 5 min, seguidas de incubação com o anticorpo secundário diluídos em 10ml de Leite-TBS-T de acordo com o fabricante (Tabela 4.3) por 1h em temperatura ambiente, lavagens com 10ml de TBS-T e submetidas à solução reveladora por 1min e imediatamente reveladas.

Tabela 4.4- Concentrações dos anticorpos

Anticorpo	Fabricante	Diluição	Peso molecular
Anti-TLR2 (ab108998)	Abcam	1:2000	90kDa
Anti-TLR4 (ab13556)	Abcam	1:1000	95kDa
β-actin	Abcam	1:10000	42kDa
Anti-p16ink4a (ab108349)	Abcam	1:5000	17kDa
Anti-rabbit	Abcam	1:3000	
Anti-mouse	Abcam	1:3000	

Como foram reutilizadas as mesmas membranas de nitrocelulose para todos os anticorpos, estas passaram por tratamento para remoção dos anticorpos primários e

secundários utilizando tampão de remoção (Restore Western Blot Stripping Buffer, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, EUA). As membranas também foram coradas com Ponceau S (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, EUA) para confirmação da presença das proteínas (Figura 4.1).

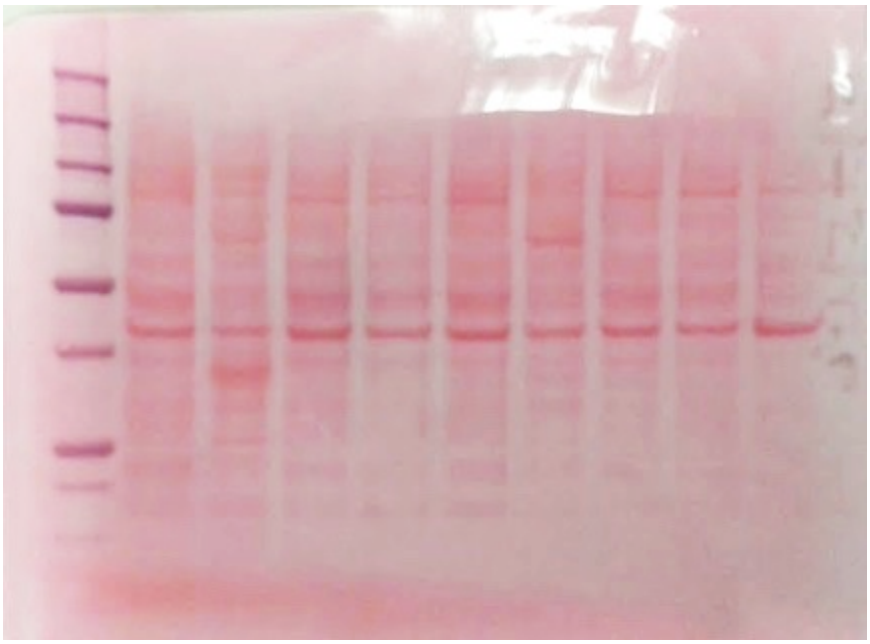


Figura 4.1- Figura ilustrativa de uma das membranas coradas com *Ponceau S*

4.7 Análise da presença dos receptores TLR1, 2, 4, 6 e 9 por citometria de fluxo

As células foram lavadas 2 vezes com PBS e o meio de cultura DMEM foi adicionado. Foram separados 2 microtubos de cada linhagem. Um dos microtubos foi utilizados para controle, onde as células não receberam a adição dos anticorpos, e o outro microtubo com as células que foram marcadas com os anticorpos. Cada tubo continha uma média de $5x10^5$ de células removidas com solução de solução de dissociação celular (*Cell dissocitation solution*- Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As células foram transferidas para tubos de *eppendorf* e centrifugadas a 5000rpm por 2min. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 500ul de tampão de FACS (PBS acrescidos de 0,1% azida de sódio e 1% de BSA). Após duas lavagens com tampão de FACS, foram adicionados 45ul de tampão de

FACS e 2.5ul de anticorpo (Tabela 4.4) e incubados por 20min a 4^0C. Em seguida, as células foram lavadas com tampão de FACS e fixadas com 2% de paraformaldeído.

Para a marcação com TLR9, proteína intracelular, as células foram permeabilizadas com 0,1% de Saponina, por 15min, em temperatura ambiente. Após a permeabilização, foram adicionados 45ul de tampão de FACS e 2.5ul de anticorpo anti-TLR9 ou isotipo. As células foram lavadas duas vezes com tampão de FACS e fixadas com 2% de paraformaldeído.

Anti-TLR6, por não ser um anticorpo conjugado com fluoróforo, foi acrescido do anticorpo secundário conjugado com FITC por 20min a 4^0C. Foram feitas duas lavagens com tampão de FACS e as células fixadas com 2% de paraformaldeído.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e as análises foram realizadas pelos citômetros da BD Biosciences, FACSCalibur ou LSRII Flow Cytometer System.

Os resultados foram analisados pelo programa *Flowing Software*, versão 2.5. Os resultados foram baseados na intensidade mediana de fluorescência (MFI) da amostra alvo dividido pela MFI da amostra não coradas (sem adição de anticorpo). As células quando coradas com anticorpos anti-TLR9, foram comparadas com a MFI do isotipo, isto por TLR9 ser uma proteína intracelular.

Tabela 4.5- Anticorpos utilizados para a análise da presença dos receptores Toll-like 1,2,4,6 e 9

Anticorpo	eBioscience Cat. No.
Anti-Human CD281 (TLR1) PE	12-9911-41
Anti-Human CD282 (TLR2) PE-eFluor® 610	61-9922-41
Anti-Human CD284 (TLR4) Alexa Fluor® 700	56-9917-41
Anti-Human CD286 (TLR6) Biotin	14-9069-80
Streptavidin FITC	11-4317-87
Anti-Human CD289 (TLR9) APC	17-9099-80
Rat IgG2a K Isotype Control APC	17-4321-41
Anti-Human CD284 (TLR4) Alexa Fluor® 700	53-9917-41

4.8 Ensaio imunoenzimático (ELISA) para as citocinas IL6 e IL8

Para verificar se existe ativação da via de sinalização via TLR4, as células foram estimuladas com LPS e LPS UP, e os níveis de IL6 e IL8 foram avaliados. Para a verificação da ativação de TLR2, as células foram estimuladas com PGN.

Cada linhagem (SCC2, SCC90, SCC72, SCC89) foi cultivada em um dos poços de uma placa de 24 poços.

Foram realizados 3 experimentos, sendo:

1. Estímulo das células com 0,1µl/ml, 1µl/ml, 10µl/ml de peptidoglicano e sem estímulo, por 24h;

2. Estímulo das células com 0,01µl/ml , 0,1µl/ml , 1µl/ml de LPS e sem estímulo, por 24 h;

3. Estímulo das células com 0,01µl/ml , 0,1µl/ml , 1µl/ml de LPS ultra puro e sem estímulo, por 24h

Após 24h o sobrenadante foi coletado, centrifugado a 5000rpm por 5 min e o sobrenadante coletado e congelado a -20^0C.

As concentrações das citocinas IL-6 e IL-8 secretadas pelas células estimuladas e não estimuladas, foram mensuradas através do ensaio imunoenzimático, utilizando-se o kit comercial BD OptEIA Set Human IL-6 e IL-8 (BD Biosciences, Torreyana ROad, San Diego, CA, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

Foi feita uma diluição de 1/20 para todas as amostras de acordo com testes realizados anteriormente.

Placas de 96 poços foram utilizadas e a análise foi realizada através das leituras das reações colorimétricas em 450 e 570nm em leitor de microplacas. A concentração das citocinas foi determinada a partir dos valores obtidos com a curva padrão das diluições da proteína recombinante.

4.9 Análise estatística

Foram realizadas análises estatísticas para os experimentos realizados pela metodologia qPCR, citometria de fluxo e ELISA.

4.9.1 Análise dos resultados da expressão gênica dos experimentos realizados pela metodologia qPCR

Para a análise de comparação, foram observadas as diferenças de expressões dos TLRs entre linhagens diferentes e as diferenças de expressão de IL6 e IL8 entre mesma linhagem, sem estímulo e com estímulo. Todos os resultados foram analisados por meio do programa estatístico GraphPad Prism versão 6. Foram utilizados os testes one-way ANOVA post hoc Tukey, para comparações entre mais de dois grupos, e Teste t-Student, para comparações entre dois grupos independentes. Foram consideradas diferenças significantes quando $p<0.05$.

4.9.2 Estatística dos resultados dos experimentos realizados pela metodologia Citometria de fluxo

Os resultados foram analisados por meio do programa estatístico GraphPad Prism versão 6. Foi utilizado o teste Kruskal-Wallis post hoc Dunn-Bonferroni com múltiplas comparações. $p<0.05$

4.9.3 Estatística dos resultados dos experimentos realizados pela metodologia ELISA

Os resultados foram analisados por meio do programa estatístico GraphPad Prism versão 6. Foi utilizado o teste de Mann- Whitney para comparações entre controle e cada estímulo (PGN, LPS, LPS UP). $p<0.05$

5 RESULTADOS

Os resultados deste trabalho foram divididos de acordo com as subdivisões do material e métodos.

5.1 Avaliação imuno-histoquímica da expressão de p16 e TLR4 em carcinomas espinocelulares de orofaringe

Dos 37 casos selecionados, 9 casos demonstraram marcação para a proteína p16 em núcleo e citoplasma, sendo 8 (88,88%) com mais de 75% das células marcadas e 1 caso (11,12%) com marcação entre 51-75% (Tabela 5.1). Os outros 28 casos não demonstraram marcação nuclear e citoplasmática de p16 ou demonstram confluência menor que 25%, sendo assim, foram incluídas no grupo CECOF-p16-.

Tabela 5.1- Resultados da marcação dos tumores do Grupo CECOF-p16+

Caso	Escore de p16	Confluência de p16	Intensidade de p16
1	4+	>25%	Intensa
2	4+	>25%	Intensa
3	4+	>25%	Intensa
4	3+	>25%	Intensa
5	4+	>25%	Intensa
6	4+	>25%	Intensa
7	4+	>25%	Intensa
8	4+	>25%	Intensa
9	4+	>25%	Intensa

Foram observados que 23 (88,14%) dos casos do grupo CECOF-p16- expressavam TLR4 em >75% das células tumorais (Figura 5.1) e, somente, 5 (11,86%) não expressavam (Figura 5.2). Não houve escore 1, 2 ou 3 (Tabela 5.2).

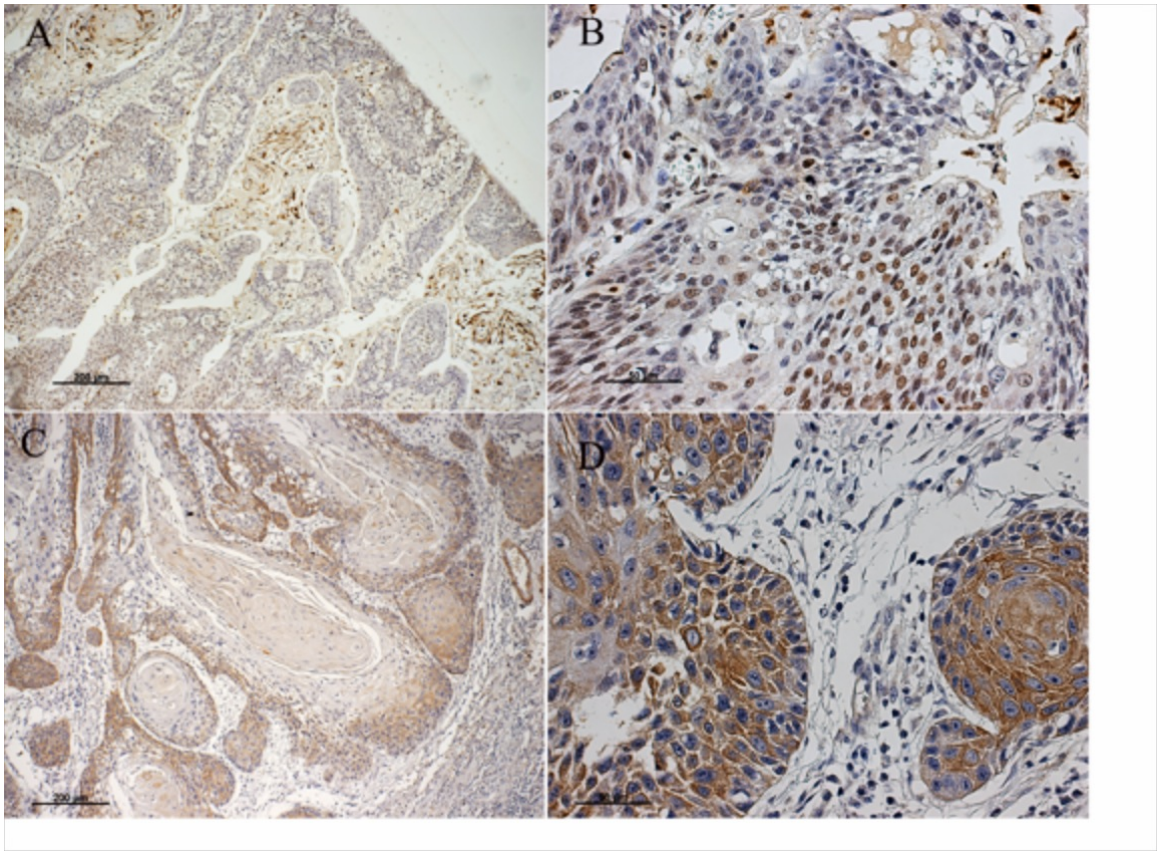


Figura 5.1- Figuras representativas da expressão imuno-histoquímica de p16 e TLR4 no Grupo CECOF-p16-positivo para TLR4. A. Imuno-histoquímica para p16 (250x). B. Ausência de marcação citoplasmática para p16 e expressão nuclear positiva, nas células tumorais. C. Imuno-histoquímica para TLR4 (250x). D. Expressão positiva citoplasmática para TLR4 (400x)

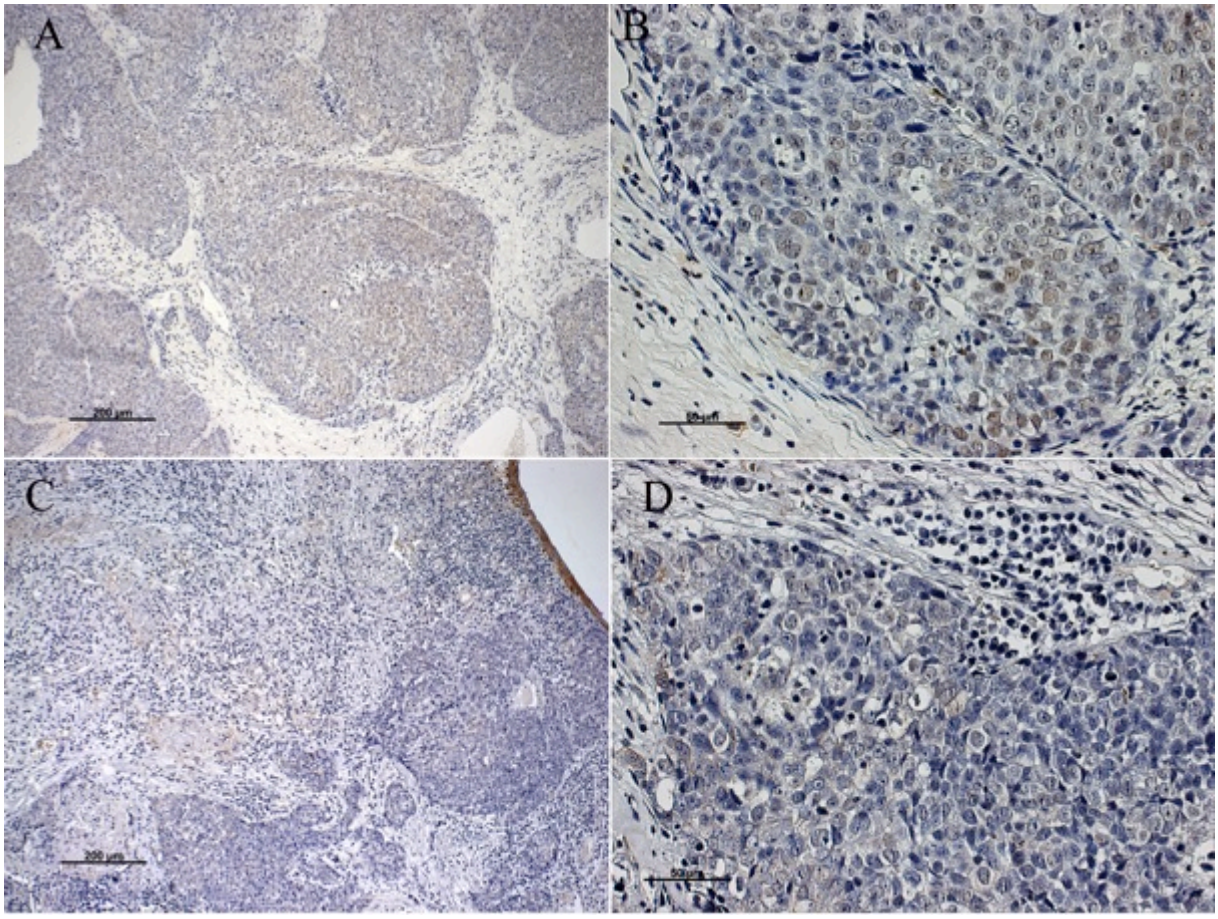


Figura 5.2- Figuras representativas da expressão imuno-histoquímica de p16 e TLR4 no Grupo CECOF-p16-negativo para TLR4. A. Imuno-histoquímica para p16 (250x). B. Ausência de marcação citoplasmática para p16 e expressão nuclear positiva nas células tumorais. C. Imuno-histoquímica para TLR4 demonstrando positividade no epitélio não acometido pelo tumor e células tumorais negativas para TLR4 (250x). D. Ausência da expressão citoplasmática e nuclear para TLR4 (400x)

No grupo CECOF-p16+, foi observado que 3 (33,33%) dos tumores expressaram TLR4 em >75% das células tumorais (Figura 5.3), 1 (11,11%) tumor mostrou marcação 3+ e 1 (11,11%) tumor 2+, e 4 (44.45%) dos casos não expressam TLR4 nas células tumorais (Figura 5.4). Não houve escore 1 (Tabela 5.2).

Tabela 5.2- Expressão de TLR4 nos grupos CECOF-p16+ e CECOF-p16-

	CECOF- p16+					**CECOF- p16-**				
Imunopositividade (escore)	0	1+	2+	3+	4+	0	1+	2+	3+	4+
TLR4	4	0	1	1	3	5	0	0	0	23

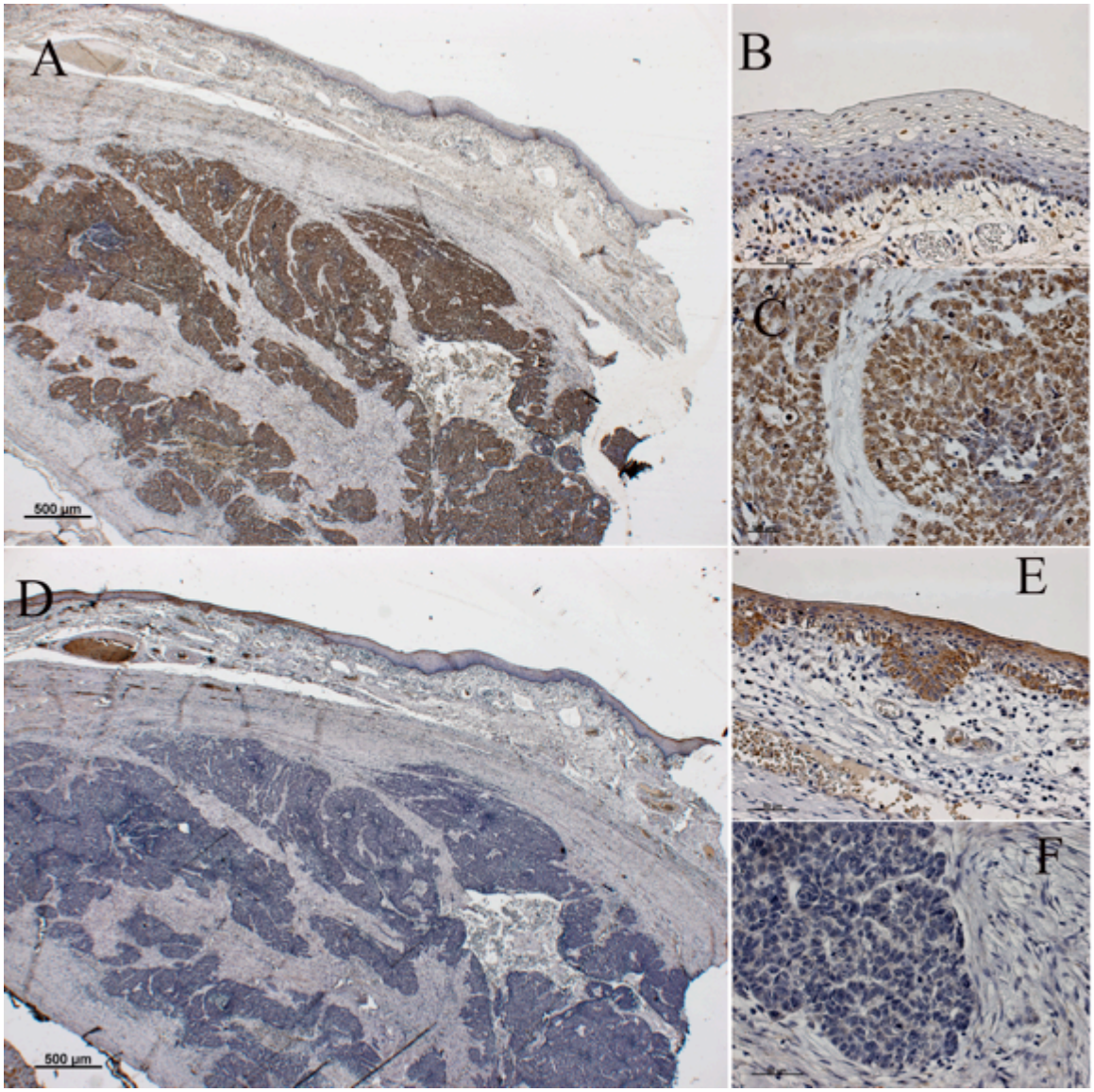


Figura 5.3- Figuras representativas da expressão imuno-histoquímica de p16 e TLR4 no Grupo CECOF-p16+ negativo para TLR4. A. Imuno-histoquímica para p16 (250x). B. Epitélio estratificado pavimentoso não acometido pelo tumor: Nota-se marcação nuclear da proteína p16. C. Células tumorais apresentando intensa marcação citoplasmática e nuclear, bem como confluência maior que 25%. D. Imuno-histoquímica para TLR4 (250x). E Epitélio estratificado pavimentoso não acometido pelo tumor: Nota-se expressão da proteína TLR4. F. Células tumorais não demonstrando expressão da proteína TLR4 (400x)

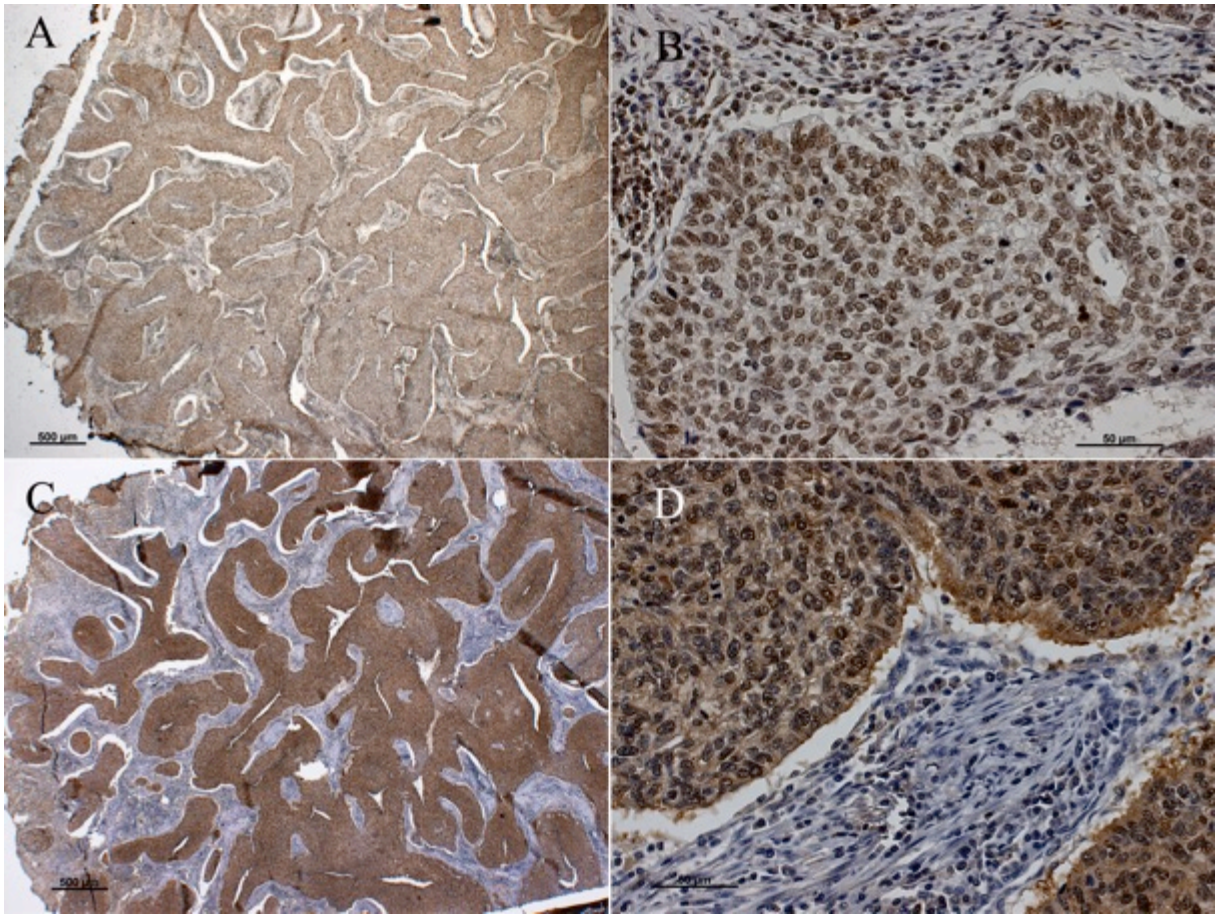


Figura 5.4- Figuras representativas da expressão imuno-histoquímica de p16 e TLR4 no Grupo CECOF-p16+ positivo para TLR4 . A. Imuno-histoquímica para p16 (250x). B. Células tumorais apresentando intensa marcação citoplasmática e nuclear, bem como confluência maior que 25% (400x). C. Imuno-histoquímica para TLR4: nota-se expressão da proteína TLR4 nas células tumorais (250x). D Células tumorais demonstrando expressão da proteína TLR4 (400x)

5.2 Avaliação da expressão de p16 nas linhagens SCC72, SCC89, SCC2, SCC90 e THP1 por Western blot.

A p16 foi fortemente expressa nas linhagens HPV+ (SCC2 e SCC90), fracamente expressa na linhagem SCC72 (HPV-) e negativa na linhagem SCC89 (HPV-) e THP1 (HPV-) (Figura 5.5)

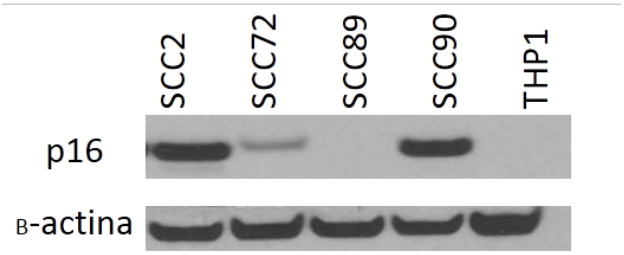


Figura 5.5- Expressão proteica de p16 na linhagens SCC2, SCC72, SCC89, SCC90 e THP1 por Western blot

5.3 Avaliação quantitativa da expressão gênica e proteica do receptor *Toll-like*-1 (TLR1) nas linhagens SCC72, SCC89, SCC2, SCC90 e HELA

Sem estímulo das células (expressão constitutiva), a quantificação gênica relativa demonstrou maiores níveis de expressão de TLR1 nas linhagens SCC72 e SCC89 (células não infectadas com HPV) quando comparadas com a expressão gênica de SCC2, SCC90 e HELA (células positivas para HPV). Também demonstrou diferença significativa entre SCC72 e SCC89 (Figura 5.6A).

Entretanto, a expressão proteica, analisada por citometria de fluxo, não demonstrou diferenças significativas (Figura 5.6B e 5.6C). $p<0.05$

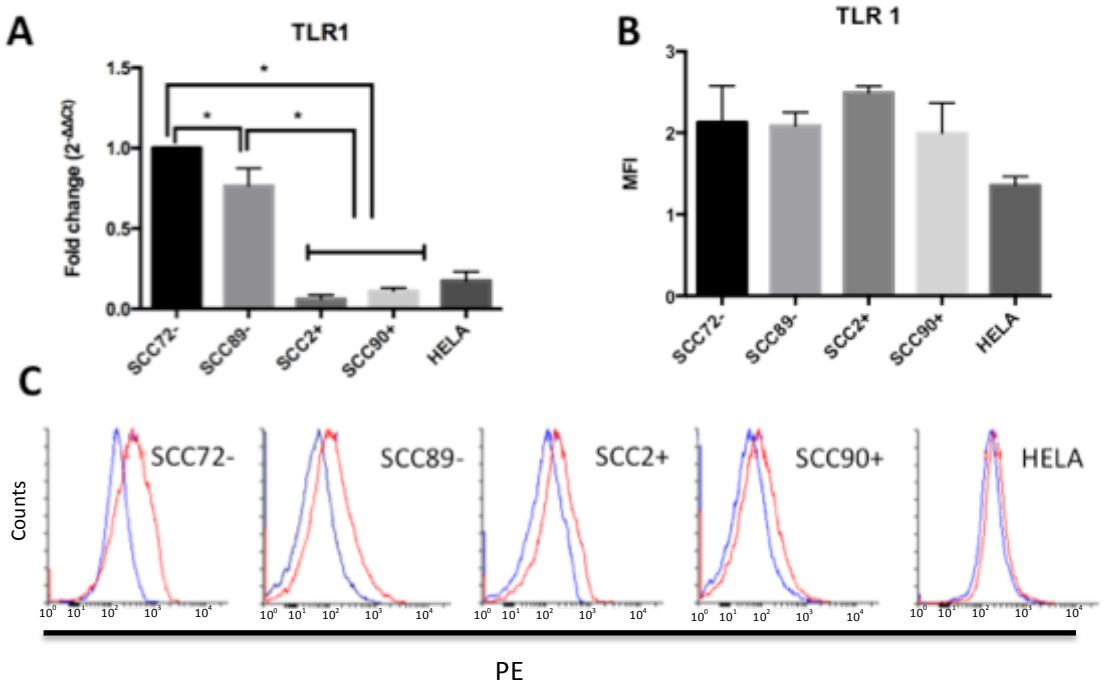


Figura 5.6- Expressão de TLR1 em linhagens HPV- (SCC72 e SCC89), HPV16+ (SCC2 e SCC90) e HPV18+ (Hela): A. Expressão gênica de TLR1, por qPCR, demonstrando diferenças significativas entre as linhagens HPVs- e HPVs+; B. Gráfico da intensidade mediana de fluorescência de TLR1, analisadas por citometria de fluxo: não houve diferenças significativas entre as linhagens. C. Histograma representativo da expressão de TLR1 por citometria de fluxo: células não coradas - controle (Azul) e TLR1 (Vermelho). (Média±SEM, $p<0.05$)

5.4 Avaliação quantitativa da expressão gênica do receptor *Toll-like* -3 (TLR3) nas linhagens SCC72, SCC89, SCC2, SCC90 e HELA

Sem estímulo, foram observadas diferenças significativas na expressão gênica relativa entre SCC89 (HPV-) e as demais linhagens estudadas (SCC72, SCC2 e SCC90). Não foram observadas diferenças quando comparado os grupos HPV- e HPV+ (Figura 5.7).

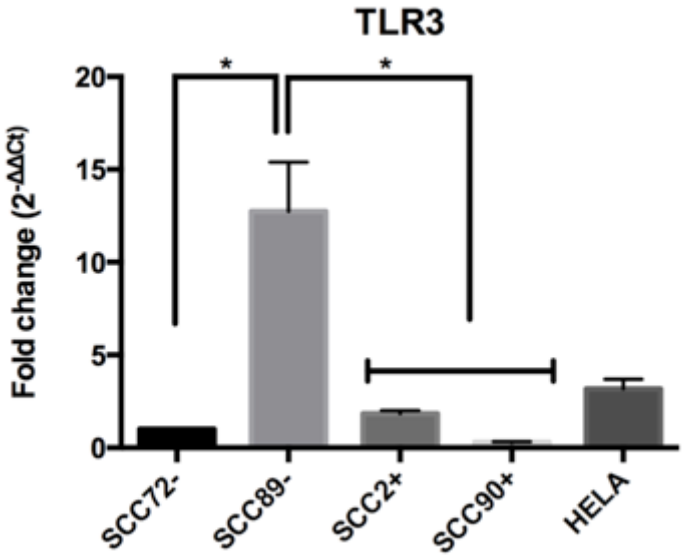


Figura 5.7- Expressão gênica de TLR3: Não houve diferenças significativas entre os grupos HPV+ e HPV-. Análise por qPCR (Média±SEM, $p<0.05$)

5.5 Avaliação quantitativa da expressão gênica do receptor *Toll-like* -5 (TLR5) nas linhagens SCC72, SCC89, SCC2, SCC90 e HELA

Sem estímulo, foram observadas maior expressão gênica de TLR5 em SCC72, quando comparadas com as demais linhagens estudadas (SCC89, SCC2, SCC90), assim como entre SCC90 e SCC89 e entre SCC90 e SCC2 ($p<0,05$).

Contudo, não foram observadas diferenças significativas na expressão gênica, analisada por qPCR, entre o grupo HPV- (SCC72 e SCC89) e o grupo HPV+ (SCC2 e SCC90) (Figura 5.8).

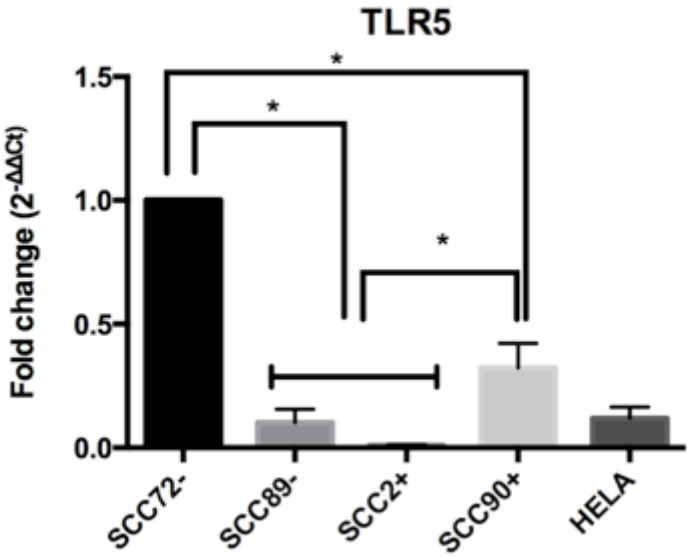


Figura 5.8- Expressão gênica de TLR5: Não houve diferenças significativas entre os grupos HPV+ e HPV-. Análise por qPCR (Média±SEM)

5.6 Avaliação quantitativa da expressão gênica e proteica do receptor *Toll-like* -6 (TLR6) nas linhagens SCC72, SCC89, SCC2, SCC90 e HELA

Sem estímulo, a análise da expressão gênica relativa de TLR6 demonstrou diferenças significativas entre as o grupo HPV- (SCC72 e SCC89) e o grupo HPV+ (SCC2, SCC90 e Hela) (Figura 5.9A. Mas, a expressão proteica presente na superfície das células, , não demonstrou diferenças significativas (Figura 5.9B e 5.9C). $p<0.05$

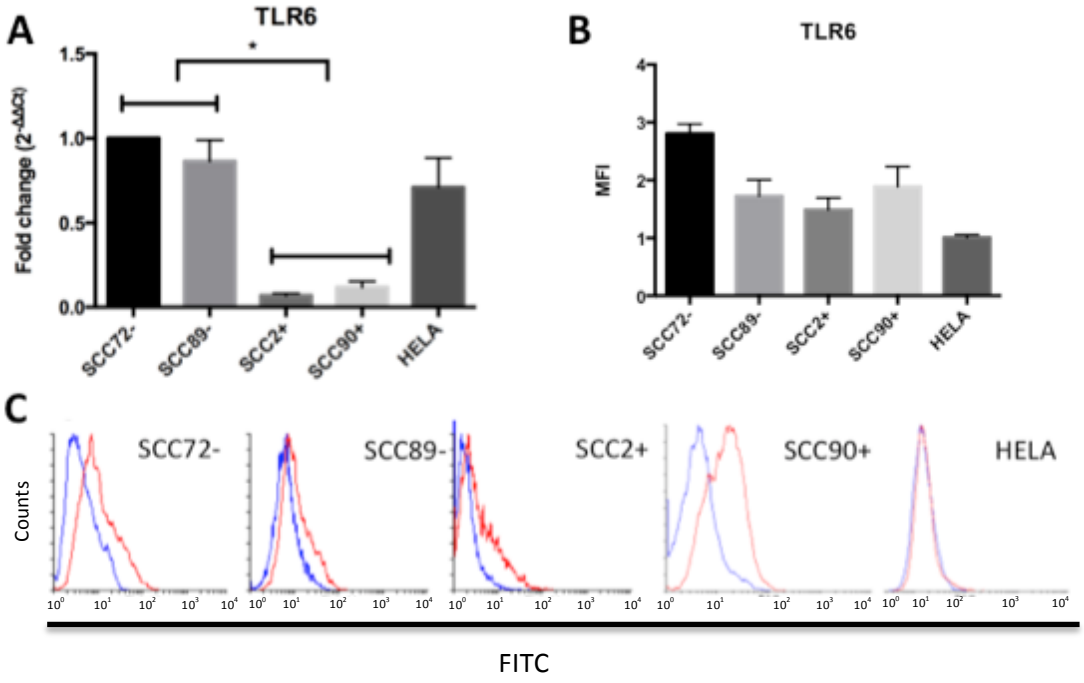


Figura 5.9- Expressão de TLR6 nas linhagens HPV- (SCC72 e SCC89), HPV16+ (SCC2 e SCC90) e HPV18+ (Hela): A. Expressão gênica de TLR6, por qPCR, demonstrou diferenças significativas entre os grupos HPVs- e HPVs+, $p<0.05$; B. Gráfico da intensidade mediana de fluorescência (MFI) de TLR6, analisadas por citometria de fluxo: não houve diferenças significativas entre as linhagens. C. Histograma representativo da expressão de TLR6 por citometria de fluxo: células não coradas - controle (Azul) e TLR6 (Vermelho). (Média±SEM)

5.7 Avaliação quantitativa da expressão gênica do receptor *Toll-like* -7 (TLR7) nas linhagens SCC72, SCC89, SCC2, SCC90

A única linhagem celular que apresentou expressão gênica foi a linhagem SCC89. As demais linhagens apresentaram média dos Cts acima de 35.

5.8 Avaliação quantitativa da expressão gênica do receptor *Toll-like*-8 (TLR8) nas linhagens SCC72, SCC89, SCC2, SCC90 e HELA

Não foi possível estabelecer a expressão gênica de TLR8 devido a pouca expressão de TLR8 nas amostras utilizadas. Foram testados 2 sequencias diferentes de sense e antissense. Esta baixa eficiência pode estar relacionada à ausência ou pequena expressão deste receptores nas células testadas.

Todos os Cts foram > 35.

5.9 Avaliação quantitativa da expressão gênica e proteica do receptor *Toll-like*-9 (TLR9) nas linhagens SCC72, SCC89, SCC2, SCC90 e HELA

Sem estímulo das células, a análise da expressão gênica de TLR9 demonstrou diferenças significativas entre SCC72 (HPV-) e SCC2 (HPV+) (Figura 5.11A), entretanto não houve diferenças entre os grupos HPV- e HPV+ (Figura 5.11B e 5.11C). Foram observadas diferenças significativas entre o grupo HPV- e HPV+. SCC2 e SCC90 demostram maior expressão de TLR9.

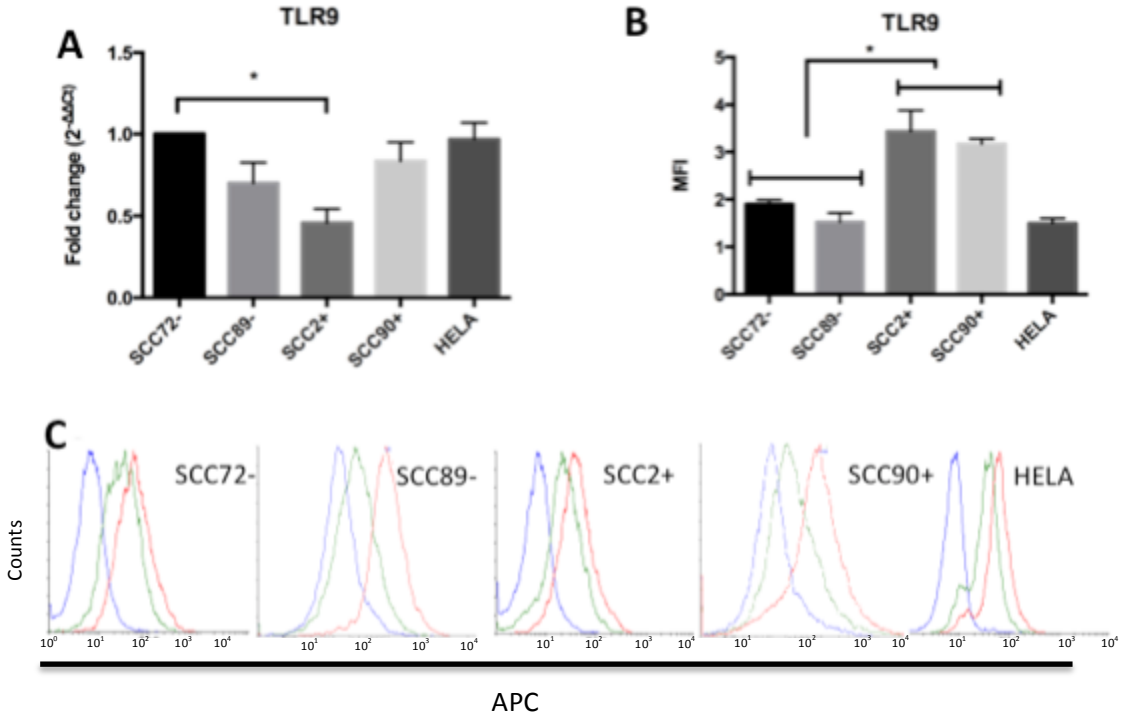


Figura 5.11- Expressão de TLR9 nas linhagens HPV- (SCC72 e SCC89), HPV16+ (SCC2 e SCC90) e HPV18+ (Hela): A. Expressão gênica relativa de TLR9, por qPCR, não demonstrou diferenças significativas entre os grupos HPVs- e HPVs+ ; B. Gráfico da intensidade mediana de fluorescência (MFI) de TLR9, analisadas por citometria de fluxo: nota-se maior expressão de TLR9 no grupo HPV+. C. Histogramas representativos da expressão de TLR9 por citometria de fluxo: células não coradas - controle (Azul), Isotipo (Verde) e TLR9 (Vermelho). (Média±SEM) $p<0.05$

5.10 Avaliação quantitativa da expressão gênica do receptor *Toll-like*-10 (TLR10) nas linhagens SCC2, SCC90, SCC72, SCC89 e HELA

As linhagens estudadas não apresentaram níveis de expressão de TLR10 detectáveis por qRT-PCR.

5.11 Avaliação da expressão gênica e da expressão proteica do receptor *Toll-like* -2 (TLR2), IL6 e IL8 nas linhagens SCC2, SCC90, SCC72, SCC89 após estimulo com LPS, LPS-ultra puro e PGN

5.11.1 Expressão gênica e proteica de TLR2 nas linhagens SCC72, SCC89, SCC2, SCC90 e HELA sem estímulo

Os resultados da análise da expressão gênica relativa apresentou diferenças significativas entre SCC72 e as demais linhagens estudadas (SCC89, SCC2 e SCC90) e entre SCC90 com SCC89 e SCC2. Não houve diferenças significativas entre os grupos HPV- e HPV+ (Figura 5.12A). Assim como não houve diferenças significativas, entre linhagens, na expressão dos receptores presentes na superfície da células, analisadas por citometria de fluxo (Figuras 5.12B e 5.12C).

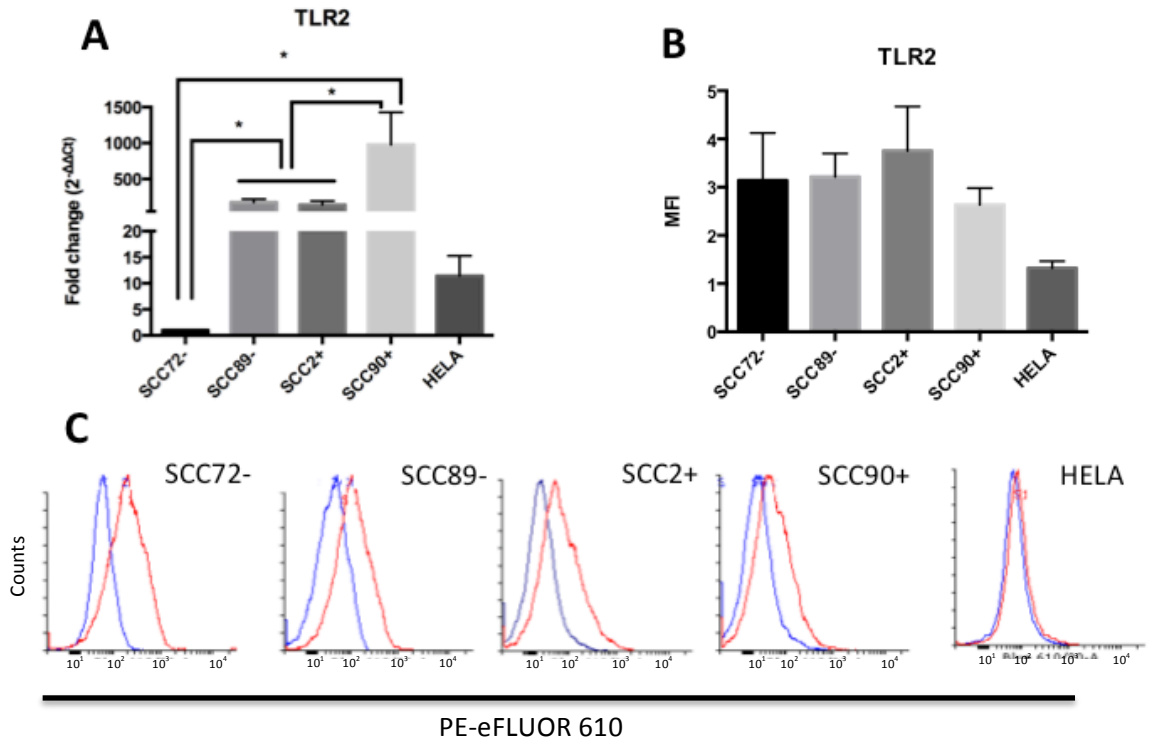


Figura 5.12- Expressão de TLR2 nas linhagens HPV- (SCC72 e SCC89), HPV16+ (SCC2 e SCC90) e HPV18+ (Hela): A. Expressão gênica relativa de TLR2, analisada por qPCR, não demonstrou diferenças significativas entre os grupos HPV- e HPV+; B. Gráfico da intensidade mediana de fluorescência (MFI) de TLR2, analisadas por citometria de fluxo: não demonstrou diferenças significativas entre as linhagens; C. Histogramas representativos da expressão de TLR2 por citometria de fluxo: células não coradas- controle (Azul) e TLR2 (Vermelho)

5.11.2 Análise qualitativa da expressão proteica de TLR2 nas linhagens SCC72, SCC89, SCC2, SCC90 e HELA estimuladas com peptidoglicano (PGN), lipopolissacarideo (LPS) e lipopolissacarideo ultra-puro (LPS UP), analisadas por Western Blot

Não há evidências de banda proteica de TLR2 nas células não estimuladas, assim como não existe presença da proteína após o estimulo com LPS e LPS-UP. Entretanto, após estimulo com PGN, nota-se expressão significativa de TLR2 em todas as linhagens analisadas. Isto demonstra resposta de TLR2, somente após o estimulo com PGN (Figura 5.13). THP1 foi utilizado como controle positivo da expressão de TLR2.

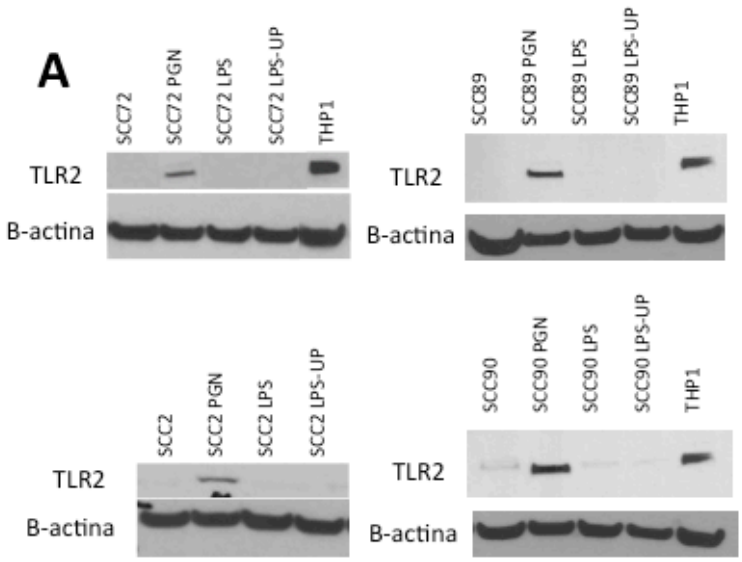


Figura 5.13- Comparação da expressão de TLR2 após diferentes estímulos (PGN, LPS e LPS UP) em uma mesma linhagem: Só há evidências da proteína após o estimulo com PGN

5.11.3 Análise quantitativa da expressão gênica e qualitativa da expressão proteica de TLR2 nas linhagens SCC72, SCC89, SCC2, SCC90 e HELA estimuladas com peptidoglicano (PGN)

Após o estimulo com PGN, não houve diferenças significativas na expressão gênica de TLR2 entre os grupos HPV- e HPV+ (Figura 5.14A).

Observa-se expressão proteica de TLR2 em todas as linhagens após o estimulo com PGN (Figura 5.14B).

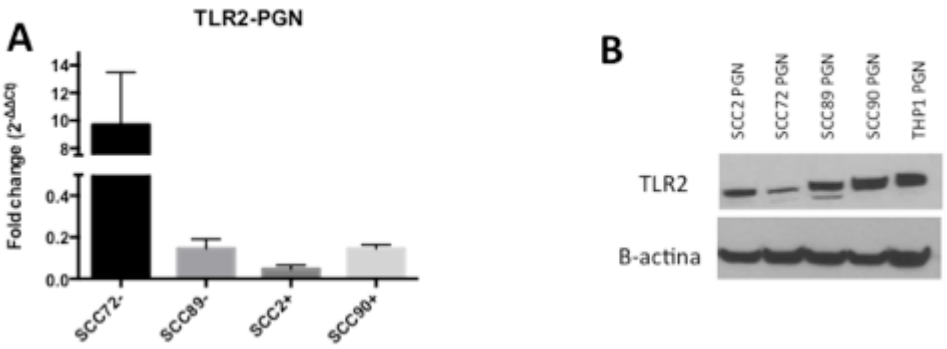


Figura 5.14- Expressão de TLR2 após estímulo com Peptidoglicano (PGN): A. Não houve diferenças significativas na expressão gênica entre grupo HPV- e HPV+(Média±SEM); B. Todas as linhagens expressaram TLR2 após o estimulo, $p<0.05$.

5.11.4 Resposta pró inflamatória de IL6 e IL8 após o estimulo com peptidoglicano (PGN)

SCC72 e SCC89 (HPV -), e SCC2 (HPV+) demostraram ter reposta epitelial pró-inflamatória após estímulo com PGN (agonista de TLR2), via TLR2.

Em SCC89 (HPV-), após o estimulo com 1μg/ml de PGN, nota-se aumento da expressão gênica de IL6 (Figura 5.15A). Assim como, significativo aumento da expressão proteica de IL6 após estimulo com 0,1μg/ml e 1μg/ml de PGN, quando comparados com a célula sem estimulo (controle) (Figura 5.15B). Do mesmo modo, observa-se aumento significativo de IL8 após estimulo com 1μg/ml e 10μg/ml de PGN (Figura 15D). Mas não foram observados aumentos significativos da expressão gênica de IL8 (Figura 15C).

Em SCC72, outra linhagem HPV-, demonstrou aumento significativo da expressão gênica de IL8 após estimulo com 1μg/ml de PGN (Figura 5.15C) e aumento da expressão proteica de IL8 após estimulo com 10μg/ml de PGN. Não foram observados aumentos significativos da expressão de IL6.

SCC2 (HPV+) apresentou aumento da expressão gênica de IL6 mas não proteica (Figura 5.15A e 5.15B). Entretanto esta linhagem apresentou aumento da expressão gênica de IL8 após estimulo com 1μg/ml de PGN (Figura 5.15C) e proteica (Figura 5.15D) após estimulo com 1μg/ml e 10μg/ml de PGN.

SCC 90 (HPV+) não demonstrou expressão gênica ou proteica de IL6 e IL8 (Figuras 5.15A, 5.15B, 5.15C e 5.15D)

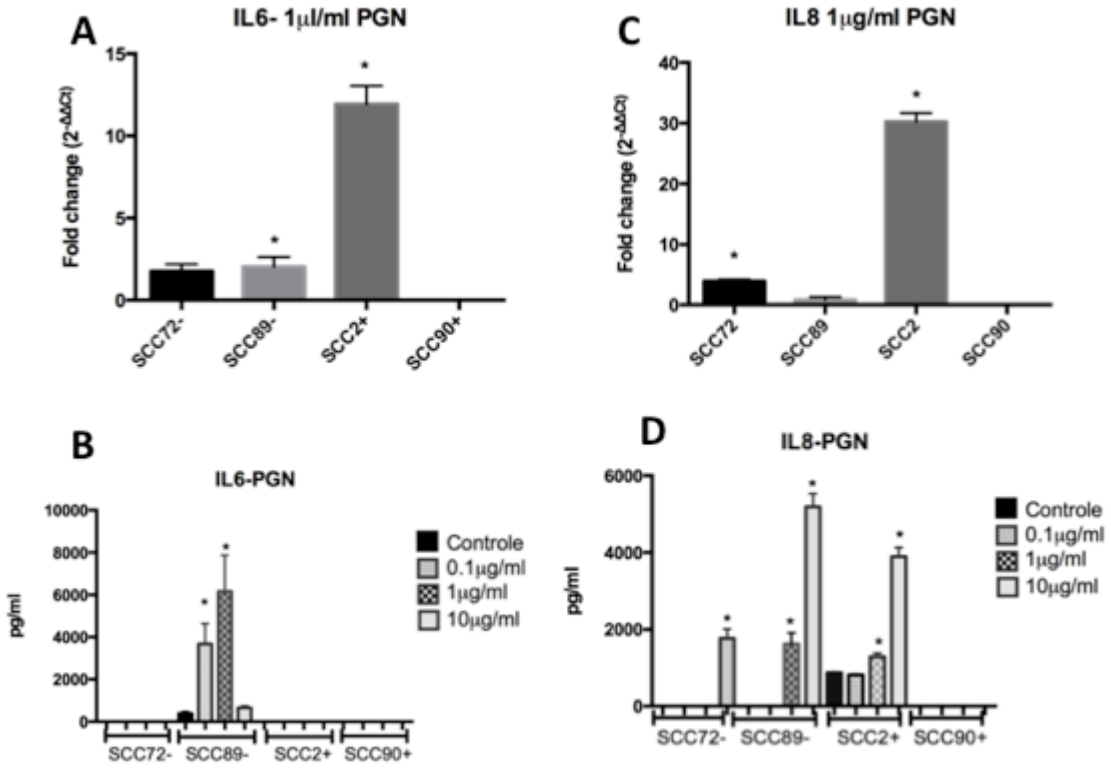


Figura 5.15- Expressão de IL6 e IL8 após estímulo com peptidoglicano (PGN): A. Expressão gênica de IL6, analisada por qPCR, demonstrou aumento significativo de IL6 nas linhagens SCC89 e SCC2, após estimulo com 1µg/ml; B. Expressão proteica de IL6, analisada por ELISA: SCC89 demonstrou aumento de IL6 após estimulo com 0,1µg/ml e 1µg/ml de PGN; C. Expressão gênica de IL8, analisada por qPCR, demonstrou aumento significativo de IL8 nas linhagens SCC89 e SCC2, após estimulo com 1µg/ml de PGN; D. Expressão proteica de IL8, analisada por ELISA: aumento significativo de SCC72, após estimulo com 10µg/ml, e SCC89 e SCC2 após estimulo com 1µg/ml e 10µg/ml de PGN. ($p<0.05$; Média±DP)

5.12 Avaliação da expressão gênica e proteica do receptor *Toll-like*-4 (TLR4), IL6 e IL8 nas linhagens SCC2, SCC90, SCC72, SCC89 após estimulo com LPS ultra puro e LPS

5.12.1 Expressão gênica e proteica de TLR4 nas linhagens SCC72, SCC89, SCC2, SCC90 e HELA sem estímulo.

A análise da expressão gênica relativa de TLR4 demonstrou diferenças significativas entre SCC90 e as demais linhagens estudadas (SCC72, SCC2 e SCC90). Todavia, não houve diferenças entre os grupos HPV- e HPV+ (Figura 5.16A), assim como não houve diferenças significativas, entre linhagens, na expressão dos receptores *Toll-like* 4 presentes na superfície das células, analisadas por citometria de fluxo (Figuras 5.16B e 5.16C).

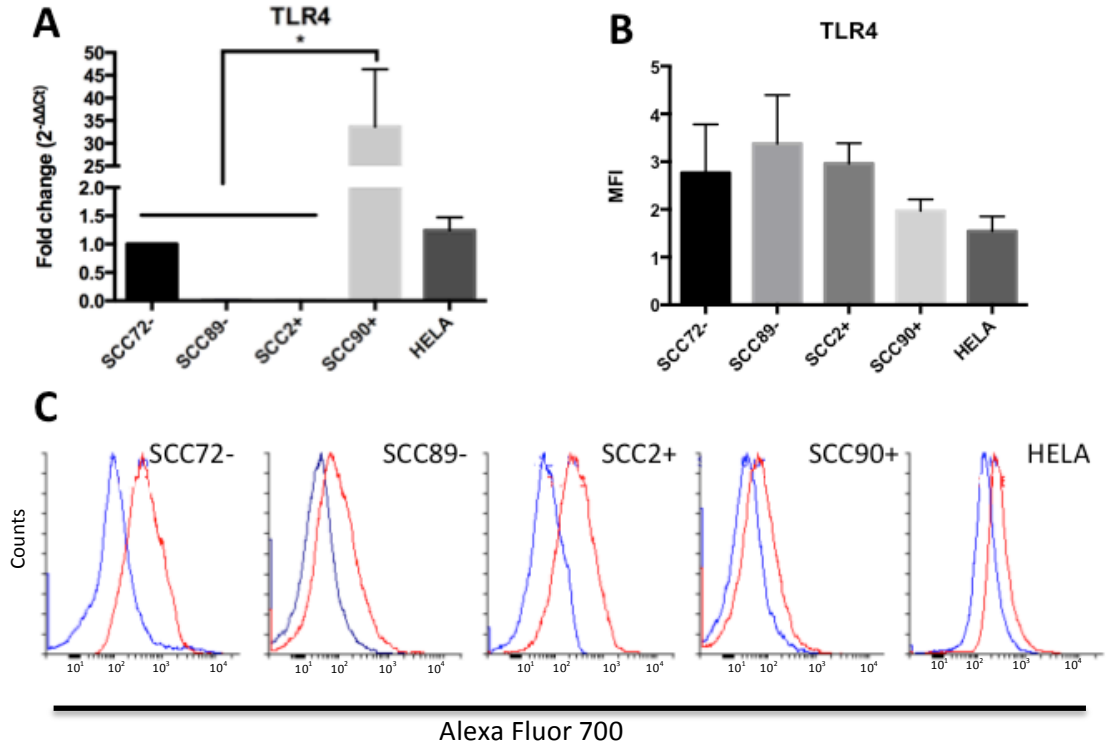


Figura 5.16- Expressão de TLR4 nas linhagens HPV- (SCC72 e SCC89), HPV16+ (SCC2 e SCC90) e HPV18+ (Hela): A. Expressão gênica relativa de TLR4, analisada por qPCR, não demonstrou diferenças significativas entre os grupos HPV- e HPV+; B. Gráfico da intensidade mediana de fluorescência (MFI) de TLR4, analisadas por citometria de fluxo: não demonstrou diferenças significativas entre as linhagens; C. Histogramas representativos da expressão de TLR4 por citometria de fluxo: células não coradas- controle (Azul) e TLR4 (Vermelho). ($p<0.05$; Média±SEM)

5.12.2 Análise qualitativa da expressão proteica de TLR4 nas linhagens SCC72, SCC89, SCC2, SCC90 e HELA estimuladas com peptidoglicano (PGN), lipopolissacarideo (LPS) e lipopolissacarideo ultra-puro (LPS UP), analisadas por Western Blot

SCC72 foi a única linhagem que apresentou expressão de TLR4, assim como apresentou uma banda mais intensa quando estimulado com LPS. SCC72 também foi utilizada como controle para as demais reações (Figura 5.17).

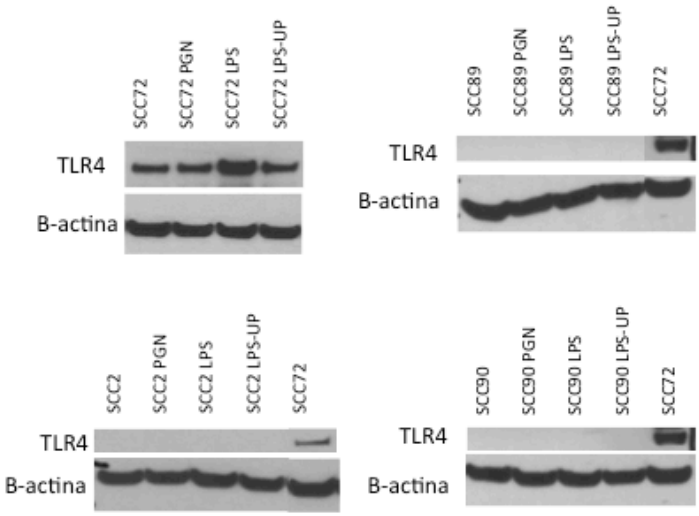


Figura 5.17- Comparação da expressão de TLR4 sob diferentes estímulos (PGN, LPS e LPS UP) em uma mesma linhagem: Só há evidências da proteína na linhagem HPV- SCC72, com aumento da proteína TLR4 após estimulo com LPS

5.12.3 Expressão gênica e proteica de TLR4 nas linhagens SCC72, SCC89, SCC2, SCC90 e HELA estimuladas com lipopolissacarideo de *E. Coli* (LPS)

Após o estimulo com LPS, SCC72 demonstrou aumento significativo em relação à SCC2. Contudo, não houve diferenças significativas na expressão gênica de TLR4 entre os grupos HPV- e HPV+ (Figura 5.18A).

Observa-se expressão proteica de TLR4 somente na linhagem SCC72 (Figura 18B)

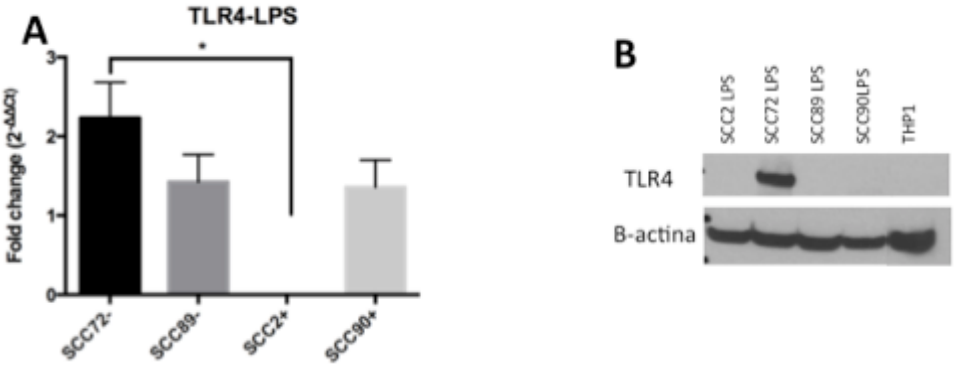


Figura 5.18- Expressão de TLR4 após estímulo com Lipopolissacarideo ultra puro (LPS): A. Não houve diferenças significativas na expressão gênica entre grupo HPV- e HPV+; B. Somente a linhagem SCC72 expressou TLR4 após o estimulo ($p<0.05$; Média±SEM)

5.12.3.1 Ausência de resposta pró-inflamatória de IL6 e IL8 após o estimulo com lipopolissacarideo de E. Coli (LPS)

As linhagens HPV+ (SCC2 e SCC90) não demostraram resposta quando estimuladas com LPS (proteína agonista de TLR4). Por outro lado, as linhagens não infectadas com HPV (SCC72 e SCC89) demostraram ter reposta epitelial.

SCC2 e SCC90, linhagens HPV+, não apresentaram aumento da expressão de IL6 (Figuras 5.19A e 5.19B). Assim como não houve diferenças significativas na expressão de IL8 após o estimulo com LPS (Figura 5.19B e 5.19D

Em SCC89 (HPV-), após o estimulo com 1μg/ml de LPS UP, nota-se aumento da expressão gênica de IL6 (Figura 5.19A). Resultado este, compatível com a expressão proteica, o qual apresentou aumento significativo após estimulo com 0,1μg/ml e 1μg/ml de LPS (Figura 5.19B). Nota-se aumento da expressão gênica de IL8 (Figura 5.19C), mas não proteica (Figura 5.19D).

Em SCC72, outra linhagem HPV-, nota-se aumento significativo da expressão gênica de IL8 após estimulo com 1μg/ml de LPS UP (Figura 5.19C) e aumento da expressão proteica de IL8 após estimulo com 0,01μg/ml, 0,1μg/ml e 1μg/ml de LPS UP (Figura 5.19D). Também foram observados aumentos significativos da expressão gênica de IL6, mas não proteica (Figura 5.19A e 5.19B)

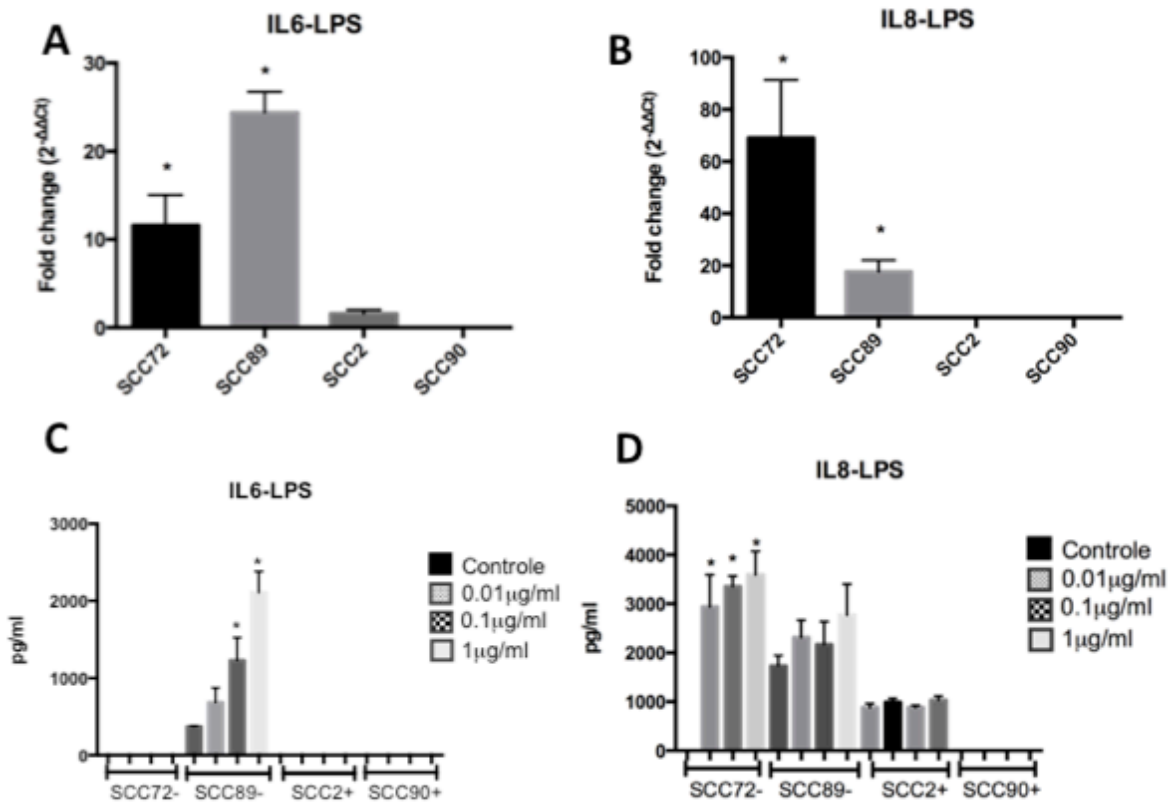


Figura 5.19- Expressão de IL6 e IL8 após estímulo com lipopolissacarideo (LPS): A. Somente nas linhagens HPV- foram observadas aumento da expressão gênica de IL6, analisada por qPCR, após estímulo com 1μg/ml de LPS; B. SCC89 demonstrou aumento da expressão proteica de IL6 após estimulo com 1μg/ml, análise por ELISA; C. Aumento da expressão gênica de IL8, em SCC72, após estímulo com 1μg/ml; D. Aumento da expressão proteica de IL8, avaliada por ELISA, na linhagem SCC72 após estímulos com LPSUP. ($p<0.05$; Média±DP)

5.12.4 Avaliação quantitativa da expressão gênica e qualitativa da expressão proteica de TLR4 nas linhagens SCC72, SCC89, SCC2, SCC90 e HELA estimuladas com lipopolissacarideo de E. Coli ultra puro (LPS UP)

Após o estimulo com LPS UP, nota-se maior expressão gênica de TLR4 em SCC89 comparado com as demais linhagens estudadas. Contudo, não houve diferenças significativas na expressão gênica de TLR4 entre os grupos HPV- e HPV+ (Figura 5.20A).

Observa-se expressão proteica de TLR4 somente na linhagem SCC72 (Figura 5.20B).

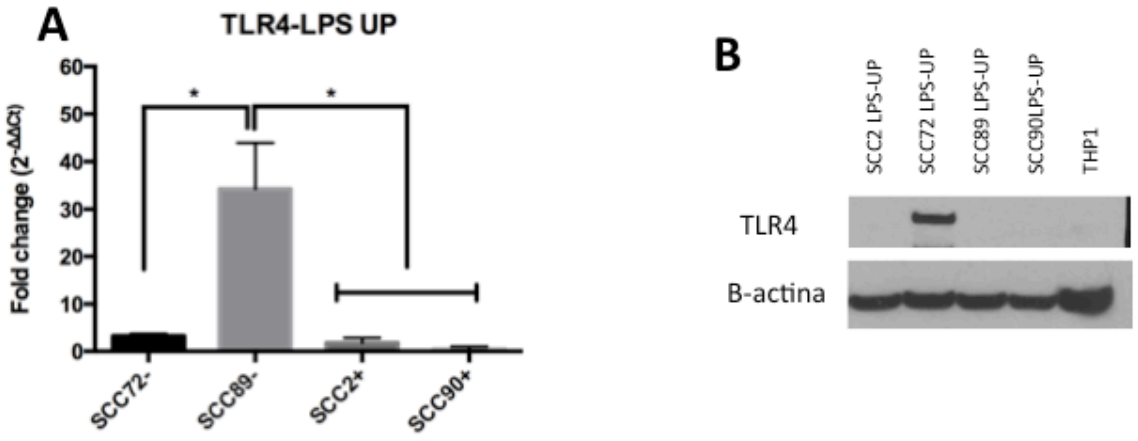


Figura 5.20- Expressão de TLR4 após estímulo com Lipopolissacarideo ultra puro (LPS UP): A. Não houve diferenças significativas na expressão gênica entre grupo HPV- e HPV+; B. Somente a linhagem SCC72 expressou TLR4 após o estimulo

5.12.4.1 Ausência de resposta pró inflamatória de IL6 e IL8 nas linhagens positivas para HPV, após o estimulo com lipopolissacarideo de *E. Coli* ultra puro (LPS UP)

Assim como ocorreu com o estimulo com LPS, As linhagens HPV+ (SCC2 e SCC90) não demostraram resposta epitelial quando estimuladas com LPS UP (proteína agonista especifica de TLR4). Por outro lado, as linhagens não infectadas com HPV (SCC72 e SCC89) demostraram ter reposta epitelial, via TLR4.

SCC2 e SCC90, linhagens HPV+, não apresentaram aumento da expressão de IL6 (Figuras 5.21A e 5.21B). Assim como não houve diferenças significativas na expressão de IL8 após o estimulo com LPSUP (Figura 5.21B e 5.21D)

Em SCC89 (HPV-), após o estimulo com 1μg/ml de LPS UP, nota-se aumento da expressão gênica de IL6 (Figura 5.21A). Assim como, significativo aumento da expressão proteica após estimulo com 1μg/ml de LPS UP, quando comparados com a célula sem estimulo (controle) (Figura 21B). Não foram observados aumentos significativos da expressão gênica e proteica de IL8 (Figura 5.21C e 5.21D).

Em SCC72, outra linhagem HPV-, nota-se aumento significativo da expressão gênica de IL8 após estimulo com 1μg/ml de LPS UP (Figura 5.21C) e aumento da expressão proteica de IL8 após estimulo com 0,01μg/ml, 0,1μg/ml e 1μg/ml de LPS UP (Figura 5.21D). Também foram observados aumentos significativos da expressão gênica de IL6, mas não proteica (Figura 5.21A e 5.21B).

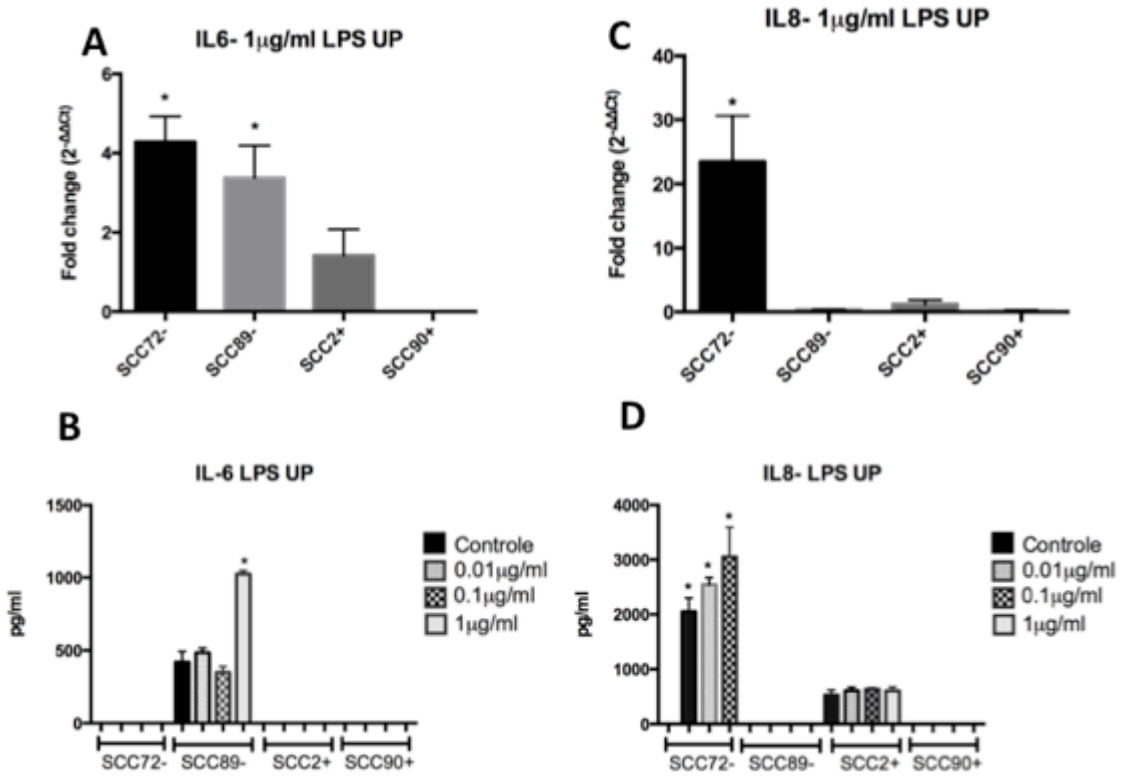


Figura 5.21- Expressão de IL6 e IL8 após estímulo com lipopolissacarideo ultra puro (LPS UP): A. Expressão gênica de IL6, analisada por qPCR, demonstrou aumento significativo nas linhagens HPV- (SCC72 E SCC89) e ausência de resposta nas linhagens HPV+ (SCC2 e SCC90), após estimulo com 1μg/ml; B. Aumento da expressão proteica de IL6, analisada por ELISA, após estimulo com1μg/ml, em SCC89; C. Aumento da expressão gênica de IL8, em SCC72, após estímulo com 1μg/ml ; D. Aumento da expressão proteica de IL8, avaliada por ELISA, na linhagem SCC72 após estímulos com LPSUP. ($p<0.05$; Média±DP)

6 DISCUSSÃO

A detecção de um microorganismo patogênico é um evento mediado pela resposta imune inata, a qual utiliza inúmeros mecanismos para seu reconhecimento. Quase invariavelmente, a detecção envolve o reconhecimento de PAMPs por uma gama de PRRs, os quais incluem os receptores *Toll-like*. Diversos estudos demonstraram que células epiteliais expressam TLRs, assim como co-receptores e moléculas adaptadoras, como CD14 e MyD88 (50). Entretanto, embora nem todas as células epiteliais tenham sido testadas para as diferentes TLRs, sabe-se que nem todas expressam todos os TLRs, como por exemplo, a linhagem gengival HGEC, uma linhagem HPV16+ (72, 73).

A importância da resposta epitelial deve-se ao fato de que todas as infecções passam pela barreira epitelial, sendo assim, esta possui um papel central na detecção dos microrganismos. Muitas superfícies de tecidos são densamente colonizadas pela microbiota, a qual permanece comensal devido ao reconhecimento destes pelo sistema imune. O reconhecimento do que é comensal e do que é patológico é um grande desafio ao tecido epitelial (72).

Além deste papel fundamental na defesa contra infecções, cada vez mais estudos demonstram o importante papel dos TLRs em manter a homeostasia tecidual, pois estes regulam as respostas inflamatórias e reparadoras do tecido frente a uma lesão (74).

Mais de 150 anos atrás, Virchow apontou uma conexão entre inflamação e câncer ao observar leucócitos em neoplasias. Hoje já é consenso o importante papel da resposta inflamatória na carcinogênese e como fator de risco (75). Visto que esta inclui efeitos anti-apoptóticos, indução oxidativa do DNA e a indução da resposta tecidual reparadora. Concomitante, a resposta imune adaptativa é importante na prevenção do desenvolvimento e inibição da progressão do tumor (39). Essa dualidade ainda é alvo de muitos estudos.

Esta ligação entre inflamação e câncer levou vários grupos a estudarem os receptores que ativam a via de sinalização para recrutamento de células inflamatórias. Dentre eles estão os TLRs. Os TLRs reconhecem principalmente, lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias Gram-negativas, os quais estimulam TLR4; peptidoglicano (PGN), ácido lipoteicoico, zimogênio, os quais ativam TLR1, TLR2 e TLR6; flagelo bacteriano, o qual ativa TLR5; CpG DNA não

metilado bacterianos e virais que ativam TLR9; dupla fita de RNA, a qual ativa TLR3; RNA de fita simples, o qual ativa TLR7 e TLR8 (74).

Alterações nas expressões dos TLRs ou em sua via de sinalização poderiam levar a uma progressão ou regressão do tumor. Por isso, muitos estudos estão sendo focados na aplicação dos TLRs na terapia do câncer. Entretanto, são necessários estudos individuais de cada tecido e de cada câncer para identificar como esses receptores atuam na prevenção ou progressão do tumor.

Sabe-se que pacientes apresentando CECOF HPV+, apresentam melhor prognóstico do que aqueles que possuem CEC HPV-, mas até o momento poucos são os estudos de CECOF HPV+ relacionados à resposta imune. Além disso, estudos em colo de útero têm demonstrado alterações na resposta imune inata ligada ao TLR. Ainda existem muitas contradições e mais estudos são necessários. Em cabeça e pescoço, existe apenas um estudo (68) avaliando alguns dos receptores *Toll-likes*. Este é o primeiro estudo em orofaringe avaliando todos os 10 TLRs e a função dos principais receptores.

No presente estudo, após a análise da expressão gênica de TLR1-10, por qPCR, observou-se que somente TLR1 e TLR6 apresentavam diferenças significativas, com maior expressão no grupo HPV-, quando comparados com o grupo HPV+. Entretanto, não foram observadas diferenças significativas na expressão proteica destes dois receptores entre os grupos HPV- e HPV+. Em colo de útero, De Carlo et al. (76), demonstraram diminuição da expressão gênica de TLR1 (76), em tumores HPV+. Em cabeça e pescoço, o único trabalho publicado demonstrou que também não houve diferença na expressão de TLR1 e TLR6, *in vivo*. TLR1 e TLR6 são heterodímeros com TLR2, e reconhecem lipoproteínas e peptidoglicanos. Em câncer em modelo animal, a lipoproteína bacteriana sintética, um agonista de TLR1/TLR2, induz a regressão do tumor através do aumento da função de linfócitos T citotóxicos (77), dando ao TLR1 uma característica de colaborador na regressão tumoral. Agonistas de TLR6/2 também demonstraram colaborar no tratamento de câncer de pâncreas. Animais que tiveram injeções intratumorais de agonista de TLR6/TR2, associados com gencitabina tiveram maior sobrevida. Outro estudo, demonstrou que agonista de TLR6/TLR2 associado com IFNγ aumenta a produção de CXCL10, o qual pode aumentar e melhorar o sistema imune (78).

O fato de não termos encontrado alteração nas expressões proteicas de TLR1, TLR2 e TRL6, levou-nos a verificar a existência de funcionalidade após o estímulo com antagonista

de TLR2 em ambos os grupos HPV- e HPV+. PGN de *Staphylococcus aureus* é um ativador de TLR2 (79), como também demonstrado neste trabalho, onde verificamos a expressão de TLR2 somente após o estímulo com PGN, não tendo sido detectado o receptor após estímulo com LPS e LPS UP.

As linhagens SCC72 e SCC89 (ambas HPV-) expressaram IL8 e IL6, respectivamente, após o estímulo com PGN. Assim como SCC2, linhagem HPV+, que também apresentou secreção de IL8. Este fato demonstrou TLR2 funcional em uma linhagem HPV+. TLR2 pode funcionar como um estimulador ou supressor do carcinoma, dependendo do tumor. Em câncer gástrico, TLR2 favorece a progressão tumoral via proliferação e indução da via de sinalização PI3/Akt, ERK1/2 e NF-kB (80, 81).

Outro receptor que tem papel pró-tumoral é TLR4 (81). Nossos resultados demonstraram que 55,55% dos casos positivos para p16 expressaram TLR4, sendo aproximadamente 34% os casos com >75% de marcações e 44,45% negativas para TLR4. Estes resultados demonstram que a expressão de TLR4 em CECOF parece ser diferente dos carcinoma de colo de útero positivos para p16. Uma vez que em carcinoma de colo de útero associado ao HPV, a expressão de TLR4 parece estar diminuída (10, 11). Em contrapartida, nossos resultados parecem corroborar com os resultados de Jouhi et al. (68), que também encontrou casos imunopositivos para TLR4 em CECOF associado ao HPV. TLR4 não demonstrou alterações na expressão gênica entre os grupos HPV- e HPV+, como verificado por Jouhi et al. (68), diferente dos resultados em carcinoma de colo de útero, onde notou-se diminuição da expressão de TLR4 (10, 38, 82, 83). Em nosso estudo todas as linhagens apresentaram TLR4, quando avaliadas por citometria de fluxo, mas somente na linhagem SCC72 TLR4 foi detectado por western blot. Frente a isso, procuramos verificar se havia aumento da expressão proteica após o estímulo com PGN, LPS e LPSUP Tendo sido observada apenas presença da proteína na linhagem SCC72, com aumento desta após estímulo com LPS. A ausência de detecção de TLR4 pode estar correlacionada às baixas concentrações desta proteína. Estudos mostram que TLR4 é expresso em níveis extremamente baixos em epitélio de cavidade bucal e outros tecidos (72, 73).

Todavia, após o estimulo com LPS (agonista de TLR4) e LPSUP (agonista específico de TLR4) notou-se ausência da resposta pró-inflamatória de IL6 e IL8 nas linhagens HPV+ (SCC2 e SCC90), avaliados por ELISA, embora tenha-se notado secreção de IL6 e IL8 nas

linhagens HPV-, SCC89 e SCC72, respectivamente. A ausência de resposta das linhagens HPV+, pode sugerir alterações na via de sinalização ou no receptor, causadas pelo HPV.

Altas expressões de IL6 e IL8 são detectadas em inúmeros carcinomas, sugerindo uma importante participação destas citocinas como fatores reguladores no microambiente tumoral (84). IL6 é correlacionada com o mecanismo de defesa, assim como controle do crescimento e diferenciação de várias lesões malignas. A superexpressão de IL6 está associada à progressão do tumor por inibir a apoptose das células neoplásicas, estimular a angiogênese (85, 86) e colaborar na resistência às drogas (87). A expressão de IL8 promove respostas angiogênicas em células epiteliais, aumento da proliferação e sobrevida das células endoteliais e tumorais, assim como aumenta o potencial de migração das células neoplásicas, endoteliais e aumento do infiltrado neutrofílico local (84). IL8 também está correlacionada a metástase em inúmeros modelos *in vivo* (88, 89). Além disso, drogas que induzem IL8 conferem maior resistência a quimioterápicos em células tumorais (90). Com isso, a inibição dos efeitos de IL8 pode colaborar para a melhor resposta do tumor às terapias (84). Sendo assim, a disfunção da via de sinalização de TLR4 e inibição da secreção de IL6 e IL8, poderia colaborar para o melhor prognóstico, como visto em pacientes com CECOF HPV+.

Outros trabalhos também demonstraram o potencial do HPV em diminuir a expressão de interleucinas e interferons. Pacientes apresentando carcinomas de colo de útero associado ao HPV, demonstram deficiência das células T auxiliares (Th) contra E2, E6 e E7, onde metade deste grupo estudado falhou na detecção de peptídeos derivados do HPV16+ e a outra metade não possuía Th funcional, com ausência da secreção de IFN e IL5 (45). Também foi demonstrada diminuição da transcrição de IFN em células epiteliais HPV16+ (49). A oncoproteina E7 interfere na expressão de IFN por ligar-se a IRF-1, um fator de transcrição de IFN, inibindo-o e impedindo sua transcrição (91). E6 também interfere na transcrição de IFN. Esta oncoproteína liga-se ao IRF-3 e inibe a função de ativação de transcrição (92). Isto confere ao HPV o potencial de alterar a resposta imune.

Uma hipótese relacionada à disfunção de TLR4, pode estar ligada às moléculas adaptadoras. A linhagem de colo de útero HPV18, HeLa, não expressa MD2, molécula necessária para a detecção de PAMPs e ativação da resposta de TLR4 (93). Moléculas como MD2 e CD14 são essenciais para a ligação de LPS e ativação da via de sinalização (72). Outra hipótese, está baseada no polimorfismo deste receptor. O polimorfismo de alguns TLRs

estão associados a diversas doenças e pode ser um fator de risco ligado ao carcinoma de colo de útero (94).

TLR3 não demonstrou diferenças entre o grupo HPV- e o grupo HPV+, resultado similar ao do grupo que estudou TLR3 em CECOF HPV+, *in vivo* (68). Contudo, diferente dos resultados em colo de útero, o qual parece ter aumento da expressão de TLR3 (9). TLR3 tem sido considerado, em alguns tumores, como supressor tumoral, isto devido à ativação mediada por IFN e subsequente ativação de NK e células dendríticas no reconhecimento e controle da morte da célula tumoral (81).

TLR5 também parece ter potentes efeitos anti-tumorais em modelo animal. Agonistas de TLR5, como o flagelo bacteriano, retardam o crescimento tumoral por aumentar a morte celular e diminuir a proliferação das células tumorais. Estes experimentos foram realizados em células dendríticas e não em queratinócitos. Nossos resultados não demonstraram alterações entre grupo HPV+ e HPV-. O único estudo com TLR5 em CECOF demonstrou diminuição de TLR5 em CECOF apresentando p16+, porém não demonstrou comparações entre TLR5 e CECOF HPV+. Estudos em língua, apontam TLR5 como um marcador para prever recorrências e sobrevida (95).

Em CECOF, TLR7 foi expresso somente em uma das linhagens HPV- (SCC89). Este receptor em células dendríticas parece ter potencial imunomodulador e anti-tumoral, mas pouco se conhece da contribuição deste receptor na carcinogênese (81). Agonista de TLR7 é utilizado para tratamento de verrugas genitais e tem sido proposto para tratamento de lesões associadas ao HPV (9).

TLR9 tem sido alvo de numerosos estudos, uma vez que este receptor reconhece HPV. Entretanto, há controvérsias entre os resultados. A análise da presença de TLR9, em nosso estudo, revelou maior expressão nas linhagens de CECOF HPV+. Em carcinoma de colo de útero, estudos demonstraram aumento da expressão de TLR9 em mulheres que apresentavam HPV persistente (67) e em mulheres que apresentavam eliminação do vírus (9). O aumento de TLR9 é devido ao reconhecimento do vírus pelo receptor e consequente ativação do sistema imune para a tentativa de eliminação do vírus.

Entretanto, o estudo realizado com CECOF HPV+ demonstrou diminuição de TLR9 (68), assim como outros estudos com carcinoma de colo de útero, demonstraram que TLR9 apresentava baixa expressão. Esta diminuição ocorre como forma de escape do HPV do

sistema imune e persistência na célula. A maneira pela qual o HPV parece conseguir diminuir a expressão deste receptor é através da expressão de E7. Esta oncoproteína promove a formação de um complexo nuclear consistindo de receptor estrógeno 1 (ERα) e NFKB1/RELA (p50/p65). Este complexo liga-se ao DNA de TLR9. p65 e ERα promovem modificações na histona e contribuem para a supressão da transcrição de TLR9; assim como, virions do HPV16 inibem a atividade transcricional de TLR9, o qual resulta na perda da produção de IFN (96).

Hela, utilizado como controle, demonstrou apresentar expressões de TLR compatíveis com artigos publicados anteriormente (97, 98).

Diferentes resultados da expressão e ativação de TLR9 devem-se ao tempo considerado de persistência e de eliminação de cada trabalho, nos quais alguns analisaram a persistência após 6 meses e outros após 1 ano, bem como depende do equilíbrio entre a força de inibição de TLR9 pelo HPV e a capacidade de cada indivíduo de ativar adequadamente o TLR9.

Em nossos estudos não foi possível verificar expressão de TLR10 nas linhagens estudadas. Não há outros estudos em CECOF HPV+ analisando este receptor.

Deste modo, foi possível, no presente estudo verificar diferenças na expressão de TLR1 e TLR6 entre os grupos HPV- e HPV+, e diferenças na expressão proteica de TLR9. TLR2 apresentou aumento da expressão proteica em todas as linhagens e demonstrou desencadeamento da resposta imune, com secreção de IL6 e IL8 nas linhagens HPV- (SCC72 e SCC89) e em uma das linhagens HPV+ (SCC2). Interessantemente, todas as linhagens apresentaram TLR4, entretanto, as linhagens HPV+ não demonstraram resposta pró-inflamatória, tanto quando estimuladas com LPS quanto quando estimuladas com LPS UP, agonista específico de TLR4.

Este trabalho contribui para estabelecer o perfil da expressão dos receptores *Toll-likes* em linhagens celulares CECOF HPV- (SCC72 e SCC89) e HPV+ (SCC2 e SCC90), *in vitro,* e aponta para alterações ocorridas na via de sinalização mediada por TLR4. Além disso, nossos resultados abrem portas para futuros estudos na avaliação de alterações causadas no sistema imune inato pelo HPV, em carcinomas espinocelulares de orofaringe.

7 CONCLUSÃO

- ✓ As análises por imuno-histoquímica revelaram que nos carcinomas epidermoides em orofaringe 55,55% dos casos p16 positivos expressaram TLR4.
- ✓ Somente TLR1 e TLR6 apresentaram diferenças significativas, com maior expressão gênica nas linhagens HPV negativas (SCC72 e SCC89)
- ✓ TLR9 foi o único receptor que demonstrou ter maior expressão proteica nas linhagens HPV+, quando comparadas às linhagens HPV-
- ✓ TLR2 apresentou aumento da expressão após o estimulo com PGN, em todas as linhagens estudadas e demonstrou desencadeamento da resposta imune nas linhagens SCC72, SCC89 e SCC2, com secreção de IL6 e IL8.
- ✓ Todas as linhagens expressaram TLR4, sem diferenças significativas. Entretanto, as linhagens HPV+ (SCC2 e SCC90) não demonstraram desencadeamento da resposta imune, após estímulo com LPS e LPS UP.

REFERÊNCIAS[1]

1. Curado MP, Boyle P. Epidemiology of head and neck squamous cell carcinoma not related to tobacco or alcohol. Curr Opin Oncol. 2013;25(3):229-34.

2. O'Rorke MA, Ellison MV, Murray LJ, Moran M, James J, Anderson LA. Human papillomavirus related head and neck cancer survival: a systematic review and meta-analysis. Oral Oncol. 2012;48(12):1191-201.

3. Santarelli A, Lo Russo L, Bambini F, Campisi G, Lo Muzio L. New perspectives in medical approach to therapy of head and neck squamous cell carcinoma. Minerva Stomatol. 2009;58(9):445-52.

4. Weinberger PM, Yu Z, Haffty BG, Kowalski D, Harigopal M, Brandsma J, et al. Molecular classification identifies a subset of human papillomavirus--associated oropharyngeal cancers with favorable prognosis. J Clinical Oncol. 2006;24(5):736-47.

5. Psyrri A, Gouveris P, Vermorken JB. Human papillomavirus-related head and neck tumors: clinical and research implication. Curr Opinion Oncol. 2009;21(3):201-5.

6. Ha PK, Califano JA. The role of human papillomavirus in oral carcinogenesis. Crit Rev Oral Biol Med. 2004;15(4):188-96.

7. Fregonesi PA, Teresa DB, Duarte RA, Neto CB, de Oliveira MR, Soares CP. p16(INK4A) immunohistochemical overexpression in premalignant and malignant oral lesions infected with human papillomavirus. J Histochem Cytochem. 2003;51(10):1291-7.

8. Cardesa A, Nadal A. Carcinoma of the head and neck in the HPV era. Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat. 2011;20(3):161-73.

9. Daud, II, Scott ME, Ma Y, Shiboski S, Farhat S, Moscicki AB. Association between toll-like receptor expression and human papillomavirus type 16 persistence. Int J Cancer. 2011;128(4):879-86.

10. Yu L, Wang L, Li M, Zhong J, Wang Z, Chen S. Expression of toll-like receptor 4 is down-regulated during progression of cervical neoplasia. Cancer Immunol Immunother. 2010;59(7):1021-8.

---

[1] De acordo com estilo Vancouver

11. Zhou Q, Zhu K, Cheng H. Toll-like receptors in human papillomavirus infection. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2013;61(3):203-15.

12. Abbas AH, Pillai S. Imunidade Natural. Imunologia Celular e Molecular. 6. 6 ed. Rio de Janeiro: Saunder Elsevier; 2008. p. 19-46.

13. Mogensen TH. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. Clin Microbiol Rev. 2009;22(2):240-73, Table of Contents.

14. Huang B, Zhao J, Li H, He KL, Chen Y, Chen SH, et al. Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance. Cancer Res. 2005;65(12):5009-14.

15. Pradere JP, Dapito DH, Schwabe RF. The Yin and Yang of Toll-like receptors in cancer. Oncogene.2014 Jul;33(27):3485-95.

16. Marur S, D'Souza G, Westra WH, Forastiere AA. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. Lancet Oncol. 2010;11(8):781-9.

17. Pytynia KB, Dahlstrom KR, Sturgis EM. Epidemiology of HPV-associated oropharyngeal cancer. Oral Oncol. 2014;50(5):380-6.

18. Chaturvedi AK. Epidemiology and clinical aspects of HPV in head and neck cancers. Head Neck Pathol. 2012;6 Suppl 1:S16-24.

19. Moore PS, Chang Y. Why do viruses cause cancer? Highlights of the first century of human tumour virology. Nat Rev Cancer. 2010;10(12):878-89.

20. Boscolo-Rizzo P, Del Mistro A, Bussu F, Lupato V, Baboci L, Almadori G, et al. New insights into human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma. Acta Otorhinolaryngol Ital. 2013;33(2):77-87.

21. Munger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. J Virol. 2004;78(21):11451-60.

22. Mannarini L, Kratochvil V, Calabrese L, Gomes Silva L, Morbini P, Betka J, et al. Human Papilloma Virus (HPV) in head and neck region: review of literature. Acta Otorhinolaryngol Ital. 2009;29(3):119-26.

23. Pinheiro RS, de Franca TR, Rocha B, Ferreira DC, Ribeiro CM, Cavalcanti SM, et al. Human papillomavirus coinfection in the oral cavity of HIV-infected children. J Clin Pathol. 2011;64(12):1083-7.

24. Frazer IH. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. Nat Rev Immunol. 2004;4(1):46-54.

25. Hughes FJ, Romanos MA. E1 protein of human papillomavirus is a DNA helicase/ATPase. Nucleic Acids Res. 1993;21(25):5817-23.

26. King LE, Fisk JC, Dornan ES, Donaldson MM, Melendy T, Morgan IM. Human papillomavirus E1 and E2 mediated DNA replication is not arrested by DNA damage signalling. Virology. 2010;406(1):95-102.

27. Parish JL, Kowalczyk A, Chen HT, Roeder GE, Sessions R, Buckle M, et al. E2 proteins from high- and low-risk human papillomavirus types differ in their ability to bind p53 and induce apoptotic cell death. J Virol. 2006;80(9):4580-90.

28. Boulet G, Horvath C, Vanden Broeck D, Sahebali S, Bogers J. Human papillomavirus: E6 and E7 oncogenes. Int J Biochem Cell Biol. 2007;39(11):2006-11.

29. Nakahara T, Nishimura A, Tanaka M, Ueno T, Ishimoto A, Sakai H. Modulation of the cell division cycle by human papillomavirus type 18 E4. J Virol. 2002;76(21):10914-20.

30. Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. Nat RevCancer. 2010;10(8):550-60.

31. Muto V, Stellacci E, Lamberti AG, Perrotti E, Carrabba A, Matera G, et al. Human papillomavirus type 16 E5 protein induces expression of beta interferon through interferon regulatory factor 1 in human keratinocytes. J Virol. 2011;85(10):5070-80.

32. Akagi K, Li J, Broutian TR, Padilla-Nash H, Xiao W, Jiang B, et al. Genome-wide analysis of HPV integration in human cancers reveals recurrent, focal genomic instability. Genome Res. 2014;24(2):185-99.

33. Woodman CB, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. Nat Rev Cancer. 2007;7(1):11-22.

34. Wentzensen N, Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M. Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. Cancer Res. 2004;64(11):3878-84.

35. Lee J, Kim SS. The function of p27 KIP1 during tumor development. Exp Mol Med. 2009;41(11):765-71.

36. Lee LA, Huang CG, Liao CT, Lee LY, Hsueh C, Chen TC, et al. Human papillomavirus-16 infection in advanced oral cavity cancer patients is related to an increased risk of distant metastases and poor survival. PLoS One. 2012;7(7):e40767.

37. Jalil EM, Bastos FI, Melli PP, Duarte G, Simoes RT, Yamamoto AY, et al. HPV clearance in postpartum period of HIV-positive and negative women: a prospective follow-up study. BMC Infect Dis. 2013;13:564.

38. Zhou F, Chen J, Zhao KN. Human papillomavirus 16-encoded E7 protein inhibits IFN-gamma-mediated MHC class I antigen presentation and CTL-induced lysis by blocking IRF-1 expression in mouse keratinocytes. J Gen Virol. 2013;94(Pt 11):2504-14.

39. Andersen AS, Koldjaer Solling AS, Ovesen T, Rusan M. The interplay between HPV and host immunity in head and neck squamous cell carcinoma. Int J Cancer. 2014;134(12):2755-63.

40. Heusinkveld M, Goedemans R, Briet RJ, Gelderblom H, Nortier JW, Gorter A, et al. Systemic and local human papillomavirus 16-specific T-cell immunity in patients with head and neck cancer. Int J Cancer. 2012;131(2):E74-85.

41. King EV, Ottensmeier CH, Thomas GJ. The immune response in HPV oropharyngeal cancer. Oncoimmunology. 2014;3(1):e27254.

42. Ward MJ, Thirdborough SM, Mellows T, Riley C, Harris S, Suchak K, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes predict for outcome in HPV-positive oropharyngeal cancer. Br J Cancer. 2014;110(2):489-500.

43. Nordfors C, Grun N, Tertipis N, Ahrlund-Richter A, Haeggblom L, Sivars L, et al. CD8+ and CD4+ tumour infiltrating lymphocytes in relation to human papillomavirus status and clinical outcome in tonsillar and base of tongue squamous cell carcinoma. Eur J Cancer. 2013;49(11):2522-30.

44. Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. CD4(+)T cells: differentiation and functions. Clin Dev Immunol. 2012;2012:925135.

45. de Jong A, van Poelgeest MI, van der Hulst JM, Drijfhout JW, Fleuren GJ, Melief CJ, et al. Human papillomavirus type 16-positive cervical cancer is associated with impaired CD4+ T-cell immunity against early antigens E2 and E6. Cancer Res. 2004;64(15):5449-55.

46. Piersma SJ, Jordanova ES, van Poelgeest MI, Kwappenberg KM, van der Hulst JM, Drijfhout JW, et al. High number of intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes is associated with the absence of lymph node metastases in patients with large early-stage cervical cancer. Cancer Res. 2007;67(1):354-61.

47. Langers I, Renoux V, Reschner A, Touze A, Coursaget P, Boniver J, et al. Natural killer and dendritic cells collaborate in the immune response induced by the vaccine against uterine cervical cancer. Eur J Immunol. 2014;44(12):3585-95.

48. Leong CM, Doorbar J, Nindl I, Yoon HS, Hibma MH. Loss of epidermal Langerhans cells occurs in human papillomavirus alpha, gamma, and mu but not beta genus infections. J Invest Dermatol. 2010;130(2):472-80.

49. Stanley MA. Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus. Clin Microbiol Rev. 2012;25(2):215-22.

50. Naglik JR, Moyes D. Epithelial cell innate response to Candida albicans. Adv Dent Res. 2011;23(1):50-5.

51. Tosi MF. Innate immune responses to infection. J Allergy Clin Immunol. 2005;116(2):241-9; quiz 50.

52. Amador-Molina A, Hernandez-Valencia JF, Lamoyi E, Contreras-Paredes A, Lizano M. Role of innate immunity against human papillomavirus (HPV) infections and effect of adjuvants in promoting specific immune response. Viruses. 2013;5(11):2624-42.

53. Stanley M. HPV - immune response to infection and vaccination. Infect Agent Cancer. 2010;5:19.

54. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. Nat Immunol. 2010;11(5):373-84.

55. Galluzzi L, Vacchelli E, Eggermont A, Fridman WH, Galon J, Sautes-Fridman C, et al. Trial Watch: Experimental Toll-like receptor agonists for cancer therapy. Oncoimmunology. 2012;1(5):699-716.

56. Brown J, Wang H, Hajishengallis GN, Martin M. TLR-signaling networks: an integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk. J Dent Res. 2011;90(4):417-27.

57. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? Lancet. 2001;357(9255):539-45.

58. Trinchieri G. Cancer and inflammation: an old intuition with rapidly evolving new concepts. Annu Rev Immunol. 2012;30:677-706.

59. Huang B, Zhao J, Unkeless JC, Feng ZH, Xiong H. TLR signaling by tumor and immune cells: a double-edged sword. Oncogene. 2008;27(2):218-24.

60. Fukata M, Shang L, Santaolalla R, Sotolongo J, Pastorini C, Espana C, et al. Constitutive activation of epithelial TLR4 augments inflammatory responses to mucosal injury and drives colitis-associated tumorigenesis. Inflamm Bowel Dis. 2011;17(7):1464-73.

61. Naseemuddin M, Iqbal A, Nasti TH, Ghandhi JL, Kapadia AD, Yusuf N. Cell mediated immune responses through TLR4 prevents DMBA-induced mammary carcinogenesis in mice. Int J Cancer. 2012;130(4):765-74.

62. Chin AI, Miyahira AK, Covarrubias A, Teague J, Guo B, Dempsey PW, et al. Toll-like receptor 3-mediated suppression of TRAMP prostate cancer shows the critical role of type I interferons in tumor immune surveillance. Cancer Res. 2010;70(7):2595-603.

63. Cai Z, Sanchez A, Shi Z, Zhang T, Liu M, Zhang D. Activation of Toll-like receptor 5 on breast cancer cells by flagellin suppresses cell proliferation and tumor growth. Cancer Res. 2011;71(7):2466-75.

64. Burdelya LG, Brackett CM, Kojouharov B, Gitlin, II, Leonova KI, Gleiberman AS, et al. Central role of liver in anticancer and radioprotective activities of Toll-like receptor 5 agonist. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110(20):E1857-66.

65. Ochi A, Graffeo CS, Zambirinis CP, Rehman A, Hackman M, Fallon N, et al. Toll-like receptor 7 regulates pancreatic carcinogenesis in mice and humans. J Clin Invest. 2012;122(11):4118-29.

66. Hasan UA, Bates E, Takeshita F, Biliato A, Accardi R, Bouvard V, et al. TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16. J Immunol. 2007;178(5):3186-97.

67. Cannella F, Pierangeli A, Scagnolari C, Cacciotti G, Tranquilli G, Stentella P, et al. TLR9 is expressed in human papillomavirus-positive cervical cells and is overexpressed in persistent infections. Immunobiology. 2015;220(3):363-8.

68. Jouhi L, Datta N, Renkonen S, Atula T, Makitie A, Haglund C, et al. Expression of toll-like receptors in HPV-positive and HPV-negative oropharyngeal squamous cell carcinoma-an in vivo and in vitro study. Tumour Biol. 2015.

69. Yuan ZQ, Bennett L, Campo MS, Nasir L. Bovine papillomavirus type 1 E2 and E7 proteins down-regulate Toll Like Receptor 4 (TLR4) expression in equine fibroblasts. Virus Res. 2010;149(1):124-7.

70. Datta A, Sinha-Datta U, Dhillon NK, Buch S, Nicot C. The HTLV-I p30 interferes with TLR4 signaling and modulates the release of pro- and anti-inflammatory cytokines from human macrophages. J Biol Chem. 2006;281(33):23414-24.

71. Lewis JS, Jr., Thorstad WL, Chernock RD, Haughey BH, Yip JH, Zhang Q, et al. p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma:an entity with a favorable prognosis regardless of tumor HPV status. The American journal of surgical pathology. 2010;34(8):1088-96.

72. Backhed F, Hornef M. Toll-like receptor 4-mediated signaling by epithelial surfaces: necessity or threat? Microbes Infect. 2003;5(11):951-9.

73. Moyes DL, Naglik JR. Mucosal immunity and Candida albicans infection. Clin Dev Immunol. 2011;2011:346307.

74. Rakoff-Nahoum S, Medzhitov R. Toll-like receptors and cancer. Nat Rev Cancer. 2009;9(1):57-63.

75. Francescone R, Hou V, Grivennikov SI. Microbiome, inflammation, and cancer. Cancer J. 2014;20(3):181-9.

76. DeCarlo CA, Rosa B, Jackson R, Niccoli S, Escott NG, Zehbe I. Toll-like receptor transcriptome in the HPV-positive cervical cancer microenvironment. Clin Dev Immunol. 2012;2012:785825.

77. Zhang Y, Luo F, Cai Y, Liu N, Wang L, Xu D, et al. TLR1/TLR2 agonist induces tumor regression by reciprocal modulation of effector and regulatory T cells. J Immunol. 2011;186(4):1963-9.

78. Mauldin IS, Wang E, Deacon DH, Olson WC, Bao Y, Slingluff CL, Jr. TLR2/6 agonists and interferon-gamma induce human melanoma cells to produce CXCL10. Int J Cancer. 2015;137(6):1386-96.

79. Dziarski R, Gupta D. Staphylococcus aureus peptidoglycan is a toll-like receptor 2 activator: a reevaluation. Infect Immun. 2005;73(8):5212-6.

80. Tye H, Kennedy CL, Najdovska M, McLeod L, McCormack W, Hughes N, et al. STAT3-driven upregulation of TLR2 promotes gastric tumorigenesis independent of tumor inflammation. Cancer Cell. 2012;22(4):466-78.

81. Pradere JP, Dapito DH, Schwabe RF. The Yin and Yang of Toll-like receptors in cancer. Oncogene. 2014;33(27):3485-95.

82. Al-Baghdadi M, Durham J, Araujo-Soares V, Robalino S, Errington L, Steele J. TMJ Disc Displacement without Reduction Management: A Systematic Review. Journal of dental research. 2014;93(7 suppl):37S-51S.

83. Mai CW, Kang YB, Pichika MR. Should a Toll-like receptor 4 (TLR-4) agonist or antagonist be designed to treat cancer? TLR-4: its expression and effects in the ten most common cancers. Onco Targets Ther. 2013;6:1573-87.

84. Waugh DJ, Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. Clin Cancer Res. 2008;14(21):6735-41.

85. Shinriki S, Jono H, Ota K, Ueda M, Kudo M, Ota T, et al. Humanized anti-interleukin-6 receptor antibody suppresses tumor angiogenesis and in vivo growth of human oral squamous cell carcinoma. Clin Cancer Res. 2009;15(17):5426-34.

86. Yadav A, Kumar B, Datta J, Teknos TN, Kumar P. IL-6 promotes head and neck tumor metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition via the JAK-STAT3-SNAIL signaling pathway. Mol Cancer Res. 2011;9(12):1658-67.

87. Schafer ZT, Brugge JS. IL-6 involvement in epithelial cancers. J Clin Invest. 2007;117(12):3660-3.

88. De Larco JE, Wuertz BR, Rosner KA, Erickson SA, Gamache DE, Manivel JC, et al. A potential role for interleukin-8 in the metastatic phenotype of breast carcinoma cells. Am J Pathol. 2001;158(2):639-46.

89. Bar-Eli M. Role of interleukin-8 in tumor growth and metastasis of human melanoma. Pathobiology. 1999;67(1):12-8.

90. Shi Z, Yang WM, Chen LP, Yang DH, Zhou Q, Zhu J, et al. Enhanced chemosensitization in multidrug-resistant human breast cancer cells by inhibition of IL-6 and IL-8 production. Breast Cancer Res Treat. 2012;135(3):737-47.

91. Park JS, Kim EJ, Kwon HJ, Hwang ES, Namkoong SE, Um SJ. Inactivation of interferon regulatory factor-1 tumor suppressor protein by HPV E7 oncoprotein. Implication for the E7-mediated immune evasion mechanism in cervical carcinogenesis. J Biol Chem. 2000;275(10):6764-9.

92. Ronco LV, Karpova AY, Vidal M, Howley PM. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. Genes Dev. 1998;12(13):2061-72.

93. Pridmore AC, Jarvis GA, John CM, Jack DL, Dower SK, Read RC. Activation of toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4/MD2 by Neisseria is independent of capsule and lipooligosaccharide (LOS) sialylation but varies widely among LOS from different strains. Infect Immun. 2003;71(7):3901-8.

94. Roszak A, Lianeri M, Sowinska A, Jagodzinski PP. Involvement of Toll-like Receptor 9 polymorphism in cervical cancer development. Mol Biol Rep. 2012;39(8):8425-30.

95. Kauppila JH, Mattila AE, Karttunen TJ, Salo T. Toll-like receptor 5 (TLR5) expression is a novel predictive marker for recurrence and survival in squamous cell carcinoma of the tongue. Br J Cancer. 2013;108(3):638-43.

96. Hasan U. Human papillomavirus (HPV) deregulation of Toll-like receptor 9. Oncoimmunology. 2014;3(1):e27257.

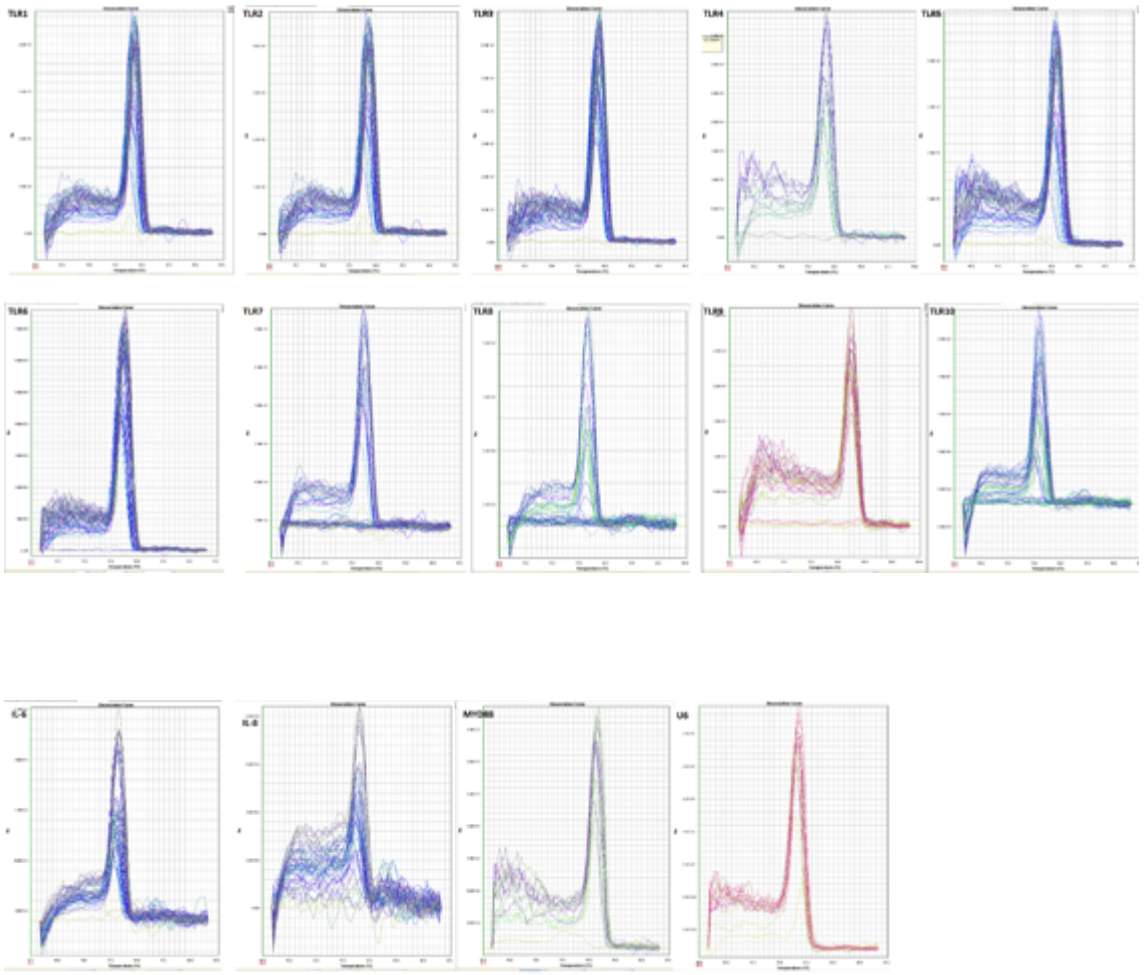
97. Wyllie DH, Kiss-Toth E, Visintin A, Smith SC, Boussouf S, Segal DM, et al. Evidence for an accessory protein function for Toll-like receptor 1 in anti-bacterial responses. J Immunol. 2000;165(12):7125-32.

98. Kurt-Jones EA, Sandor F, Ortiz Y, Bowen GN, Counter SL, Wang TC, et al. Use of murine embryonic fibroblasts to define Toll-like receptor activation and specificity. J Endotoxin Res. 2004;10(6):419-24.

Apêndice A- Eficiência dos *primers*

Receptor	***Eficiência***
TLR1	93.43%
TLR2	94.17%
TLR3	95.68%
TLR4	95.30%
TLR5	96.45%
TLR6	101.35%
TLR7	95.68%
TLR8	77%
TLR9	110%
TLR10	97.27%

Apêndice B- Curva de *Melt*



Apêndice C- Média dos valores de Ct

Linhagem	TLR2- SEM ESTIMULO	TLR2-PGN	TLR2-LPS-UP
SCC72	33,6	28,9	26,7
SCC89	26,4	25,9	25,7
SCC2	26,9	30,8	28,7
SCC90	24,7	26,3	23,5

Linhagem	TLR4- SEM ESTIMULO	TLR4-PGN	TLR4-LPS	TLR4-LPS-UP
SCC72	27,7	26,0	25,9	26,7
SCC89	40,0	26,0	37,3	25,3
SCC2	40,0	28,0	40,0	35,6
SCC90	22,9	25,3	24,0	21,6

Linhagem	IL6- SEM ESTIMULO	IL6-PGN	IL6-LPS	IL6-LPS-UP
SCC72	35,0	33,2	32,4	32,7
SCC89	27,6	26,2	24,6	26,4
SCC2	34,2	29,8	33,4	29,3
SCC90	38,4	38,4	38,6	34,5

Linhagem	IL8- SEM ESTIMULO	IL8-PGN	IL8-LPS	IL8-LPS-UP
SCC72	39,1	31,7	28,7	30,2
SCC89	40,0	33,7	33,4	34,1
SCC2	40,0	28,4	40,0	29,9
SCC90	40,0	40,0	40,0	33,4

	TLR1	TLR3	TLR5	TLR6	TLR7	TLR8	TLR9
SCC72	29	33	26	25	35	35	29
SCC89	29	27	31	26	33	35	29
SCC2	33	28	33	29	35	35	32
SCC90	32	25	29	29	35	35	31
HELA	31	29	30	25	35	35	29

Ct 35= indeterminado

ANEXO A- Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE TLR, p16ink4a, p21 e p27 EM LESÕES BUCAIS

Pesquisador: Suzana Cantanhede Orsini Machado de Sousa

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 10641412.2.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de Sao Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 428.746

Data da Relatoria: 18/10/2013

Apresentação do Projeto:

Dentre as diversas etiologias dos carcinomas, os vírus oncogênicos, como o Papiloma Vírus Humano(HPV),estão fortemente associados à displasia epitelial e aos carcinomas. O HPV possui proteínas oncogênicas,como E6 e E7, que interferem no ciclo celular desestabilizando alguns inibidores de cinases dependentes de ciclina(CDK), como p21 e p27 e p16. Este vírus também parece causar downregulation de TLR4, um receptor crucial para o reconhecimento de fungos. Algumas lesões como papiloma bucal, condiloma acuminado, carcinoma epidermoide e carcinoma orofaríngeo demonstram possuir uma alta frequência de

cândida em sua superfície. A candidíase parece ocorrer pela depleção de um receptor de superfície que reconhece esse fungo e assim não ativa o sistema imune contra o microorganismo estabelecido. Em alguns casos de câncer de cabeça e pescoço, a proteína 16ink4a já está sendo utilizada como marcação para o HPV, por isso optamos por esta proteína, a p21cip e a p27kip1 para verificar se existe alguma correlação entre estas proteínas, o TLR4 e a presença de candidíase. É um estudo do tipo laboratorial in vitro. Serão selecionadas 60 amostras do arquivo do Serviço de Patologia Cirúrgica da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, diagnosticadas no período de 2006 a 2012.Informações sobre gênero, idade e hábitos de tabagismo e etilismo do paciente, bem como localização da lesão e presença de outras doenças

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br

associadas serão coletadas a partir das fichas de solicitação de exame anatomopatológico, também arquivados no serviço de patologia cirúrgica.

Objetivo da Pesquisa:

1- Correlacionar a presença do HPV com a marcação de TLR4 de epitélio bucal de papiloma bucal,condiloma acumindado, carcinoma epidemoide e carcinoma orofaringeo. 2-Correlacionar a presença do HPV com a marcação de p16ink4a, p21cip e p27kip1 de epitélio bucal de papiloma bucal, condiloma acuminado,carcinoma epidemoide e carcinoma orofaringeo. 3-Analisar a diferença da marcação de imunohistoquímica das p16ink4a, p21cip e p27kip1 entre lesões benignas e lesões malignas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Risco: mínimo

Benefícios: Espera-se colaborar com o tratamento de papiloma bucal, condiloma acuminado e carcinoma epidermoide de boca.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é relevante.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os documentos exigidos foram apresentados pela pesquisadora: folha de rosto e autorização do Serviço de Patologia Cirúrgica da FOUSP.

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais semestrais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto se encontra adequado para aprovação do CEP.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 428.746

SAO PAULO, 18 de Outubro de 2013

Assinador por:
Maria Gabriela Haye Biazevic
(Coordenador)

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br