UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Fisiopatologia

Expressão de indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) e triptofano 2,3-dioxigenase (TDO) no ambiente cervicovaginal normal, na vaginose bacteriana e nas lesões cervicais associadas ao HPV

Paloma Almeida Venancio

Orientadora: Profa. Tit. Ana Campa

Coorientadora: Dra. Michelle Garcia Discacciati de Carvalho

São Paulo
2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Fisiopatologia

Expressão de indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) e triptofano 2,3-dioxigenase (TDO) no ambiente cervicovaginal normal, na vaginose bacteriana e nas lesões cervicais associadas ao HPV

Paloma Almeida Venancio

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018.
O original encontra-se disponível no Serviço de Pós Graduação da FCF/USP

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientadora: Profa. Tit. Ana Campa

Coorientadora: Dra. Michelle Garcia Discacciati de Carvalho

São Paulo
2018

Paloma Almeida Venancio

Expressão de indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) e triptofano 2,3-dioxigenase (TDO) no ambiente cervicovaginal normal, na vaginose bacteriana e nas lesões cervicais associadas ao HPV

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre.

_____

Profa. Tit. Ana Campa
Orientadora/Presidente

_____

1º. examinador

_____

2º. examinador

_____

3º. examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2018.

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.

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

Venancio, Paloma Almeida
V448e Expressão de indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) e triptofano 2,3-dioxigenase (TDO) no ambiente cervicovaginal normal, na vaginose bacteriana e nas lesões cervicais associadas ao HPV / Paloma Almeida Venancio. -- São Paulo, 2018.
82p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Campa, Ana
Co-orientador: Carvalho, Michelle Garcia Discacciati de

1. Colo uterino : câncer 2. Triptofano 3. Lesões cervicais I. T. II. Campa, Ana, orientador III. Carvalho, Michelle Garcia Discacciati de, Co-orientador.

616.99466 CDD

"Patience, persistence and perspiration make an unbeatable combination for success".

Napoleon Hill

Dedicatória

Aos meus pais, Edna e Marcelo. Obrigada pelo incentivo e por acreditarem em mim, sem vocês não seria possível.

Aos meus avós, Maria de Lourdes e Edvaldo (*in memoriam*). Obrigada por tudo que sempre fizeram por mim.

Ao meu namorado Eric, agradeço imensamente pela paciência, força e por acreditar que esta conquista seria possível.

À minha orientadora, Ana Campa e coorientadora Michelle, esse trabalho é nosso e agradeço muito pela confiança.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ser minha força, me guardar e por tornar essa conquista possível.

Aos meus pais, não tenho palavras para agradecer tudo que sempre fizeram por mim. Vocês sempre estão ao meu lado, me encorajando e acreditando em mim. Agradeço pelas marmitinhas e por me levarem no ponto de manhã rs. Ao meu irmão Pierre, por ser tão carinhoso. Amo vocês!

Ao meu futuro marido Eric, obrigada amor por estar comigo e sonhar comigo. Essa conquista é nossa, você me motivou todos os dias à ir em frente sem medo e mostrou que tudo seria capaz se acreditasse. Você é meu alicerce, amo você!

Agradeço aos meus tios, Priscila, Valmir e Luciano pelo incentivo e carinho. E aos meus primos Blenner, Enzo e Guilherme. Vocês são muito especiais para mim.

À minha amiga Larissa, por ter me incentivado à entrar no mestrado e por todo carinho e cuidado que tem comigo.

À minha orientadora Ana Campa, agradeço pelos ensinamentos e pela dedicação. Foi muito bom esses anos juntas, sou muito grata pela confiança, incentivo e por ter acreditado em mim. Você é uma pessoa maravilhosa.

À minha coorientadora Michelle, agradeço muito pelo carinho e paciência que me ensinou, e pelos puxões de orelha, sem você esse trabalho não seria possível. Obrigada por tudo, principalmente pela confiança que teve em mim para prosseguir com seu trabalho.

Às minhas amigas Cláudia e Babi, pela nossa amizade e por toda força.

À minha amiga Aline, pelas boas risadas no telefone até altas horas e por sempre me lembrar que ter fé é importante .

À Andressa, uma grande amiga que ganhei durante essa trajetória, obrigada pelas noites em claro juntas estudando, pela paciência e por tudo que me ensinou. Agradeço demais por me ajudar com a imagem da dissertação.

Às minhas cunhadas, sogra e a Soraia pelo incetivo e apoio nas horas difíceis.

Às minhas companheiras de Lab: Branqs, Maysa, Mar e Carmem. Obrigada por tudo meninas, sinto um carinho especial por cada uma, agradeço por tudo que me ensinaram, também pelas risadas, cafezinhos e gordices. Agradeço pela paciência e até pelos puxões de orelha que fizeram toda diferença e me ajudaram a crescer mais como pessoa. Desejo muito sucesso a todas vocês!

À Sika, mais que uma técnica, uma amiga e mãe, obrigada pelas conversas e por toda ajuda. E a Fabi, por ser sempre tão legal comigo.

À Profa. Silvya Stuchi, muito obrigada por ter me acolhido tão bem no seu laboratório e colaborado muito com o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do Lab de citopatologia: Érika, Débora, Dani, Vanessa e Luís. E agradeço também a técnica Silvia, por toda paciência e ensinamentos.

Aos professores membros da minha banca de qualificação: Profa. Márcia Consolaro, Prof. Enrique Boccardo e Profa. Sandra Farsky.

Agradeço ainda aos colegas de departamento e funcionários.

Ao apoio financeiro do CNPq, CAPES e FAPESP.

RESUMO

VENANCIO, P. A. **Expressão de indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) e triptofano 2,3-dioxigenase (TDO) no ambiente cervicovaginal normal, na vaginose bacteriana e nas lesões cervicais associadas ao HPV.** (Dissertação de Mestrado). vol.1, 85 f. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Neste estudo avaliamos o papel do metabolismo do triptofano (Trp) na homeostasia, na vaginose bacteriana e nas lesões cervicais associadas ao HPV. A importância do metabolismo do Trp se deve a sua ação na proliferação de microrganismos e de células do sistema imune. O consumo de triptofano tem sido identificado como uma forma de controlar o crescimento bacteriano limitando a infecção. Por outro lado, a oxidação de Trp produz quinurenina (QUIN), que tem papel chave na tolerância imunológica. A formação de QUIN se dá através das enzimas indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) e triptofano 2,3- dioxigenase (TDO). A mais estudada delas no âmbito das infecções/ imuno escape é a enzima IDO. Mais recentemente, tem-se dado ênfase ao papel da TDO no câncer. Nesta dissertação, o interesse foi avaliar a expressão da IDO no epitélio cervicovaginal de mulheres com vaginose bacteriana e de IDO e TDO em amostras cervicais de mulheres com diferentes graus de lesão cervical associada ao HPV. Foram incluídas 165 mulheres atendidas no CAISM/UNICAMP, as quais foram divididas em dois grupos: grupo caso composto por mulheres com lesão de baixo ou alto grau e carcinoma invasor (n=42) e grupo controle composto por mulheres com citologia oncológica normal, independente de apresentar infecção genital (n=123). IDO foi avaliada por imunocitoquímica em citologia em base líquida e IDO e TDO em biópsias cervicais. Mulheres com vaginose bacteriana apresentaram expressão aumentada de IDO em células escamosas em comparação às mulheres sem vaginose bacteriana (OR=7.41; IC 95%= 2.50 a 21.4; p <0.0001). No epitélio vaginal normal com ou sem infecção por HPV houve uma expressão leve de IDO em células escamosas. Na presença de lesões ou carcinoma, houve um aumento no número de células escamosas displásicas e de leucócitos IDO-positivos; aumento de IDO também pôde ser observada em culturas de pele organotípicas transduzidas com as oncoproteínas E6/ E7 do HPV16. Nas lesões cervicais, assim como visto para a IDO, a TDO esteve expressa em leucócitos, especialmente os infiltrados na região estromal e na parede dos vasos sanguíneos. A expressão basal de IDO no epitélio cervical normal e sua regulação positiva na infecção por HPV e lesões associadas sugerem a participação do metabolismo do Trp nos mecanismos imunossupressores envolvidos na doença. Embora o papel do IDO já tenha sido abordada anteriormente, até onde sabemos esta é a primeira evidência da expressão de TDO no epitélio vaginal, na neoplasia intraepitelial cervical e carcinoma de células escamosas. Ainda, em leucócitos, especialmente aqueles com morfologia típica de polimorfonucleares, parecem ser importantes fontes de IDO na cérvix uterina.

Palavras-chave: indoleamina 2,3-dioxigenase, triptofano 2,3-dioxigenase, HPV, vaginose bacteriana, neoplasia intraepitelial cervical, carcinoma de células escamosas.

ABSTRACT

VENANCIO, P.A. **Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) and tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO) in normal cervicovaginal environment, bacterial vaginosis and cervical lesions associated with HPV**. (Master's thesis). vol. 1, 85 f. Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo. 2018

In this study we evaluated the role of tryptophan (Trp) metabolism in cervix homeostasis, bacterial vaginosis and HPV-associated lesions. The importance of Trp metabolism is due to its action on microorganisms and immune cells. Tryptophan consumption has been identified as a way to controlling bacterial growth limiting infection. On the other hand, the oxidation of Trp produces kynurenine (Kyn) which plays a key role in immunological tolerance. The formation of Kyn occurs through the enzymes indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) and tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO). IDO is the most studied of them within the context of infections / immune escape. More recently, TDO has also been considered in studies of cancer progression. In this thesis, we were interested in cervicovaginal epithelium IDO expression in women with bacterial vaginosis and of IDO and TDO in cervical samples of women with different degrees of cervical lesion associated with HPV. A total of 165 women attended at CAISM/UNICAMP were divided into two groups: a case group composed of women with low or high grade lesions and invasive carcinoma (n = 42) and a control group composed of women with normal cytology, independent to present genital infection (n =123). IDO was evaluated by immunocytochemistry in liquid-based cytology and IDO and TDO in cervical biopsies. Women with bacterial vaginosis had increased IDO expression in squamous cells compared to women without bacterial vaginosis (OR = 7.41, 95% CI = 2.50- 21.74; $p<0.0001$). In normal vaginal epithelium with or without HPV infection there was a mild IDO expression in squamous cells. In the presence of cervical intraepithelial lesions or squamous cell carcinoma, there was an increase in the number of IDO-positive dysplastic squamous cells and leukocytes; increase in IDO can also be observed in organotypic skin cultures transduced with HPV-16 E6/E7 oncoproteins. In cervical lesions, as observed for IDO, TDO was expressed in leukocytes, especially infiltrates in the stromal region and in the wall of blood vessels. The basal expression of IDO in the normal cervical epithelium and its positive regulation in HPV infection and associated lesions suggests the participation of Trp metabolism in the immunosuppressive mechanisms involved in the disease. Although some previous data have already considered the role of IDO, as far as we know this is the first evidence of the participation of TDO in the vaginal epithelium, cervical intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma. In addition, in leukocytes, especially those with a typical polymorphonuclear morphology, appear to be important sources of IDO in the uterine cervix.

Key words: indoleamine 2,3-dioxygenase, tryptophan 2,3-dioxygenase, HPV, bacterial vaginosis, cervical intraepithelial neoplasia, squamous cell carcinoma.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....14

LISTA DE FIGURAS.....17

LISTA DE TABELAS.....18

1. INTRODUÇÃO.....19

2. OBJETIVOS.....31

3. MATERIAIS E MÉTODOS.....32

3.1. Casuística e Aspectos Éticos.....32

3.2. Diagnóstico Morfológico das lesões cervicais.....33

3.3. Citologia em Base Líquida (CBL).....33

3.4. Imunocitoquímica e Imunohistoquímica.....34

3.5. Critério para leitura e interpretação da imunocitoquímica para IDO na citologia em base líquida.....35

3.6. Imunohistoquímica para IDO em culturas organotípicas de queratinócitos....36

3.7 Genotipagem do HPV.....36

3.8 PCR multiplex para o diagnóstico de 7 infecções genitais.....37

3.9 Bacterioscopia.....37

3.10 Testes estatísticos.....37

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....38

CAP. 1: Expressão de IDO na cérvice normal na ausência e na presença de vaginose e infecções genitais.....39

CAP. 2: Expressão de IDO e TDO na infecção por HPV e suas lesões cervicais associadas.....46

5. CONCLUSÕES.....62

6. REFERÊNCIAS.....63

APÊNDICE A.....73

APÊNDICE B.....74

ANEXOS.....75

LISTA DE ABREVIATURAS

APC: células apresentadoras de antígeno

BSA: albumina bovina sérica

CAISM: Centro de Atenção Integral à Saúde da mulher

CBL: citologia em base líquida

CCE: Carcinoma de células escamosas

CDC: Centro de Controle e Prevenção de Doenças (*Center for Disease Control and Prevention*)

CO: citologia oncológica

DAB: 3,3' Diaminobenzidina tetrahidrocloreto

DCs: células dendríticas

DIP: doença inflamatória pélvica

DNA: ácido desoxirribonucleico

DSTs: Doenças sexualmente transmissíveis

E6: Proteína oncogênica do Papilomavírus humano

E7: Proteína oncogênica do Papilomavírus humano

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

G-CSF: fator estimulador de colônias granulocitárias

HBV: vírus da hepatite B

HCV: vírus da hepatite C

HFK: queratinócitos de prepúcio humano (*human foreskin keratinocyte*)

HIV: vírus da Imunodeficência humana

HPV: Papilomavírus humano

HRP: peroxidase de rábano *(horseradish peroxidase)*

HSV1: vírus herpes simplex tipo 1

HSV2: vírus herpes simplex tipo 2

IC 95%: intervalo de confiança de 95%

IDO-1: indoleamina 2,3-dioxigenase 1

IDO-2: indoleamina 2,3-dioxigenase 2

IFN-γ: interferon-gama

IL-10: interleucina 10

IL-12: interleucina 12

JEC: junção escamocolunar

LIEAG: lesão intraepitelial de alto grau

LIEBG: lesão intraepitelial de baixo grau

LLETZ: excisão eletrocirúrgica com alça (*large loop excision of the transformation zone*)

MDSC: células supressoras derivadas da linhagem mielóide (*myeloid-derived suppressor cells*)

MS: Ministério da Saúde

NIC 1: neoplasia intraepitelial cervical de grau 1

NIC 2: neoplasia intraepitelial cervical de grau 2

NIC 3 : neoplasia intraepitelial cervical de grau 3

NIC: neoplasia intraepitelial cervical

NK: células matadoras naturais *(Natural Killer Cell)*

OMS: Organização Mundial da Saúde

OR: *odds ratio* (ou Razão de Chances, RC)

p53: proteína 53

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PMN: polimorfonucleares

pRb: proteína do retinoblastoma

QUIN: quinurenina

rpm: rotações por minuto

TDO: triptofano 2,3-dioxigenase

Teff: linfócitos T efetores

TGF-β: fator de transformação do crescimento beta

TLR: receptor do tipo Toll *(Toll-like receptor*)

Treg: células T reguladoras

Tris: hidroximetil-aminometano

Trp: triptofano

VB: vaginose bacteriana

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática do epitélio escamoso e epitélio glandular.....**19**

Figura 2: Representação esquemática do genoma do HPV.....**22**

Figura 3: Ciclo infeccioso do HPV de alto risco.....**24**

Figura 4: Citologia e Histologia das lesões cervicais associadas ao HPV.....**25**

Figura 5: Primeira etapa da via das quinureninas (Via QUIN) do metabolismo do Trp.....**27**

Figura 6: Efeitos da enzima IDO.....**28**

Figura 7: Fluxograma de divisão da casuística dos estudos.....**32**

Figura 8: Controles utilizados para a reação de Imunocitoquímica.....**34**

Figura 9: Expressão de IDO em amostras de citologia em base líquida avaliadas por imunocitoquímica.....**42**

Figura 10: Análise imunohistoquímica da expressão de IDO em culturas organotípica..**50**

Figura 11: Análise imunohistoquímica representativa da expressão de IDO em células escamosas e leucócitos presentes na CBL.....**53**

Figura 12. Análise imunohistoquímica da expressão de IDO em biópsias cervicais.....**55**

Figura 13. Análise imunohistoquímica em biópsia de NIC 3 com HPV16.....**56**

Figura 14. Análise imunohistoquímica em biópsia cervical de carcinoma microinvasivo com HPV 16 mostrando a expressão de TDO em leucócitos na região adjacente à lesão e no epitélio.....**57**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Frequência de infecções cervicovaginais, vaginose bacteriana e HPV**.....40**

Tabela 2: Expressão de IDO em células escamosas de acordo com a presença ou ausência de vaginose bacteriana**.....41**

Tabela 3 : Dados preliminares sobre a associação entre IDO em células escamosas e as infecções que foram pouco prevalentes neste tamanho amostral**.....72**

Tabela 4: Resultados preliminares sobre a expressão de IDO em leucócitos de acordo com as infecções cervicovaginais**.....73**

Tabela 5: Características clínicas e sociodemográficas das mulheres incluídas no estudo**.....48**

Tabela 6: Expressão de indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) em células escamosas de acordo com as lesões cervicais, avaliada em CBL**.....51**

Tabela 7: Expressão de indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) em leucócitos de acordo com as lesões cervicais, avaliada em CBL**.....54**

1. INTRODUÇÃO

O aparelho genital feminino inferior é composto por vulva, vagina e colo do útero, que divide-se em endocérvice e ectocérvice. O colo do útero comunica-se com o meio externo por meio da vagina, um canal muscular longo que começa no introito vaginal e termina em um fundo cego onde a cérvice se implanta. O epitélio que recobre a vagina e a ectocérvice é do tipo escamoso, estratificado e não-queratinizado. A endocérvice é revestida por um epitélio colunar simples ou também chamado de epitélio glandular, produtor de muco (Figura 1). O local de união entre o epitélio glandular da endocérvice e o epitélio escamoso da ectocérvice é denominado junção escamo-colunar (JEC) (Hickey *et al.*, 2011; Consolaro e Maria-Engler, 2012). O epitélio cervicovaginal contém ainda células do sistema imune e microbiota residente, que, junto aos elementos epiteliais supracitados, fornecem um aparato de defesa, já que o aparelho genital feminino, devido a particularidade anatômica de se comunicar com o meio externo, representa um sítio de fácil acesso aos agentes infecciosos (Linhares *et al.*, 2010; Van De Wijgert *et al.*, 2014; Borgdorff *et al.*, 2016; Smith e Ravel, 2017).

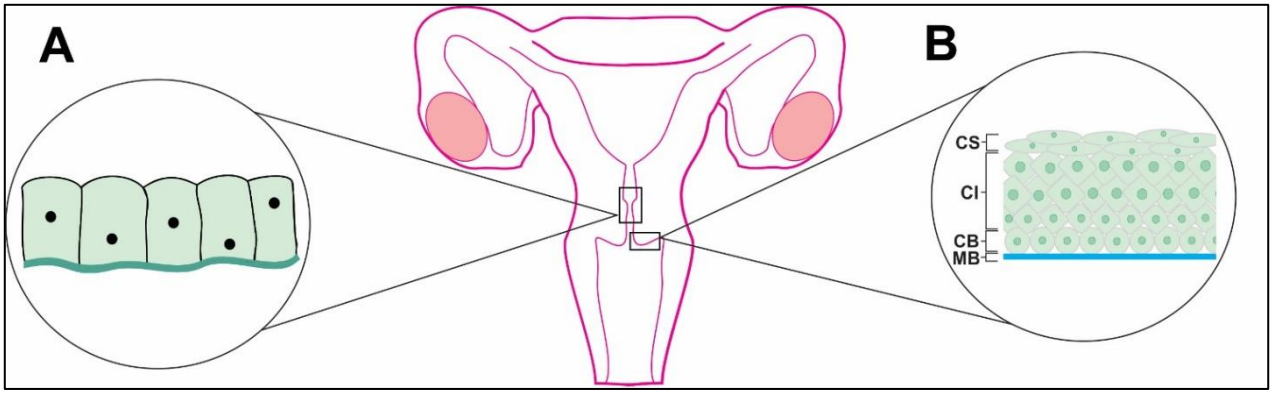

Figura 1: Representação esquemática do epitélio escamoso e epitélio glandular do colo do útero. 1A: epitélio glandular simples e 1B: epitélio escamoso não-queratinizado composto por várias camadas de células: camada basal, camada intermediária e camada superior. Fonte: da autora.

Uma microbiota saúdavel é composta por diversos microorganismos anaeróbicos e aeróbicos. A prevalência de *Lactobacillus* no ambiente vaginal é crucial para impedir a instalação de patógenos e garantir a saúde vaginal, devido a produção de compostos antimicrobianos como: ácido láctico, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas e sua capacidade de aderir às células epiteliais formando um biofilme protetor, além de competir com as demais bactérias por substrato (Borges *et al.*, 2014) .

O advento de técnicas de sequenciamento do gene bacteriano, como o gene ribossomal 16S rRNA, revelou microorganismos não cultiváveis e tem possibilitado uma melhor caracterização do microbioma vaginal (Ravel *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2012). A composição do microbiota vaginal tem um importante papel protetor contra infecções genitais e disbioses, tais como a vaginose bacteriana (VB), vaginite causada por fungos, e doenças sexualmente transmissíveis (DSTs) (Reid e Bocking, 2003). O estudo do microbioma vaginal de mulheres assintomáticas em idade reprodutiva, permitiu a identificação de cinco perfis principais: em quatro deles houve o predomínio de *Lactobacillus iners, L. crispatus, L. gasseri ou L. jensenii*, e o quinto grupo apresentou diminuição de *Lactobacillus* e maior taxa de organismos estritamente anaeróbicos, como: *Prevotella, Dialister, Atopobium, Gardnerella, Megasphaera, Peptoniphilus, Sneathia, Eggerthella, Aerococcus, Finegoldia e Mobiluncus* (Ravel *et al.*, 2011).

A vaginose bacteriana tem sido associada à alguns problemas na saúde reprodutiva, como maiores chances de infecção por vírus da imunodeficiência humana (HIV) e outras DSTs, doença inflamatória pélvica (DIP), parto prematuro e infecções maternas e neonatais (Discacciati et al., 2006; van de Wigjert et al., 2014; Brotman et al., 2014).

Embora, por definição, o termo “vaginose” remeta à ausência de inflamação, eventualmente esta inversão de microbiota está acompanhada de sinais de inflamação, como o aumento de leucócitos polimorfonucleares. Devido a isso, já foi sugerido o uso do termo vaginite aeróbica para diferenciar estes casos da vaginose bacteriana, incluindo como critério diagnóstico: microbiota sem lactobacilos (Grau III), presença de cocos ou bacilos, contagem de leucócitos (e aspecto granuloso) e presença de células parabasais, essa avaliação é realizada por microscopia de contraste de fases (Donders *et al.*, 2002). Para o diagnóstico de vginose bacteriana foi adotado a bacterioscopia pelo método de GRAM, é considerado, tanto pelo CDC (Center for Disease Control and Prevention) quando pelo Ministério da Saúde (MS) do Brasil, como o padrão ouro para diagnóstico

bacterioscópico deste desequilíbrio de microbiota, e baseia-se na quantificação dos morfotipos bacterianos, mas não sugere a quantificação de leucócitos como critério de inflamação (Workowski *et al.*, 2010; Ministério da Saúde, 2014).

O metabolismo do triptofano (Trp) tem um papel central no balanço entre a imunotolerância e manutenção da microbiota no epitélio intestinal (Gao *et al.*, 2018). Por outro lado, a importância do metabolismo do Trp na relação entre o epitélio cervicovaginal e microbiota é ainda insipiente. Há possibilidade de que alterações no microbioma vaginal poderiam comprometer a homeostasia e induzir um estado imune e inflamatório favorável à aquisição de outras infecções genitais, ainda é objeto de estudo. O aparelho genital feminino inferior pode abrigar várias bactérias, parasitas e vírus patogênicos, como *Neisseria gonorrhoeae*, C*hlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, vírus herpes simplex tipo 2 (HSV2), *Papilomavírus humano* (HPV), e o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (WHO, 2012). Destas, a infecção por HPV é uma das mais preocupantes devido a sua associação com a carcinogênese do colo do útero (Walboomers *et al*., 1999).

O HPV pertence a família *Papillomaviridade* e agrupados em 5 diferentes gêneros: alfa-, beta-, gama-, mu- e ni-papilomavírus. Foram identificados mais de 200 tipos de HPV, dos quais aproximadamente 40 podem infectar o trato ano-genital (Papillomavirus Episteme (PaVE); Bernard *et al*., 2010). Os HPVs do gênero *Alphapapillomavirus*, que infectam mucosa são classificados em baixo e alto risco em relação a capacidade oncogênica (De Villiers *et al.*, 2004). Os tipos de HPV genital são divididos em subgrupos que infectam a mucosa e classificados conforme o risco. Os tipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 são de baixo risco oncogênico e estão associados a verrugas genitais (*condiloma acuminado*). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), os tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 são considerados de alto risco oncogênico (IARC, 2012). Dentre os HPVs de alto risco oncogênico destaca-se os tipos HPV 16 e HPV18, que estão associados com 70% dos casos de câncer do colo do útero (de Villiers *et al.*, 2004; Doobar, 2006; Li *et al*., 2011).

Os HPVs são pequenos vírus não envelopados, de DNA dupla fita circular, com cerca de 8000 pares de base (pb), e um capsídeo apresentando simetria icosaédrica (Muñoz *et al.*, 2006). O genoma do HPV possui três regiões funcionais: uma região não codificante conhecida como upstream regulatory region (URR) ou região controladora longa (LCR), responsável pela replicação e transcrição do DNA viral; uma região que

codifica genes precoces de HPV (E1, E2, E4, E5, E6 e E7), que tem função na replicação e transcrição do genoma do HPV e na regulação do ciclo celular; e uma região tardia, composta por dois genes, L1 e L2, que codificam a proteína do capsídeo viral (Figura 2) (McMurray *et al*., 2001; Graham *et al*., 2006).

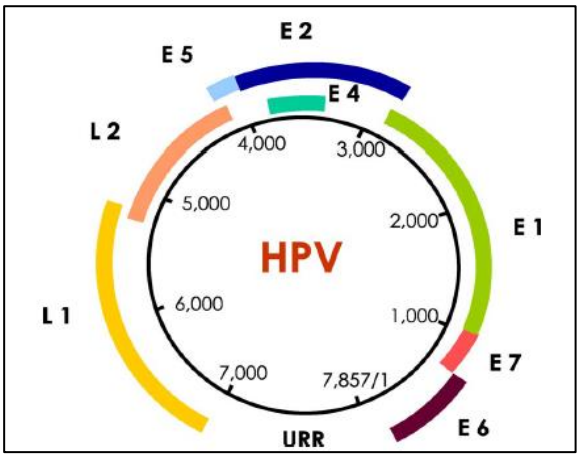

Figura 2. Representação esquemática do genoma do HPV. Mostrando a distribuição dos genes precoces e não estruturais (E), os genes do capsídeo viral (L1 e L2) e região regulatória (URR). Fonte: Muñoz et al., 2006.

O ciclo viral do HPV está correlacionado com o programa de diferenciação das células hospedeiras (Kajitani *et al.*, 2012). De acordo com Doobar (2005) o ciclo normal da infecção por HPV possui 5 fases consecutivas: infecção, manutenção do genoma, fase proliferativa, amplificação genômica e síntese e liberação de novas partículas virais. A infecção inicial pelo vírus HPV necessita que as partículas virais infecciosas entrem nas células da camada proliferativa basal do epitélio escamoso do colo do útero através de uma microfissura ou ferida, pois essas células possuem um alto potencial de diferenciação. Após a infecção, o genoma do vírus se mantém com baixo número de cópias na forma epissomal. A manutenção do genoma na forma epissomal na camada basal é necessária para o estabelecimento da fase inicial do ciclo viral. Nessa fase as proteínas iniciais E6, E7, E1 e E2 estão expressas em baixo nível. No epitélio normal o ciclo celular termina quando as células basais migram para as camadas suprabasais e se diferenciam. Para a produção de partículas virais é crucial à amplificação do genoma do HPV, que depende da expressão dos genes E6 e E7. A montagem das partículas virais ocorre na camada média e superior do epitélio cervical, e nessa fase há o aumento da expressão dos genes virais E1, E2, E4 e E5. Na fase final, os genes L1 e L2 codificam as proteínas do capsídeo viral e são expressos nas camadas epiteliais superiores que possuem

maior expressão do gene E4, importante para alteração da matriz intracelular, maturação e replicação viral. As partículas virais são liberadas quando as células infectadas pelo vírus alcançam as camadas superiores do epitélio. A organização do ciclo celular e a expressão dos genes virais na infecção produtiva é semelhante para os diferentes tipos de HPV (Doorbar, 2005; Ferraz et al., 2012; Snijders *et al.*, 2006;).

Para o desenvolvimento de lesões e câncer cervical é necessário que haja a perda da regulação do ciclo reprodutivo do HPV. As proteínas E6 e E7 são cruciais para a indução e manutenção da transformação celular por atuarem na regulação do ciclo celular e apoptose (Doorbar, 2005; Narisawa-Saito e Kiyono, 2007; Lee *et al.*, 2016). No processo de integração do genoma viral há uma perda dos genes E2 e E4 responsáveis pela transcrição de outros genes. Essa perda da função de E2 leva a desregulação da expressão de E6 e E7 que inibem as proteínas supressoras tumorais p53 e proteína do retinoblastoma (pRB). Essa inibição ocasiona em instabilidade genômica e imortalização celular contribuindo assim para malignidade (Figura 3) (Snijders *et al.*, 2006; Moody e Laimins, 2010).

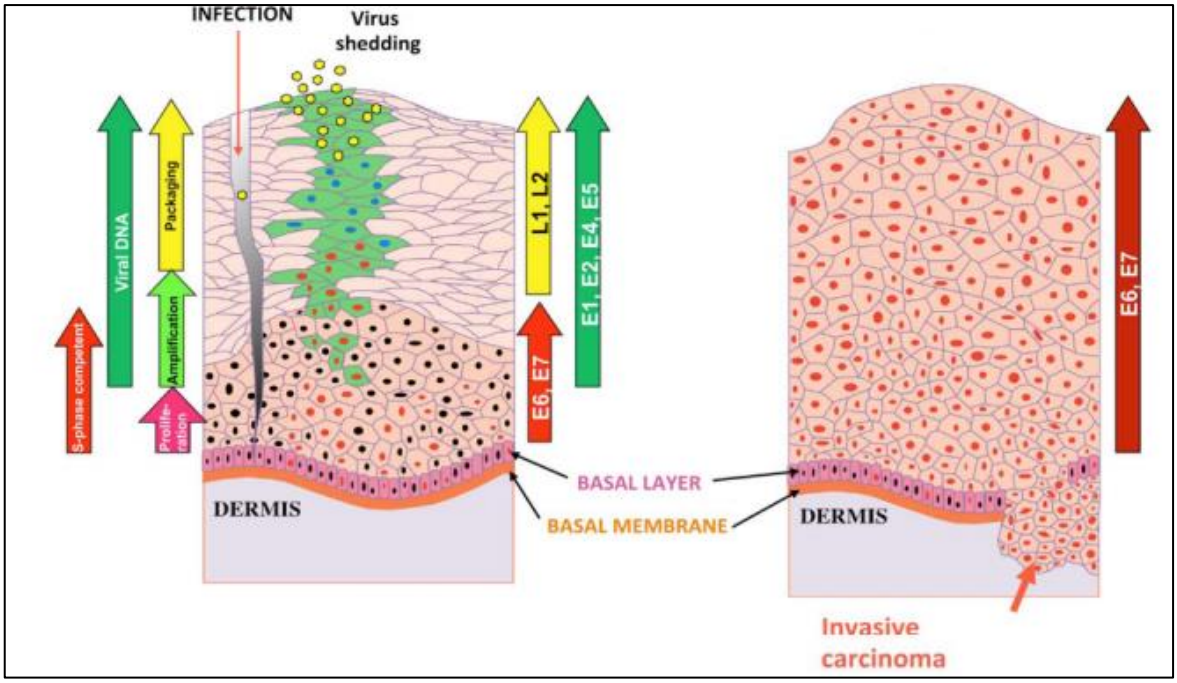

Figura 3. Ciclo infeccioso do HPV de alto risco. Do lado esquerdo há representação do ciclo de vida produtivo. O lado esquerdo representa o ciclo de transformação. O lado direito representa a malignidade induzida pelo HPV, onde há a desregulação da produção das oncoproteína E6 e E7. Fonte de: Xue *et al*., 2014.

Assim, o desenvolvimento do câncer do colo do útero requer a infecção e persistência do HPV de alto risco oncogênico no epitélio cervical, que causará um processo carcinogênico de múltiplas etapas envolvendo alterações moleculares e morfológicas relacionadas às neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC) e ao carcinoma cervical invasor (Franco *et al*.,1999; Doorbar, 2004).

Por ser uma doença de progressão lenta, as lesões cervicais precursoras do câncer do colo do útero, podem ser diagnosticadas precocemente através de métodos citológicos (exame de Papanicolaou), colposcópicos e histológicos utilizados no programa de rastreamento no controle do câncer de colo do útero (INCA, 2016). As lesões cervicais pré-neoplásicas foram classificadas histologicamente por Richart (1973) como NIC e graduadas de acordo com o nível de comprometimento epitelial em NIC1, NIC2 e NIC3. As lesões precursoras são classificadas citologicamente como Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau (LIEAG) ou Baixo Grau (LIEBG) (Nayar e Wilbur, 2015) (Figura 4).

O carcinoma cervical, é ainda subdividido em carcinoma de células escamosas (CCE), se acometer o epitélio escamoso, ou adenocarcinoma endocervical, se o comprometimento for do epitélio glandular da endocérvice (Richart, 1973; WHO, 2014).

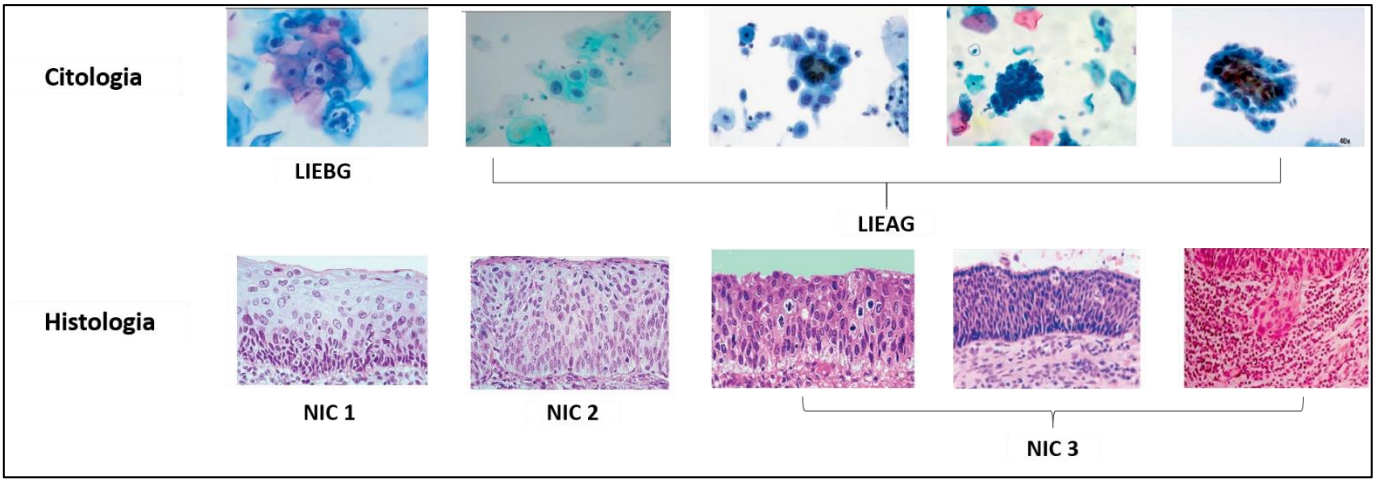

Figura 4: Citologia e Histologia das lesões cervicais associadas ao HPV. Modificado de: Cubie, 2013.

No Brasil, o exame de citologia oncológica (CO), ou exame de Papanicolaou, é o exame preconizado como teste de rastreamento do câncer do colo do útero e deve ser realizado anualmente por mulheres na faixa etária de 25 a 64 anos que já iniciaram a vida sexual (INCA,2018). A mulher que apresentar dois exames anuais de CO consecutivos negativos podem aumentar a periodicidade do exame de CO, passando a realizá-lo num intervalo de 3 anos. Mulheres com alterações no exame citológico recebem condutas de acordo com o grau da lesão identificada. Em caso de lesões limítrofes sugerindo baixo grau ou LIEBG, a mulher é acompanhada pela CO em intervalo menor de tempo e é encaminhada para colposcopia em caso de persistência ou agravamento das lesões. Se lesões limítrofes sugerindo alto grau ou LIEAG forem identificadas, a mulher deve ser encaminhada para colposcopia e biópsia em caso de imagens suspeitas. A biópsia cervical guiada pela colposcopia definirá as condutas terapêuticas específicas (INCA, 2016). Uma outra medida de prevenção adotada pelo Ministério da Saúde em 2014 foi a vacina quadrivalente, que protege contra os HPV de baixo risco (tipos 6 e 11) e HPV de alto risco (tipos 16 e 18), tendo como público-alvo meninas na faixa etária de 9 a 14 anos e meninos de 11 a 14 anos (Ministério da Saúde, 2017). Os exames de rastreio do câncer de colo útero juntamente com a vacinação possuem o objetivo de minimizar a incidência

dessa doença, que é a terceira mais frequente e a quarta causa de mortalidade por câncer entre as mulheres no Brasil (INCA, 2017).

A sensibilidade média do esfregaço convencional em detectar NIC de 51% e sua especificidade média é de 98% (De Pokomandy *et al*., 2011). Com o propósito de aumentar a sensibilidade dos testes de rastreio do câncer do colo do útero e minimizar algumas falhas da citologia convencional, a citologia em base líquida (CBL) foi aprovada pelo US Food and Drug Administration (FDA) em 1996. Ainda, há a possibilidade da utilização do remanescente da amostra para a realização de testes citoquímicos e moleculares, que quando aplicados, aumentam a sensibilidade da detecção de lesões pré-cancerosas (Campagnoli *et al.*, 2005; Stabile *et al.*, 2012). O uso do teste do HPV oncogênico tem sido proposto como teste complementar pela Sociedade Americana de Colposcopia e Patologia (ASCCP), porém o uso dessa ferramenta não está disponível no SUS (INCA, 2016). Provavelmente, o teste de HPV venha se tornar uma ferramenta para o rastreamento de câncer do colo do útero em vários países, juntamente com outros marcadores. Vários biomarcadores têm sido propostos desde a infecção pelo HPV até a progressão do carcinoma e podem vir a ser utilizados para decisão de conduta médica e prognóstico dos pacientes (Litjens *et al*., 2013; Pepe *et al*., 2008).

Embora a prevalência de infecção por HPV seja alta, podendo alcançar taxas de 55% na população brasileira com faixa etária entrte de 16 a 25 anos (Associação Hospitalar Moinhos de Vento, 2017), a evolução desta infecção e de suas lesões neoplásicas associadas pode variar muito, já que a maioria sofre regressão espontânea da infecção e apenas uma pequena parcela das mulheres infectadas podem apresentar evolução das lesões precursoras para o carcinoma cervical (Ostör, 1993; Franco *et al.*, 1999; Discacciati *et al.*, 2011). Pode levar em média de 12 a 15 anos entre a infecção persistente pelo HPV de alto risco e o estabelecimento das lesões pré-cancerosas, as quais podem progredir para o carcinoma cervical (Snijders *et al.*, 2006).

Além da persistência do HPV, existem outros cofatores que podem influenciar no desenvolvimento do câncer do colo do útero como: tabagismo, múltiplos parceiros, idade precoce do início da atividade sexual, uso de contraceptivos hormonais orais, multiparidade, presença de infecções concomitantes (HIV, *Chlamydia trachomatis*, HSV2), além de fatores genéticos e imunológicos. Quanto aos fatores relacionados ao HPV, podemos citar: infecções por múltiplos genótipos, variantes do HPV, carga e

integração viral (Walboomers *et al.*, 1999; Bosch e Muñoz, 2002; Muñoz *et al.*, 2006; Discacciati *et al.*, 2015).

A capacidade do HPV de evadir da resposta imune local é um fator crucial que pode determinar se a infecção e as lesões associadas evoluirão para carcinoma cervical. Isso pode acontecer por diversos mecanismos que vão desde a produção de algumas citocinas inibitórias da resposta imune celular até o aporte local de neutrófilos e macrófagos com fenótipo imunossupressivo (Kobayashi *et al.*, 2008; Stanley, 2012; Alvarez *et al.*, 2017).

Tais mecanismos parecem envolver também alterações metabólicas em células epiteliais e células imunes presentes no microambiente cervical infectado pelo HPV, dos quais podemos considerar o catabolismo do triptofano (Trp), que sabidamente cria um ambiente tolerogênico importante para supressão da resposta imune tumoral em vários tipos de cânceres (Platten *et al.*, 2012; Munn e Mellor, 2013). A principal via de metabolização do triptofano é a via as quinureninas (QUIN), na qual o Trp é oxidado à *N*-formil-quinurenina, com subsequente deformilação à QUIN (Figura 5). Participam desta conversão as enzimas triptofano 2,3-dioxigenase (TDO) e indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO). TDO ocorre prioritariamente no fígado, onde é expressa de forma constitutiva e é responsável pela maior parte da metabolização do Trp (Pilotte *et al.*, 2012; Platten *et al.*, 2012). Já a família da IDO inclui IDO-1 e IDO-2, sendo a primeira a enzima imunorreguladora mais estudada (De Jong *et al.*, 2009; Löb *et al.*, 2009). A IDO é uma enzima induzida por IFN- γ e é principalmente expressa em células do sistema imune como: macrófagos, células dendríticas, células epiteliais e endotélio vascular (Löb *et al.*, 2009).

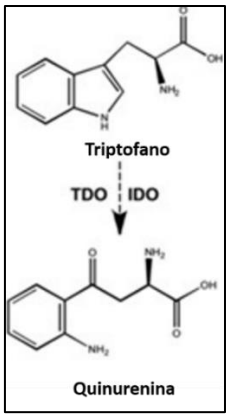

Figura 5: Primeira etapa da via das quinureninas (Via QUIN) do metabolismo do Trp. Modificado de: (Fazio *et al.*, 2015).

A IDO e o catabolismo do Trp estão relacionadas com a tolerância imunológica periférica. A tolerância imunológica é um processo fisiológico que inclui um conjunto de mecanismos complexos que controlam a ativação do sistema imune, impedindo a resposta contra antígenos próprios, danos ao hospedeiro e autoimunidade (Romagnani, 2006). A mudança de um ambiente imunogênico para tolerogênico pela IDO envolve o "cross-talking" de células apresentadoras de antígeno (APC), linfócitos T efetores (Teff) e células T regulatórias (Tregs), onde há indução de Tregs, que por sua vez inibem a proliferação de células T efetoras, indução de fenótipo imunossupressivo em macrófagos e células dendríticas; mudança no perfil citocinas inflamatórias (ex: IL-12) para citocinas inibitórias (IL-10 e TGF-β) (Munn e Mellor, 2016).

Uma maior expressão de IDO foi observada também nas principais infecções virais humanas, como o HIV, vírus da hepatite B (HBV), vírus da hepatite C (HCV) e nas infecções bacterianas, como na tuberculose causada por micobactérias, pneumonia adquirida na comunidade e infecções por *Chlamydophila pneumoniae* e *Chlamydia trachomatis*. A função desta elevação da expressão de IDO pode ser devido tanto a mecanismos anti-patógenos quanto imunossupressivos (Figura 6) (Shmidt e Schultze, 2014). Já foi demonstrado, por exemplo, que alguns patógenos podem se privilegiar dos efeitos imunossupressores da IDO e promover seu ciclo de vida, como a *Escherichia coli* uropatogênica, que induz IDO nas células epiteliais do trato urinário e em leucócitos, permitindo atenuação da resposta imune e promovendo a colonização e estabelecimento de infecção urinária (Loughman e Hunstad, 2012).

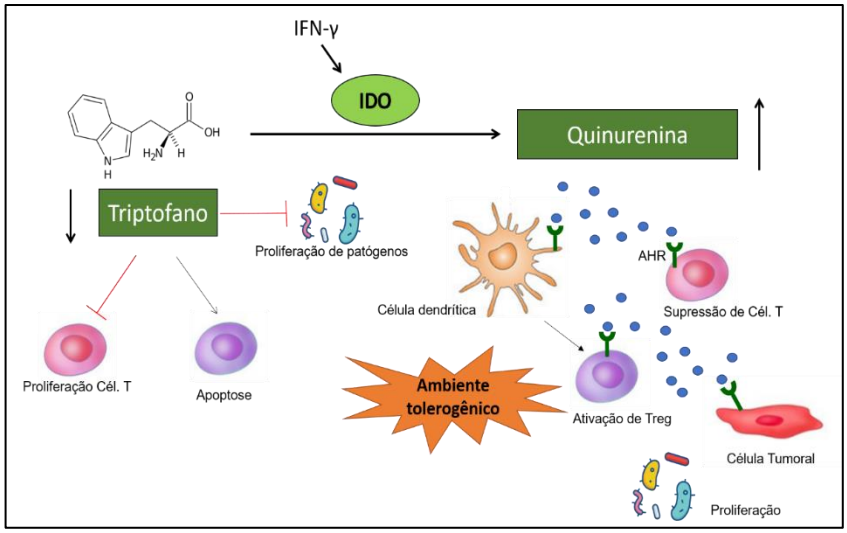

Figura 6: Efeitos da enzima IDO. A IDO modifica a concentração dos estoques intra e extracelulares de Trp e QUIN causando efeitos antiproliferativos e imunossupressores.

A indução de IDO em tumores leva a diminuição de Trp e formação de QUIN criando um microambiente favorável ao imunoescape e à progressão tumoral (Munn e Mellor, 2016). A IDO está expressa constitutivamente em diversos tumores humanos (Uyttenhove *et al.*, 2003). O aumento de sua expressão tem sido associado como marcador de mal prognóstico, em pacientes com câncer pancreático (Zhang *et al.*, 2017), leucemia mielóide aguda (Folgiero *et al.*, 2014), câncer de mama (Wei *et al.*, 2018), câncer de ovário (Okamoto *et al.*, 2005), e câncer colorretal (Brandacher *et al.*, 2006).

Apesar da TDO catalizar a mesma reação de oxidação do Trp que a IDO, o fato dela ser constitutiva no fígado e ter uma função clara na síntese final de nicotinamida fez com que estudos da participação de TDO em tumores acontecessem só mais recentemente. Neste sentido, alguns estudos tem mostrado que tumores expressam TDO, tais como: glioblastoma, carcinoma colorretal, carcinoma de cabeça e pescoço e carcinoma de vesícula biliar (van Baren and Van den Eynde, 2015). A expressão de TDO em tumores poderia indicar sua participação em processos que levam à alteração das respostas imunes antitumorais e promoção da sobrevivência e motilidade das células tumorais (Pilotte et al., 2012; Pantouris & Mowat, 2014).

No contexto da carcinogênese do colo do útero associada à infecção por HPV, a indução da enzima IDO na pele expressando a oncoproteína E7 do HPV 16 parece contribuir para imunossupressão local (Mittal *et al.*, 2013). Nesse mesmo estudo foi observado maior expressão de IDO-1 e IFN-γ no epitélio cervical de mulheres com NIC 2 e NIC3 associado ao HPV. Em outro estudo foi observado o aumento da razão QUIN/Trp em mulheres com carcinoma cervical quando comparado a mulheres com a cérvice normal (Hascitha *et al.*, 2016). Também já foi relatada uma expressão difusa de IDO em biópsias de carcinoma cervical quando comparado com a cérvix normal ou NIC de alto grau, bem como IDO foi encontrada em células dendríticas (DCs) imaturas no infiltrado estromal (Nakamura *et al.*, 2007; Kobayashi *et al.*, 2008). Em co-culturas, a regulação negativa de IDO em linhagens celulares de câncer cervical ativa células NK, mostrando que IDO pode ser um alvo-terapêutico para o câncer cervical (Sato *et al.*, 2012). Além disso, estudos clínicos têm demonstrado uma relação entre a maior atividade de IDO e pior prognóstico de pacientes com carcinoma cervical (Inaba *et al.*, 2010; Fotopoulou *et al.*, 2011; Ferns *et al.*, 2015).

Os estudos supracitados, apesar de fornecerem informações importantes sobre o possível papel de IDO na carcinogênese cervical, possuem limitações que deixam lacunas que ainda não foram abordadas adequadamente. Além da escassez de informação sobre a expressão de IDO no epitélio normal, tais estudos apresentam pequeno tamanho amostral, carência de comparações e quantificação da expressão de IDO em relação aos diferentes graus de lesão, considerando também a influência de outras infecções genitais sobre a expressão de IDO em mulheres com HPV e a influência do tipo de HPV sobre a expressão de IDO.

Em nosso estudo contamos com dois tipos de amostras para avaliação de IDO, a CBL, que é um método de coleta não invasivo que possibilitou a análise de IDO em mulheres com epitélio normal, além disso permitiu a quantificação das células expressando IDO e a determinação dos tipos de HPV na mesma amostra na qual foi realizado o diagnóstico citológico. Também utilizamos biópsias cervicais para avaliação tanto de IDO quanto TDO, até onde sabemos este último ainda não foi investigado carcinogênese cervical. A avaliação em biópsias permitiu-nos a avaliação do padrão histológico geral da expressão de IDO e TDO, evidenciando as estruturas teciduais que mais expressam essas enzimas.

Assim, nesta dissertação investigamos a expressão de IDO em cérvice normal, na VB e em infecções genitais. Investigamos também a expressão de IDO e TDO em mulheres com infecção por HPV associada ou não às lesões intraepiteliais cervicais ou carcinoma cervical.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a relação de IDO com a presença de infeções genitais e vaginose bacteriana e avaliar a expressão de IDO e TDO em amostras cervicais de mulheres com epitélio cervical normal e com diferentes graus de NIC e carcinoma cervical**.**

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a expressão proteica de IDO em amostras cervicovaginais de mulheres com e sem vaginose bacteriana e infecções genitais como: *Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, Treponema pallidum,* vírus *Herpes do tipo I/II, Trichomonas vaginalis, Actinomyces* sp*, Candida* sp, comparando-as com mulheres com epitélio cervicovaginal normal.

2. Avaliar a expressão proteica de IDO e TDO em amostras cervicais de mulheres com infecção por HPV associada ou não à lesões cervicais tais como LIEBG, LIEAG e carcinoma de células escamosas, comparando-as às mulheres com epitélio cervicovaginal normal.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Casuísticas e Aspectos Éticos

Durante o período de Agosto de 2013 a Agosto de 2014, neste estudo transversal foram incluídas 165 mulheres atendidas no Hospital da Mulher (CAISM) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), que foram recrutadas no projeto anterior realizado por Discacciati *et al*., (2015). Destas mulheres, 42 foram submetidas à excisão da zona de transformação com alça larga (LLETZ) devido a anormalidades citológicas de alto grau encontradas no exame citopatológico, e confirmado o diagnóstico histológico de NIC 1, NIC 2, NIC 3, ou Carcinoma de Células Escamosas (CCE). Essas mulheres foram selecionadas para o grupo caso, já o grupo controle grupo controle foi composto por 123 mulheres que apresentaram pelo menos dois resultados negativos consecutivos de Papanicolaou (um no dia da inclusão e outro no ano anterior).

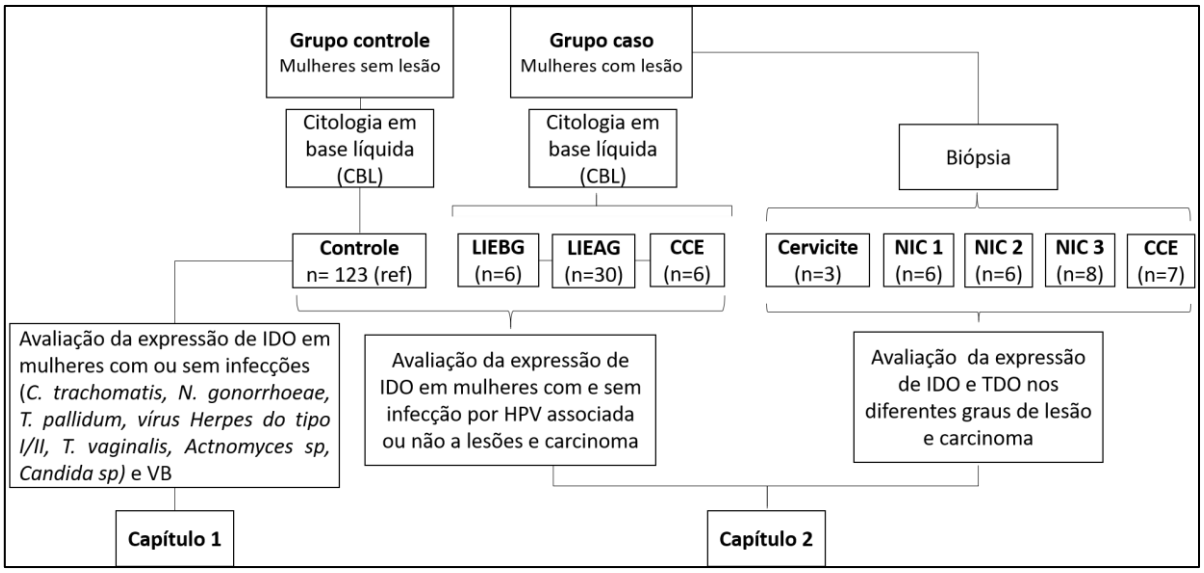

Figura 7: Fluxograma de divisão da casuística dos estudos.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (ref. 411.692 / 2013 e ref. 1.862.243/016).

Como critério de exclusão, consideramos gravidez, HIV, doenças crônicas que enfraquecem o sistema imune, uso de drogas imunossupressoras, mulheres que passaram por cirugias prévias no colo do útero e incapacidade cognitiva de ler e compreender o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Após a assinatura do TCLE, as mulheres foram submetidas a um exame especular para coleta de amostras cervicais, as quais foram preservadas em meio líquido Surepath® e salina estéril. Também foi coletado um esfregaço cervical para realizar o diagnóstico microbiológico por bacterioscopia corada pelo GRAM. As amostras foram enviadas para o Laboratório de Citopatologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (USP), onde foram realizados os exames pela citopatologista Dra. Michelle Garcia Discacciati.

3.2 Diagnóstico Morfológico das lesões cervicais

Para o diagnóstico citológico foi utlizada a classificação de Bethesda 2014. As biópsias obtidas por LLETZ foram avaliadas de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) e classificadas em NIC 1, NIC 2, NIC 3 ou CCE. Não foram detectados casos de adenocarcinoma. O diagnóstico histológico das biópsias obtidas por LLETZ foram classificadas de acordo com a Classificação Internacional dos tumores da OMS de 2014 (Kurman *et al*., 2014). Para fins de análises estatísticas, os grupos de mulheres foram definidos de acordo com a nomenclatura citológica.

3.3 Citologia em Base Líquida (CBL)

Foram colhidas amostra da ectocérvice e endocérvice, utilizando uma escova especial do kit Surepath® (BD), a qual foi utilizada para a citologia em base líquida (CBL). Para preparar as lâminas de CBL, 8 mL da amostra cervical contida no frasco Surepath® foram centrifugados e a este volume foram adicionados 4 mL de tampão de gradiente. As amostras foram centrifugadas duas vezes, sendo a primeira centrifugação a 1500 rpm por 2 minutos e a segunda centrifugação a 2.900 rpm por 10 minutos, descartando-se o sobrenadante. O sedimento celular resultante foi ressuspenso em 2 mL de Surepath®. Foi aspirado 150 µL dessas amostras para preparar as lâminas, usando um delimitador de campo. Estas lâminas foram usadas para realização da imunocitoquímica a fim de determinar a expressão de IDO. O restante do pellet ressuspenso foi usado para extrair o DNA para a genotipagem do HPV.

3.4 Imunocitoquímica e Imunohistoquímica

A avaliação da expressão de IDO por imunocitoquímica foi realizada em lâminas de CBL do grupo caso e controle. Em algumas biópsias das mulheres do grupo caso foram avaliadas a expressão de IDO e TDO por imunohistoquímica. Como controle positivo da reação de imunocitoquímica para IDO utilizamos linhagem celular de SiHa e SK-Mel 147 estimuladas com interferon-γ, por expressarem IDO (Figura 8). Para o controle das imunohistoquímicas utilizamos cortes de placenta. O controle negativo foi feito nestas amostras com incubação sem o anticorpo primário.

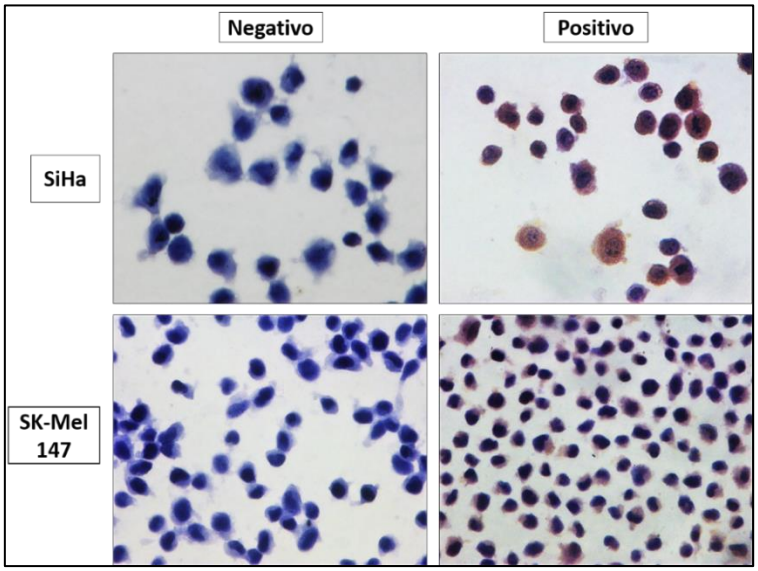

Figura 8: Controles utilizados para a reação de Imunocitoquímica. Linhagem melanoma (SK-Mel 147) e células tumorais cervicais imortalizadas com HPV-16 (SiHa).

As reações de imunocitoquímica foram realizadas da seguinte forma: foi realizada a recuperação antigênica por aquecimento (micro-ondas) 1 vez por 3 minutos utilizando citrato de sódio pH 6,0. O anticorpo primário utilizado foi anti- IDO (ab55305, Abcam, Cambridge, UK) na diluição de 1: 150. A incubação com o anticorpo primário foi realizada durante 2 horas em câmara úmida fechada na estufa a 37ºC. A incubação com o anticorpo secundário e revelação com DAB foi realizado utilizando o kit Dako EnVision + System-HRP (DAB) (K4007/DAKOCytomation, CA, USA). Após a reação de imunohistoquímica, procedeu-se a contracoloração com Hematoxilina.

Para as biópsias incluídas em parafina foi realizada a técnica de imunohistoquímica, adicionando uma etapa prévia de desparafinização na estufa à 60ºC overnight. A recuperação antigênica foi realizada 1 vez por 5 minutos utilizando Tris/ EDTA (pH 9,0) 1 vez por 5 minutos no micro-ondas, seguido de bloqueio com albumina do soro bovino (BSA) 2% em câmara úmida semi-aberta, após foi realizada a incubação do anticorpo primário anti- IDO (ab55305, Abcam, Cambridge, UK) e anti- TDO (ab84926, Abcam, Cambridge, UK) na diluição de 1:150. A incubação foi realizada na estufa à 37º C durante 1 hora em câmara úmida fechada. A incubação com o anticorpo secundário e revelação com DAB foi feita utilizando o kit Envision Flex, High pH (Link), HRP (K8000/ Dako, Glostrup, Dinamarca). Após a reação de imunohistoquímica, procedeu-se e contracoloração com Hematoxilina.

3.5 Critério para leitura e interpretação da imunocitoquímica para IDO na citologia em base líquida

Para a realização das leituras das lâminas de imunocitoquímica, adaptamos os critérios de leitura de Li *et al* (2012); considerando-se: score 1, até 25% de células epiteliais marcadas; score 2, 26 a 50% de células escamosas marcadas; score 3, 51 a 75% de células marcadas; score 4, mais de 75% de células marcadas.

Consideramos como marcação positiva a observação de coloração amarelada ou castanha no citoplasma. Nas mulheres do grupo caso contamos as células escamosas displásicas marcadas, enquanto que nas mulheres do grupo controle a contagem foi feita em células escamosas marcadas.

Para contagem foram escolhidos campos representativos e foram contadas 100 células a um aumento de 400x. A leitura foi repetida na mesma lâmina, em campos diferentes. Se as contagens realizadas fossem diferentes a ponto de alterar o escore, uma terceira contagem foi realizada. Essa leitura foi repetida por um segundo observador e em caso de discordância na leitura de dois escores entre os observadores (Paloma Almeida Venancio e Dra.Michelle Garcia Discacciati, um terceiro observador realizou a leitura da lâmina, para chegar a um consenso (Dra. Silvya Stuchi). Os escores obtidos de acordo com os critérios mencionados acima foram dicotomizados da seguinte maneira:

1) escores 1 e 2: expressão negativa ou leve;

2) escores 3 e 4: expressão moderada ou acentuada.

Para a contagem de leucócitos, usamos os mesmos critérios e essa contagem foi possível em 56 lâminas de CBL que possuiam leucócitos em número suficiente para contagem. Os leucócitos foram identificados pela sua morfologia, sendo os mais abundantes polimorfonucleares. Os neutrófilos foram os leucócitos mais comumente encontrados nas amostras cervicais, seguidos pelos macrófagos (histiócitos).

3.6 Imunohistoquímica para IDO em culturas organotípicas de queratinócitos

As culturas organotípicas foram desenvolvidas utilizando queratinócitos de prepúcio humano neonatal (HFK) transduzidas por pLXSN e E6/E7 do HPV16, conforme descrito previamente por (Boccardo *et al.*, 2004) e doadas por Prof. Dr. Enrique Boccardo para realização desse teste.

Realizamos a imunohistoquímica conforme descrito acima para biópsias clínicas. A diluição utilizada para o anticorpo primário anti-IDO (ab55305, Abcam, Cambridge, UK) foi 1:500. A incubação com o anticorpo secundário e a revelação com DAB foi realizada utilizando o kit Envision Flex, High pH (Link), HRP (K8000/ Dako, Glostrup, Denmark).

3.7 Genotipagem do HPV

O DNA foi extraído das amostras cervicovaginais coletadas no Surepath®, utilizando uma alíquota de 200µL do sedimento obtido após o processo de centrifugação realizado no processamento da citologia em base líquida.

Para a genotipagem do HPV, foi usado o kit de HPV Linear Array Genotyping (Roche Molecular Systems Inc., Pleasanton, CA, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante. Este teste utiliza a amplificação do DNA alvo por meio de uma reação da cadeia de polimerase (PCR) e a hibridização de ácidos nucleicos, detectando 37 tipos de HPV de baixo e alto risco: HPVs 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, IS39 e CP6108. Sete amostras que tiveram controles internos inadequados (β-globina) foram excluídos da genotipagem do HPV.

3.8 PCR multiplex para o diagnóstico de 7 infecções genitais

A técnica de PCR multiplex foi realizada em amostras endocervicais para o diagnóstico simultâneo de sete infecções genitais: *Chlamydia trachomatis*, Herpes vírus simplex 1 e 2 (HSV1 e HSV2), *Neisseria gonorrhoeae, Mycoplasma hominis, Trichomonas vaginalis e Treponema pallidum*, de acordo com um método previamente padronizado e validado por Souza *et al*., 2013. Esse teste foi realizado no Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Estadual de Maringá (UEM), no Paraná, Brasil.

3.9 Bacterioscopia (Coloração de GRAM)

A bacterioscopia vaginal e o diagnóstico de vaginose bacteriana foram realizados com base na técnica de coloração pelo GRAM, segundo o escore de Nugent (1991). Por meio desta técnica GRAM, os diagnósticos de *Candida* sp e *Actinomyces* sp. também foram realizados.

3.10 Testes estatísticos

Os dados foram avaliados quanto a distribuição das prevalências pelo teste qui-quadrado e exato de Fisher. Para avaliar a magnitude da associação entre a expressão de IDO e lesões cervicais associadas ao HPV, foi realizado uma análise bivariada para estimar a razão de chances ou *Odds ratio* (OR) com intervalo de confiança (IC) de 95%, através do software Epi info versão 7.2.2.2. Para avaliar a magnitude de associação entre IDO em células escamosas e vaginose bacteriana, foi realizado uma regressão logística múltipla para estimar o OR ajustado pelas infecções concomitantes. O nível de significância assumido foi 5% e o software utilizado para a análise múltipla foi o SAS 9.4.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão desta dissertação foram organizados em dois capítulos. No capítulo 1 serão apresentados os resultados e discussão referentes a expressão de IDO em mulheres sem lesão cervical, porém com ou sem a presença de vaginose bacteriana, HPV e infecções genitais concomitantes. No capítulo 2 serão apresentados os resultados e discussão referentes a expresão de IDO e TDO na infecção por HPV e nas lesões cervicais associadas.

Capítulo 1 – Expressão de IDO na cérvice normal na ausência e na presença de vaginose e infecções genitais (*Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, Treponema pallidum,* vírus *Herpes do tipo I/II, Trichomonas vaginalis, Actinomyces* sp*, Candida* sp*).*

Capítulo 2 – Expressão de IDO e TDO na infecção por HPV e lesões cervicais associadas.

<u>Capítulo 1</u> - Expressão de IDO na cérvice normal na ausência e na presença de vaginose e infecções genitais (*Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, Treponema pallidum,* vírus Herpes do tipo I/II, *Trichomonas vaginalis, Actinomyces* sp, *Candida* sp*)*.

Nas 123 mulheres incluídas no grupo controle, a média de idade o foi de 35.8 ± 8,2 anos, com idade mínima de 18 e máxima de 58 anos. Quarenta e uma apresentaram algum tipo de infecção genital sem considerar o HPV. A genotipagem para HPV foi possível para 116 mulheres, já que 7 amostras não possuíam DNA de qualidade para realização do teste. Os dados referentes à frequência de infecções genitais e vaginose bacteriana estão mostrados na **Tabela 1.**

Tabela 1: Frequência de infecções cervicovaginais, vaginose bacteriana e HPV

Microorganismo	N/N total	Frequência
Algum tipo de infecção genital ou disbiose (exceto HPV)*	41/123	33%
Vaginose bacteriana	25/123	20%
Chlamydia trachomatis /Neisseria gonorrhoeae	9/123	7%
Candida sp	4/123	3%
Trichomonas vaginalis	3/123	2%
Actinomyces sp	2/123	2%
HSV1/HSV2	3/123	2%
HPV	22/116*	19%

*** *Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae,* Herpes I/II, *Trichomonas vaginalis, Actinomyces* sp, *Candida* sp *e vaginose bacteriana.***

A Organização Mundial de Saúde estimou, em 2012, 357 milhões de novos episódios das quatro doenças sexualmente transmissíveis (DST) curáveis causadas por: *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Treponema pallidum* e *Trichomonas vaginalis* e também alta prevalência de infecções virais, com estimativa de 417 milhões de pessoas infectadas pelo HSV2 e 291 milhões de mulheres infectadas por HPV (WHO, 2016). Além das infecções mencionadas acima, a vaginose bacteriana é a principal queixa frequente de corrimento vaginal e está associada com complicações ginecológicas e obstétricas (Turovskiy *et al.*, 2011).

Observamos que mulheres com vaginose bacteriana tiveram uma chance pelo menos sete vezes maior de apresentar expressão moderada/acentuada de IDO em células escamosas do que mulheres sem vaginose bacteriana e esta relação foi estatisticamente significativa (OR=7.41; IC 95%= 2.50- 21.74; p<0.0001) (Tabela 2). É importante notar também que cerca de 37% das mulheres sem nenhum tipo de infecção cervicovaginal apresentaram expressão moderada/acentuada de IDO em células escamosas.

Tabela 2: Expressão de IDO em células escamosas de acordo com a presença ou ausência de vaginose bacteriana

	Expressão de IDO em células escamosas			
	Moderada/ Acentuada	**Negativa/ Leve**		
	N (%)	**N (%)**	***OR** (IC 95%)**	**Valor p**
Vaginose bacteriana			**7.41 (2.50-21.74)**	**<0.0001****
Positivo	20 (80)	05 (20)		
Negativo	36 (37)	62 (63)		

* *Odds Ratio* (análise multivariada ajustada pela presença de infecções genitais: *Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, Treponema pallidum,* Herpes I/II, *Trichomonas vaginalis, Actinomyces sp* e *Candida sp*)

**Teste Qui-quadrado

A diferença de intensidade de expressão de IDO entre os casos com e sem vaginose bacteriana está ilustrada na Figura 9, que se referem à imunocitoquímica realizada em lâminas de CBL. Nesta figura podemos observar, nas imagens B1, B2 e B3, a presença de células indicadoras (*clue cells*) e polimorfonucleares com e sem marcação para IDO. Nas imagens A1, A2 e A3, que referem-se à mulheres sem VB, é possível notar uma leve expressão de IDO tanto em células escamosas quanto em alguns leucócitos. Nota-se que há células expressando IDO em mulheres com vaginose bacteriana numa frequência e intensidade maior do que nas mulheres sem vaginose bacteriana.

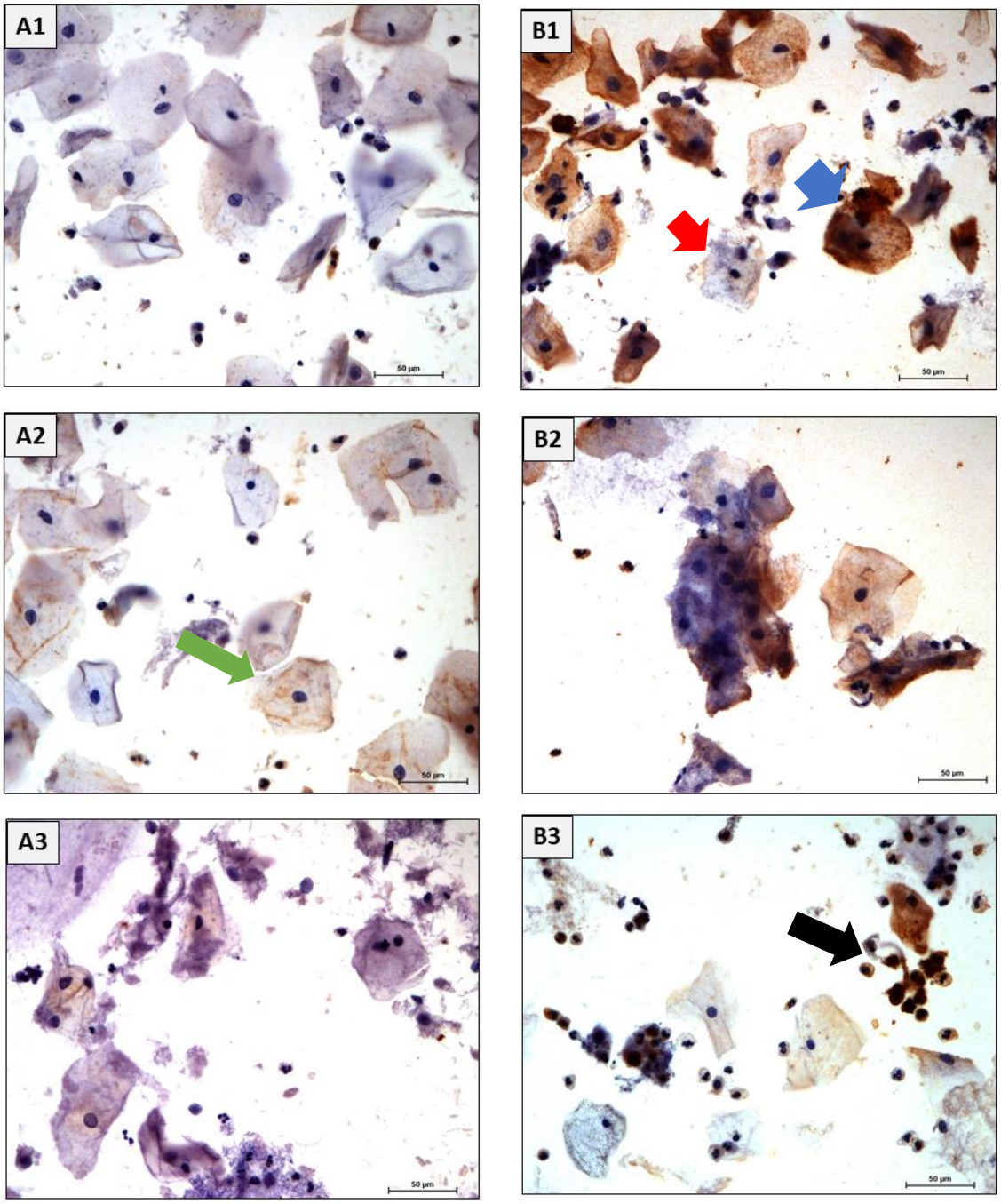

Figura 9: Expressão de IDO em amostras de citologia em base líquida avaliadas por imunocitoquímica. Figura A1, A2 e A3: expressão de IDO em mulheres sem vaginose bacteriana ou infecções genitais. Figura: B1, B2 e B3: expressão de IDO em mulheres com vaginose bacteriana. A seta vermelha indica uma clue-cell, indicadora de VB, sem marcação de IDO, já a azul uma clue-cell com forte marcação de IDO. A seta preta indica marcação moderada/acentuada de IDO em leucócitos polimorfonucleares e a seta verde uma célula escamosa com marcação leve de IDO (Nikon ACT-1 1.200C DXM com zoom óptico 400x).

Nossos dados clínicos sobre a expressão de IDO no epitélio normal sugerem que a microbiota cervicovaginal residente, por si só, parece ser capaz e atuar no equilíbrio imune através da estimulação de alguma resposta imunotolerante. A mucosa cervicovaginal representa uma verdadeira barreira imunoepitelial que protege contra a aquisição de agentes patogênicos, muitos dos quais podem ser adquiridos via relação sexual (Amjadi *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2018). A função desta barreira é altamente dependente da interação microbiota-epitélio e dos mecanismos imunes que visam manter equilíbrio do ecossistema vaginal (Van De Wijgert *et al.*, 2014; Borgdorff *et al.*, 2016; Smith e Ravel, 2017). Porém, para confirmar o que observamos em nossa pesquisa clínica, seriam necessários mais estudos que desvendam os mecanismos da relação microbiota-célula epitelial em nível molecular e bioquímico relacionado a resposta imune

Apesar de suas particularidades, é interessante comparar a mucosa vaginal com outras mucosas. Nestas últimas décadas a mucosa intestinal foi bastante estudada e foi definida uma complexa rede de mecanismos responsáveis pelo balanço entre imunotolerância, manutenção da microbiota e saúde da mucosa epitelial intestinal. Em revisão feita por Gao *et al*. (2018), foi apontado que alterações na microbiota modulam o sistema imune intestinal através do metabolismo do Trp. Considerando as similaridades entre a microbiota intestinal e a cervicovaginal em termos de interação microbiota-epitélio, nosso estudo mostrou dados semelhantes, pois encontramos um aumento de expressão de IDO em mulheres com vaginose bacteriana, que é o principal distúrbio de microbiota vaginal.

A alta taxa na relação entre QUIN/Trp e baixas concentrações de Trp já foram relacionadas com disbioses da microbiota vaginal e infecções por *C. trachomatis* (Ziklo *et al.*, 2018). Por outro lado, outro estudo mostrou uma maior concentração de QUIN em perfis saudáveis de microbiota vaginal em comparação com VB, mostrando que a imunotolerância decorrente do catabolismo do Trp pode também ter efeitos benéficos na manutenção da saúde da microbiota (Vitali *et al.*, 2015). Porém, apesar de termos encontrado alguma expressão de IDO em epitélio normal, mostramos que esta expressão é ainda maior em mulheres com vaginose bacteriana. Isso indica que, em algum momento, a relação simbiótica da microbiota provavelmente se perde e a expressão de IDO passa a ser um fator favorecedor da proliferação bacteriana que leva à vaginose ou aquisição de infecções genitais.

Dos 25 casos de vaginose bacteriana de nossa casuística, encontramos dois casos associado à *N. gonorrhoeae/ C. trachomatis,* um à *Candida* sp e um ao *Actinomyces* sp. Pelo reduzido tamanho amostral não foi possível uma análise multivariada da relação da expressão de IDO com estas infecções. Futuramente, o tamanho amostral pode ser ampliado e esses dados estão apresentados como resultados preliminares (Tabela 3 do Apêndice A). Encontramos que 24% (6/25) das mulheres com vaginose bacteriana tinham infecção por HPV, comparado a 17% (16/91) de mulheres com vaginose bacteriana (p=0,4684, dados não mostrados em tabelas). A relação entre o HPV e a expressão de IDO nestas mulheres será abordada com mais detalhes no capítulo 2.

Estudos mostram que a vaginose bacteriana está relacionada a uma maior frequência de infecções genitais e HPV (Boccardo *et al.*, 2010; King *et al.*, 2011; Jensen *et al.*, 2014; Marconi *et al.*, 2014; Borgdorff *et al.*, 2016). Vários mecanismos já foram propostos para esta associação, tais como: inativação de TLR devido à indução da produção de citocinas anti-inflamatórias por bactérias da vaginose bacteriana (Witkin *et al.*, 2007), alteração do perfil de citocinas (Audirac-Chalifour *et al.*, 2016) e aumento da expressão de mucinas com consequente favorecimento da mucoadesão de patógenos (Moncla *et al.*, 2016). Neste contexto, nós encontramos, de maneira inédita, uma maior expressão de IDO em células escamosas de mulheres com vaginose bacteriana, sugerindo que esta disbiose vaginal está relacionada à indução de um ambiente imunotolerogênico via metabolismo do Trp. Porém, não podemos definir, neste estudo transversal, se a expressão de IDO em mulheres com VB influenciou a maior aquisição de infecções concomitantes.

Tomamos o cuidado de avaliar se havia outra fonte de IDO além das células escamosas. Lavados vaginais de mulheres sem qualquer infecção possuem o predomínio de polimorfonucleares (Giraldo *et al.*, 2012). Mesmo que a VB não esteja associada à um processo inflamatório notável em termos clínicos ou pela bacterioscopia pelo GRAM, foi possível observar que 40% das mulheres com VB apresentaram leucócitos com expressão acentuada de IDO. Sabe-se que neutrófilos e macrófagos estão aumentados em infecções bacterianas como *N. gonorrhoeae* (Ng) e *C. trachomatis (Ct)* (Naglak *et al.*, 2017*;* Ritter e Genco, 2018). Contabilizamos a expressão de IDO em leucócitos em lâminas de CBL satisfatórias para a contagem celular. Aparentemente houve uma maior expressão de IDO em leucócitos presentes apenas nas amostras cervicovaginais de mulheres com endocervicite por *C. trachomatis*/*N. gonorrhoeae,* entretanto o reduzido tamanho

amostral impediu a análise estatística. Estes dados também foram apresentados na Tabela 4 do apêndice B.

Em conclusão, nosso estudo mostrou que existe uma expressão moderada/ acentuada de IDO em células escamosas de mulheres com vaginose bacteriana. A expressão de IDO também existe, embora em menor magnitude, em células escamosas e leucócitos no epitélio de mulheres sem infecção detectável, indicando o possível papel desta enzima na homeostasia cervicovaginal. Nosso trabalho fornece informação sobre a localização de IDO na vaginose bacteriana e contribui para o entendimento do papel da IDO no equilíbrio da relação microbiota-epitélio cervical e seus mecanismos de imunotolerância.

<u>Capítulo 2</u> - Expressão de IDO e TDO na infecção por HPV e lesões cervicais associadas.

Em relação as características clínicas e sociodemográficas das 165 mulheres que compõem nossa população de estudo, dicotomizamos a faixa etária das mulheres em maior ou menor de 50 anos, a idade das mulheres do grupo de estudo foi menor que 50 anos, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupo caso e controle (p=0,1), Isto evidencia que a amostra foi homogênea em relação à idade, etnia e número de gestações. Como esperado, os cofatores associados com risco para lesão cervical foram: tabagismo, início precoce da atividade sexual, menor nível educacional, uso de contraceptivos hormonais e presença de coinfecções genitais (Tabela 5). A infecção pelo HPV foi associada à lesão cervical, sendo o teste de HPV positivo em 95% das mulheres do grupo caso (40/42) e 19% no grupo controle (22/116). Controles internos inadequados (b-globina) foram excluídos da genotipagem do HPV para 7 mulheres no grupo controle.

Encontramos uma frequência maior de mulheres que tiveram a primeira relação sexual com idade inferior a 15 anos no grupo caso (55%), quando comparadas com as mulheres do grupo controle (29%), e houve diferença estatisticamente significativa (p=0.0029). Mulheres do grupo caso apresentaram menor nível de escolaridade (ensino fundamental) quando comparadas com as mulheres do grupo controle (0.0001). Em relação ao uso de contraceptivos, encontramos uma frequência estatisticamente significativa maior de mulheres que usam métodos hormonais no grupo caso, quando comparadas com as mulheres no grupo controle (52% vs. 15%, respectivamente; p= 0.0001). A presença de infecções concomitantes e VB também foram mais prevalentes no grupo caso em relação as mulheres do grupo controle (55% vs. 33%, respectivamente; p=0.0138).

Encontramos 16 tipos diferentes de HPV no grupo caso e 18 no grupo controle. O tipo de HPV mais prevalente no grupo caso foi o HPV 16 (16/42) seguido dos tipos 31 (7/42), 33 (07/42), 52 (5/42), 35 (3/42). Outros tipos de HPV identificados com menor frequência no grupo caso foram: 18, 45, 51, 55, 56, 58, 62, 71, 73, 81, 83. Onze mulheres do grupo de caso foram infectadas com mais de um tipo de HPV. No grupo controle, o tipo mais prevalente de HPV foi também o HPV 16 (6/116), seguido dos tipos 58 (3/116), CP6108 (3/116), 18, 31, 35, 52, 53 e 56 (2/116 para todos). Outros tipos de HPV identificados com menor frequência no grupo caso foram: 6, 11, 61, 62, 66, 68, 70, 71,84. Nove mulheres do grupo controle foram infectadas com mais de um tipo de HPV.

Tabela 5: Características clínicas e sociodemográficas das mulheres incluídas no estudo.

Varíaveis	**Grupo de estudo**		
Característica	**Caso (N=42)**	**Controle (N=123)**	***valor p**
	N (%)	**N (%)**	
Idade (anos)			0.1022
≥ 50	04 (9)	04 (3)	
< 50	38 (91)	119 (97)	
Idade da primeira relação sexual (anos)			**0.0029**
<15 ≥15	23 (55) 19 (45)	36 (29) 87 (71)	
Fumo			**0.0181**
Fumante e ex-fumante	14 (33)	20 (16)	
Não-fumante	28 (67)	103 (84)	
Etnia			0.7329
Negro ou Pardo	11 (26)	29 (24)	
Branco ou Asiático	31 (74)	94 (76)	
Escolaridade			**<0.0001**
Ensino fundamental	29 (69)	42 (34)	
Ensino Médio ou Superior	13 (31)	81 (66)	
Número de gestações			
Nulípara	06 (14)	08 (7)	0.1181
Multípara	36 (86)	115 (93)	
Método contraceptivo			
Hormonal	22 (52)	19 (15)	**<0.0001**
Não-hormonal	20 (48)	104 (85)	
Infecções vaginais concomitantes ou disbiose			
Positivo	23 (55)	41 (33)	**0.0138**
Negativo	19 (45)	82 (67)	
HPV**			
Positivo	40 (95)	22(19)	**<0.0001**
Negativo	02 (5)	94 (81)	

* Teste exato de Fisher
** Em amostras de sete mulheres do grupo controle, não foi possível realizar a genotipagem do HPV porque o controle interno (B-globina) era negativo ou a amostra era insuficiente.

Nosso objetivo foi avaliar a expressão de IDO em células epiteliais e também se essa expressão foi modificada pela presença de lesão cervical ou pela infecção por HPV. Utilizamos amostras colhidas em CBL para análise de imunocitoquímica. Observamos que amostras de ambos os grupos, caso e controle, tiveram expressão de IDO em células epiteliais e leucócitos, mesmo sem a presença de infecção por HPVou outra infecção genital. Em aproximadamente um terço das amostras do grupo controle encontramos expressão moderada/ acentuada de IDO, tanto em células epiteliais quanto em leucócitos.

Para avaliar se a infecção por HPV por si só seria capaz de alterar a expressão de IDO no epitélio cervical sem lesão, analisamos a expressão de IDO em amostras de CBL do grupo controle considerando a presença ou não de infecção por HPV, sendo que neste grupo tínhamos os dados de genotipagem de HPV disponíveis para 116 mulheres. Embora a expressão de IDO em células epiteliais escamosas de mulheres infectadas por HPV (12/22; 54%), tenha sido ligeiramente maior que nas mulheres não infectadas por HPV (40/94; 43%), não houve diferença estatística significativa (p = 0.3086). Já em relação aos leucócitos, observamos um aumento significativo na expressão de IDO em mulheres do grupo controle infectadas por HPV (07/10; 70%) em relação às não infectadas por HPV (09/34; 26%), p= 0.0224. Este resultado sugere que a expressão de IDO em leucócitos pode ter um papel importante no início da infecção por HPV, antes mesmo de ocorrer alterações celulares.

Considerando que a infecção por HPV não alterou de forma significativa a expressão de IDO em células escamosas em mulheres sem lesão cervical, considerou-se a ausência de lesão cervical como grupo controle independentemente do status de HPV. Considerando as mulheres com lesão cervical, houve aumento estatisticamente significante da expressão de IDO em células epiteliais escamosas OR= 4.4 (IC 95%:1.9-9.9; p = 0.0002) em amostras de CBL quando comparadas ao grupo controle, mesmo na ausência de outras infecções genitais concomitantes e para leucócitos houve uma tendência do aumento da expressão de IDO OR= 2.5 (IC 95%:0.95-5.5; p= 0.0598), porém essa associação não foi significativa (Tabelas 6 e 7).

Analisando as lesões cervicais individualmente (LIEBG, LIEAG ou CCE), houve maior frequência de expressão de IDO em células escamosas em todos os graus de lesão cervical quando comparado ao grupo controle, principalmente para LIEBG e LIEAG. Esta associação foi significativamente para o LIEAG, OR= 4,7 (IC 95%: 1.8-12.5); p= 0.0007) (Tabela 6).

Para determinar o efeito direto do HPV na regulação positiva de IDO, investigamos a expressão de IDO em culturas organotípicas epiteliais estabelecidas a partir de queratinócitos humanos primários transduzidos com um vector retroviral que expressa HPV16 E6 / E7 (Figura 10). As culturas quando transfectadas com sequências do HPV 16 apresentam alteração no padrão de diferenciação celular (McCance *et al*., 1998). Observamos que a IDO foi expressa em níveis elevados em culturas que expressam oncogenes do HPV16 em relação ao controle. Essa observação confirma que a regulação positiva de IDO em células epiteliais está associada com a expressão dos oncogenes do HPV.

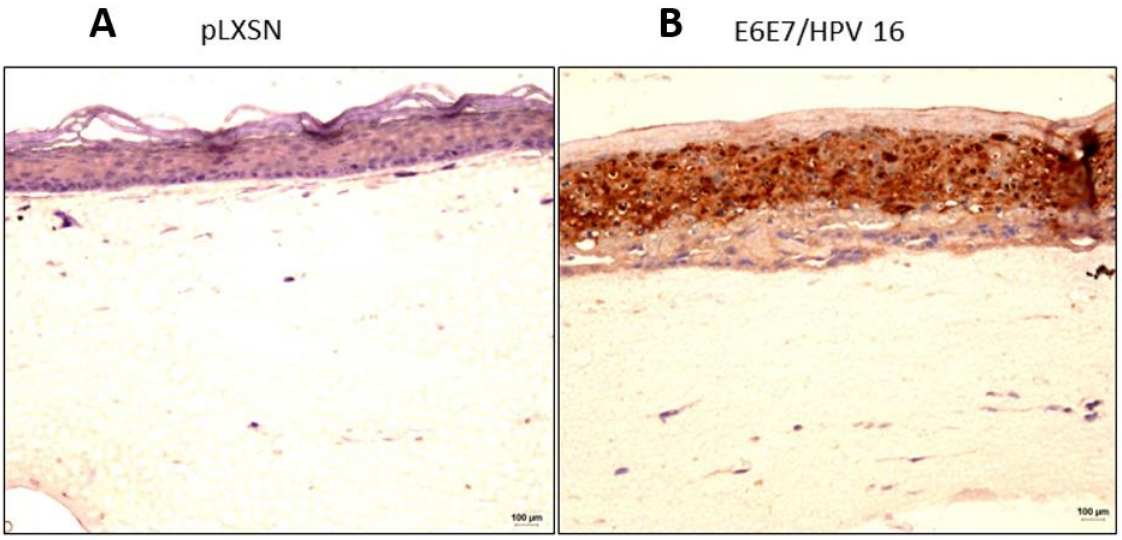

Figura 10: Análise imunohistoquímica da expressão de IDO em culturas organotípicas estabelecidas a partir de queratinócitos humanos primários transduzidos com um vetor retroviral de controle (A) cultura controle; B) A expressão de HPV16 E6 / E7 regula positivamente a expressão de IDO em culturas organotípicas (Nikon ACT-1 1.200C DXM com zoom óptico de 400 x).

O aumento da expressão de IDO em células escamosas acontece em magnitude semelhante para as lesões cervicais associadas ao HPV 16 OR= 5.2 (IC 95%: 1.4- 19.1; p= 0.0080) e para as lesões associadas a outros tipos de HPV OR= 4.5 (IC 95%1.6-12.9; p=0.0032) (Tabela 6)

Tabela 6: Expressão de indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) em células escamosas de acordo com as lesões cervicais, avaliada em CBL.

	Grupo de estudo (Total)					**Grupo de estudo sem infecções * ou vaginose bacteriana**				
	Expressão de IDO nas células escamosas					**Expressão de IDO nas células escamosas**				
	Moderada/ Acentuada	**Negativa/ Leve**				**Moderada/ Acentuada**	**Negativa/ Leve**			
	N (%)	**N (%)**	**N**	**Odds ratio (IC 95%)**	**valor p**	**N (%)**	**N (%)**	**N**	**Odds ratio (IC 95%)**	**valor p**
Controle (Referência)	56 (46)	67 (54)	123	**Ref**		30 (37)	52 (63)	82	**Ref**	
LIEBG/LIEAG/ CCE	33 (79)	09 (21)	42	**4.4 (1.9-9.9)**	0.0002**	14 (74)	05 (26)	19	**4.8 (1.6- 14.8)**	**0.0032 ******
LIEBG	05 (83)	01 (17)	06	5.9 (0.7-52.7)	0.0808***	03 (75)	01 (25)	04	5.2 (0.5-52.2)	0.1554 ***
LIEAG	24 (80)	06 (20)	30	**4.7 (1.8-12.5)**	0.0007**	9 (75)	03 (25)	12	**5.2 (1.3-20.7)**	**0.0245 *****
Carcinoma de células escamosas (CCE)	04 (67)	02 (33)	06	2.4 (0.4 –13.5)	0.4115***	2 (67)	01 (33)	03	3.4 (0.3- 39.9)	0.5535 ***
Lesão cervical com HPV 16	13 (81)	03 (19)	16	**5.2 (1.4-19.1)**	0.0080***	04 (80)	01 (20)	05	6.9 (0.7- 64.9)	0.0740 ***
Lesão cervical com outros tipos de HPV	19 (79)	05 (21)	24	**4.5 (1.6-12.9)**	0.0032**	10 (71)	04 (29)	14	**4.3 (1.2- 15.0)**	**0.0194 *****

* *Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, Treponema pallidum,* Herpes I/II, *Trichomonas vaginalis, Actinomyces sp, Candida sp e vaginose bacteriana.*
** Teste Qui-Quadrado *** Teste exato de Fisher
LIEBG- lesão intraepitelial de baixo grau/ LIEAG- lesão intraepitelial de alto grau/ CCE- carcinoma de células escamosas

Para verificar se a presença de outras infecções poderia influenciar no padrão da expressão de IDO em mulheres com lesão cervical, fizemos uma análise excluindo amostras de pacientes com outras infecções genitais e VB, e continuamos observando associação entre a expressão de IDO em células escamosas (OR= 4.8; IC 95%: 1.6- 14.8; p=0.0032) e leucócitos (OR= 5.2; IC 95%: 1.3- 20.1; p= 0.0137) com a presença de lesões independente de apresentar uma coinfecção (Tabelas 6 e 7).

Observamos uma maior expressão de IDO em leucócitos presentes nas amostas de CBL de mulheres com lesão cervical quando comparadas ao grupo controle, porém esta associação não foi estatisticamente significativa (OR= 2.5; IC 95%: 0.95 -5.5; p=0.0598). Já a expressão de IDO em leucócitos foi significativamente maior em mulheres com lesão cervical associada ao HPV 16 do que no grupo controle (OR= 6.4; IC 95%:1.2- 33.80; p= 0.0323). Por outro lado, essa associação não foi encontrada para os casos de lesão cervical associada com outros tipos de HPV (OR= 1.6; IC 95%: 0.5-5.0; p=0.4115) (Tabela 7).

O padrão representativo referente à intensidade e frequência de células imunocoradas nas lâminas de imunocitoquímica de IDO avaliadas em CBL está apresentado na Figura 11. Essa figura mostra diferentes graus citológicos de lesões cervicais associados ao HPV 16 e aumento da expressão de IDO, principalmente em LIEBG e LIEAG, quando comparado ao controle. De acordo com a morfologia avaliada com detalhes ao microscópico óptico, observamos que os leucócitos marcados eram representados principalmente por polimorfonucleares. Na terceira linha da figura, pode-se evidenciar uma forte marcação de leucócitos.

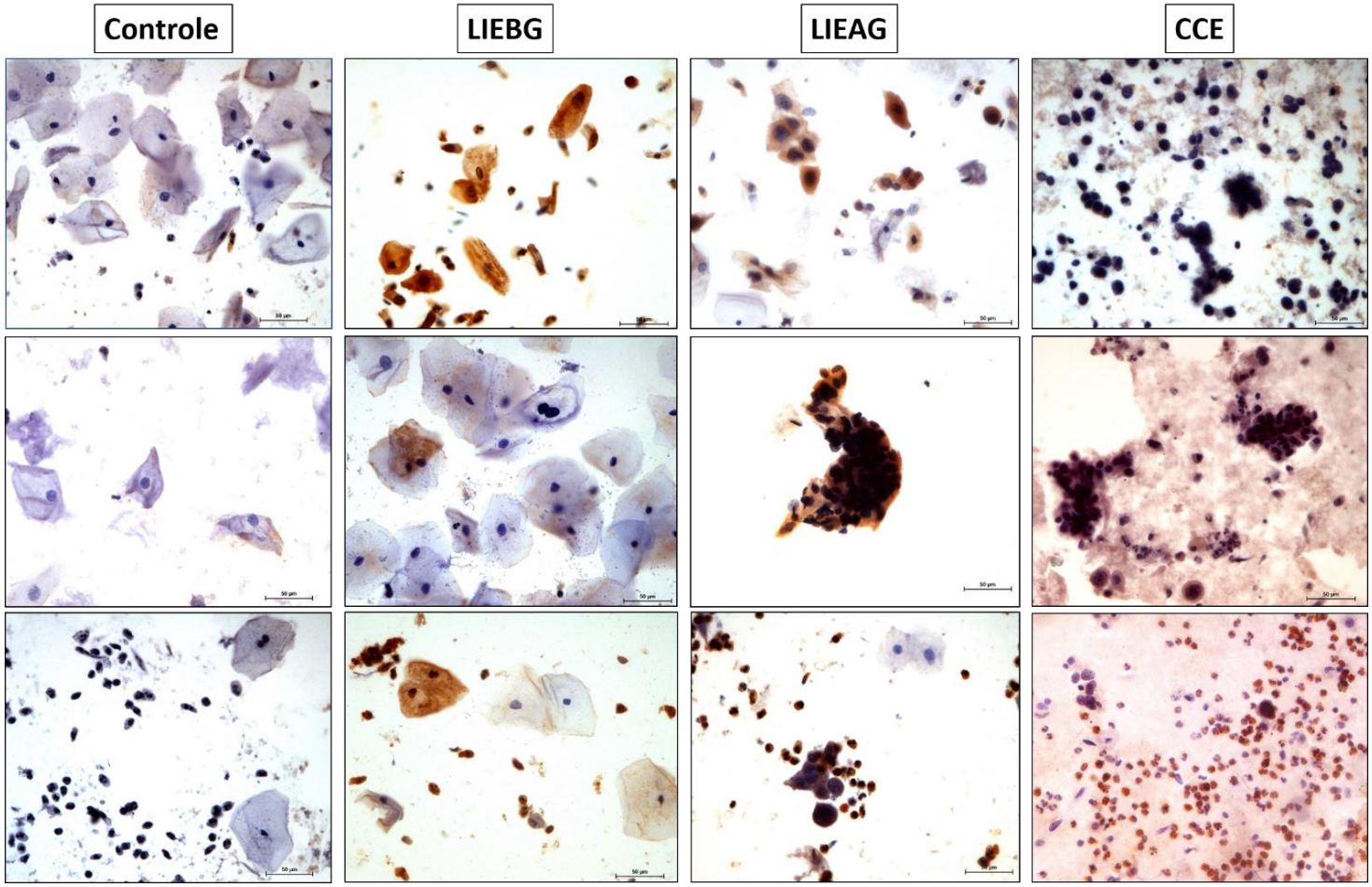

Figura 11: Análise imunohistoquímica representativa da expressão de IDO em células escamosas e leucócitos presentes na CBL : expressão discreta em Papanicolaou normal; expressão acentuada em LIEBG com HPV 16; expressão acentuada em LIEAG com HPV 16; e expressão acentuada em CCE com HPV 16. As duas primeiras linhas da figura mostram imunocoloração em células escamosas, enquanto a última linha mostra imunocoloração em leucócitos (Nikon ACT-1 1.200C DXM com 400 x zoom óptico).

Tabela 7: Expressão de indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) em leucócitos de acordo com as lesões cervicais, avaliada em amostras de CBL.

	Grupo de estudo (Total)					**Grupo de estudo sem infecções * ou vaginose bacteriana**				
	Expressão de IDO em leucócitos					**Expressão de IDO em leucócitos**				
	Moderada/ Acentuada	**Negativa/ Leve**				**Moderada/ Acentuada**	**Negativa/ Leve**			
	N (%)	**N (%)**	**N**	**Odds ratio (IC 95%)**	**Valor P**	**N (%)**	**N (%)**	**N**	**Odds ratio (IC 95%)**	**Valor P**
Controle (Referência)	18(38)	29 (62)	47	**Ref**		8 (26)	23 (74)	31	**Ref**	
LIEBG/LIEAG/ CCE	17 (63)	11 (37)	28	**2.5 (0.9-5.5)**	0.0598**	09 (65)	05 (35)	14	**5.2 (1.3- 20.1)**	**0.0137****
LIEBG	01 (33)	02 (67)	03	0.8 (0.6-9.5)	0.6801***	0 (00)	01 (100)	01	__	1.0000 ***
LIEAG	13 (62)	08 (38)	21	**2.6 (0.9-7.5)**	0.0709**	06(60)	04 (40)	10	**4.3 (0.9-19.3)**	**0.0644*****
Carcinoma de células escamosas (CCE)	03 (100)	01(00)	04	4.8 (0.4 – 50.09)	0.2932***	03 (100)	00 (00)	03	--	0.0275***
Lesão cervical com HPV 16	08 (80)	02 (20)	10	**6.4 (1.2-33.80)**	0.0323***	04 (50)	00 (00)	04	--	**0.0094*****
Lesão cervical com outros tipos de HPV	08 (50)	08 (50)	16	1.6 (0.5—5.0)	0.4115**	05 (50)	05 (50)	10	2.9 (0.6- 12.60)	0.1579**

* *Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, Treponema pallidum,* Herpes I/II, *Trichomonas vaginalis, Actinomyces sp, Candida sp e vaginose bacteriana.*
** Teste Qui-quadrado *** Teste exato de Fisher

Além da CBL, analisamos biópsias cervicais por imunohistoquímica. A coloração de IDO em biópsias cervicais positivas para HPV 16 em diferentes graus de lesão foi comparada com um caso de cervicite, mas positiva para HPV16 (controle) (Figura 12). Novamente, a IDO foi altamente expressa no epitélio alterado, particularmente na NIC 3 e nas camadas superiores da NIC 1 e NIC 2. No caso de cervicite, houve uma leve marcação de IDO no epitélio e também no infiltrado leucocitário presente no estroma próximo ao epitélio. O infiltrado inflamatório na região adjacente à lesão foi fortemente corado para IDO no carcinoma escamoso invasivo. Além disso, a marcação de IDO no endotélio vascular foi evidente.

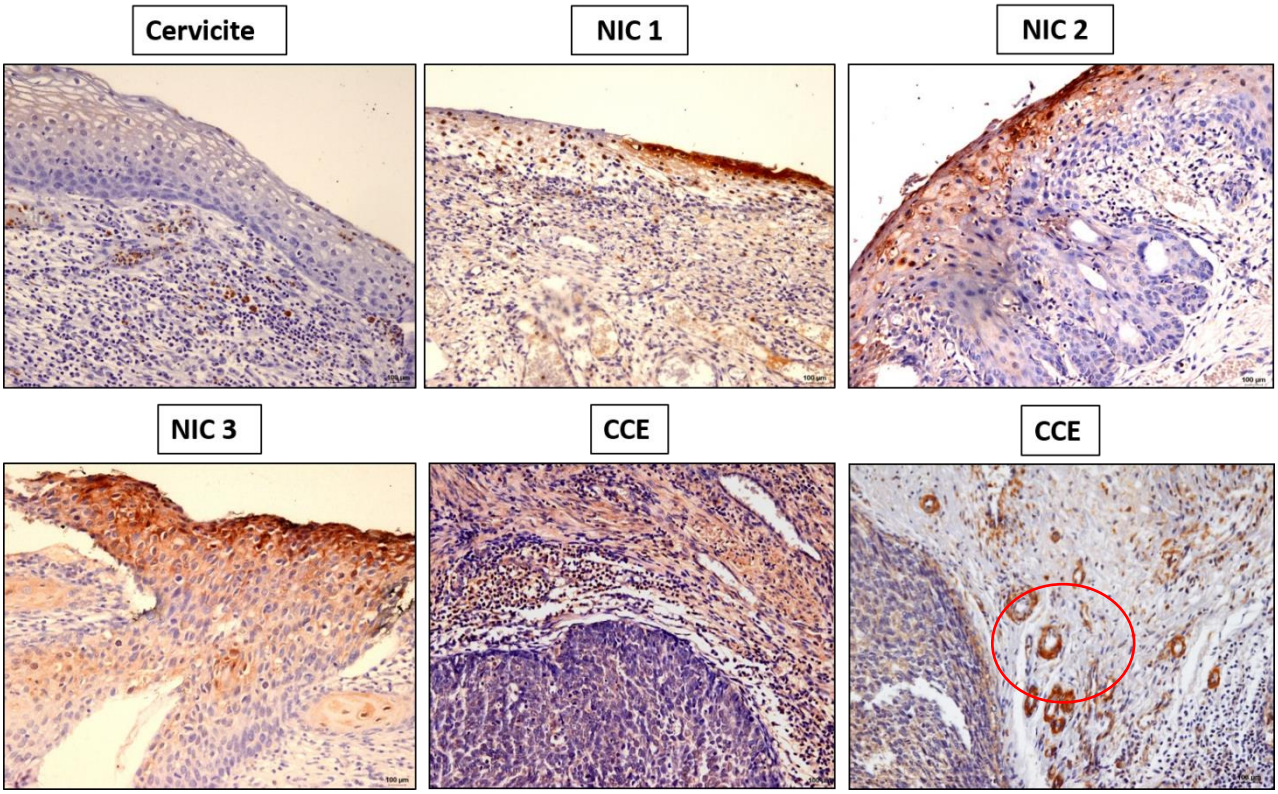

Figura 12. Análise imunohistoquímica da expressão de IDO em biópsias cervicais: expressão leve em cervicite (controle); expressão acentuada em NIC 1 com HPV 16; expressão acentuada em NIC 2 com HPV 16; expressão acentuada em NIC 3 com HPV 16 e expressão moderada em CCE com HPV 16. A primeira figura de CCE mostra marcação de IDO na lesão escamosa e no infiltrado inflamatório presente no estroma adjacente à lesão, e já na segunda figura de CCE mostra detalhes do padrão de expressão de IDO no tecido neoplásico, estroma e na parede do vasos sanguíneos (Nikon ACT-1 1.200C DXM com zoom óptico de 200 x).

Enquanto a expressão de IDO ocorreu em vários tipos celulares, como epitélio alterado, estroma, neutrófilos e parede dos vasos sanguíneos, a expressão de TDO ocorre em leucócitos infiltrados principalmente na área adjacente à lesão, no endotélio e nos leucócitos ao redor dos vasos sanguíneos. Na Figura 13, comparamos o padrão de expressão de IDO e TDO em uma biópsia de uma mesma paciente com NIC 3 e HPV 16 (área sem lesão e com lesão). Nesta figura podemos observar que a marcação de TDO concentra-se principalmente em leucócitos, enquanto a marcação de IDO pode ser vista de maneira mais disseminada no estroma, epitélio e leucócitos.

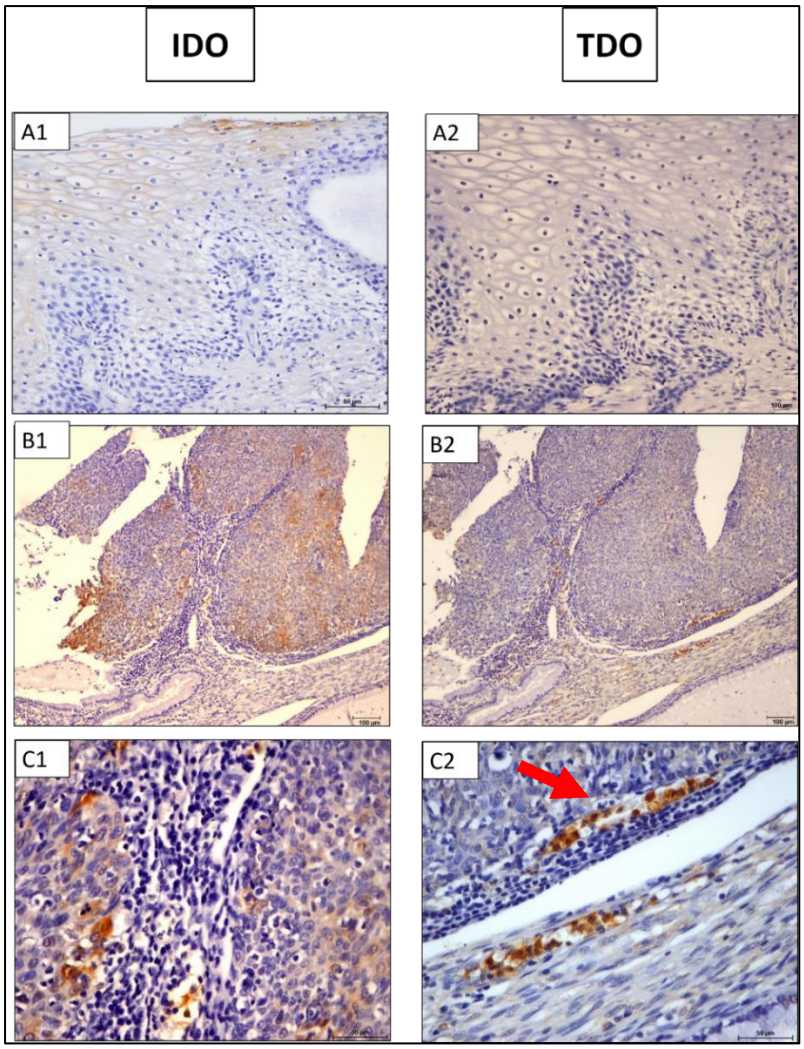

Figura 13. Análise imunohistoquímica em biópsia de NIC 3 com HPV 16. A1 e A2) Expressão de IDO e TDO representada em área normal (200x); B1 e B2) Expressão de IDO e TDO representada na lesão de NIC 3 (100X); C1 e C2) Expressão de IDO e TDO representada na lesão NIC 3 (400x). Na seta vermelha mostra-se a marcação de TDO em leucócitos ao redor do vaso sanguíneo (Nikon ACT-1 1.200C DXM).

Na Figura 14, observamos com mais detalhes um caso de carcinoma microinvasor com HPV 16, na qual podemos observar claramente que existe uma marcação de TDO em leucócitos infiltrados no epitélio alterado (embora nesta imagem esteja representando apenas a porção alterada intraepitelial que ainda não invasiva), assim como nos neutrófilos ao redor dos vasos sanguíneos adjacentes à uma região epitelial alterada.

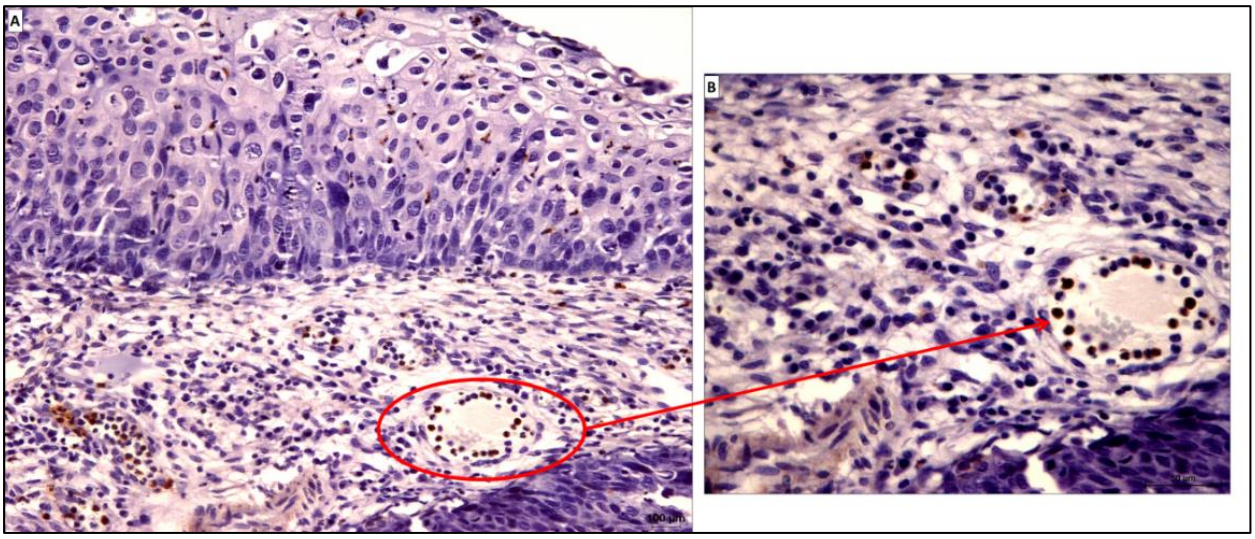

Figura 14. Análise imunohistoquímica em biópsia cervical de carcinoma microinvasivo com HPV 16 mostrando a expressão de TDO em leucócitos na região adjacente à lesão e no epitélio. Observe a expressão de TDO em leucócitos na parede dos vasos sanguíneos (Nikon ACT-1 1.200C DXM, A: aumento 200x e B: zoom óptico de 400x).

Nossos dados obtidos tanto em CBL quanto nas biópsias mostraram que há expressão de IDO em células escamosas e leucócitos no epitélio cervical normal, e que a frequência de células IDO positivas é maior em mulheres com lesão cervical ou carcinoma de células escamosas associadas ao HPV. Além disso, um terceiro achado, até onde sabemos, nunca antes investigado foi a marcação específica de TDO em leucócitos infiltrados no estroma adjacente à lesão e neutrófilos na parede dos vasos sanguíneos. Vimos também, que a expressão de IDO é aumentada em culturas organotípicas de pele transduzidas com E6 e E7 quando comparadas com as culturas controles.

DISCUSSÃO

Os aspectos centrais identificados neste estudo são: 1) existe uma expressão leve de IDO no epitélio cervical infectado ou não por HPV; 2) na vigência de lesões intraepiteliais cervicais ou carcinoma de células escamosas há o aumento na frequência de células escamosas e leucócitos marcados de forma moderada/acentuada para IDO; este aumento também foi observado em culturas organotípicas de pele transduzidas com as oncoproteínas E6/E7 do HPV16; e 3) além da IDO, na vigência de lesões há expressão TDO de forma bastante localizada, especificamente em leucócitos infiltrados no estroma e na parede dos vasos sanguíneos.

É conhecido que a IDO é expressa em vários tecidos normais e tumorais. No trato reprodutivo feminino IDO foi previamente encontrada em um pequeno número de células do epitélio glandular (Théate *et al.*, 2015). No nosso estudo, usando um maior número de amostras de epitélio cervical normal, identificamos a expressão de IDO em células escamosas e leucócitos. Uma vez que o epitélio, tanto da pele quanto das mucosas, é um tecido de interface entre a microbiota residente e o hospedeiro, a expressão de IDO, e como consequência a regulação do metabolismo do Trp em epitélio normal, indica seu possível papel na homeostasia cervicovaginal (Niño-Castro *et al.*, 2014; Romani *et al.*, 2014). Várias hipóteses sobre o papel da IDO em tecido sadio foram sugeridas. Efeitos pleitrópicos da IDO incluem ações protetoras do epitélio como a depleção do Trp para evitar a replicação bacteriana e viral, assim como a produção basal de QUIN que serviria para suprimir respostas imune mediadas por células T importantes para a tolerância imunológica (Dai e Zhu, 2010). Entretanto, em algumas situações o ambiente tolerogênico causado pelo aumento da expressão de IDO contribui com a infecção e tumorigênese (Munn e Mellor, 2016).

A modulação da expressão de IDO pelo HPV poderia a princípio ser um dos mecanismos associados ao desenvolvimento de lesões e carcinoma. Para testar esta hipótese, comparamos a expressão de IDO em amostras citológicas normais na presença ou não de infecção por HPV. Na ausência de lesão cervical, não observamos diferença significativa na expressão proteica de IDO em células escamosas entre mulheres que tem ou não HPV. Por outro lado, a expressão de IDO nos leucócitos foi maior entre as mulheres infectadas. Este dado sugere que a expressão de IDO por leucócitos pode estar presente desde o início da infecção pelo HPV, mesmo antes do aparecimento da lesão, e poderia ser um dos elementos responsáveis pelo avanço desta. O aumento da expressão

de IDO antecedendo a lesão parece bem interessante e ampara a importância desta enzima nos estágios iniciais da doença. Esta hipótese merece ser melhor investigada em estudos futuros e deveria ser considerada na proposta de uma estratégia terapêutica para eliminação do HPV e regressão das lesões iniciais.

Os leucócitos marcados para IDO identificados na cérvix de mulheres infectadas com HPV apresentam morfologia típica de neutrófilos, isto é, são células pequenas, com núcleo segmentado e citoplasma de aspecto granular. Há uma marcação de IDO moderada/acentuada em aproximadamente 70% (7/10) das amostras de cérvix normal com HPV vs 26% (9/34) das amostras sem HPV. Neutrófilos possuem um importante papel na regulação das respostas imune inata e adaptativa em diversos contextos da inflamação (Perobelli *et al.*, 2015). Inicialmente, os neutrófilos eram reconhecidos como uma população única, entretanto hoje se reconhecem vários subtipos de neutrófilos (Kruger *et al.*, 2015). IDO está presente em alguns desses subtipos e a indução de IDO nessas células foi primeiramente descrita *in vitro* usando células humanas incubadas com *E. coli* uropatogênica (Loughman e Hunstad, 2012). Linhagens neutrofílicas marcadas com IDO incluem as células supressoras derivadas da linhagem mielóide (MDSC), que regulam as respostas do sistema imune inato e tem habilidade importante de suprimir as respostas das células T (Yu *et al.*, 2013).

A manutenção de um microambiente imunossupressor possui um importante papel na carcinogênese de forma geral e também na carcinogênese associada ao HPV (Bashaw *et al.*, 2017). Macrófagos associados a tumores (TAM), linfócitos infiltrantes do tumor (TIL) e neutrófilos associados ao tumor (TAN) são observados em vários tipos de cânceres (Galdiero *et al.*, 2013; Badalamenti *et al.*, 2018). Dependendo dos subtipos celulares dominantes, efeitos pró- ou antitumorais são esperados (Yu e Fu, 2006; Sica *et al.*, 2008; Fridlender *et al.*, 2009). Macrófagos M2, células Treg e neutrófilos N2 tem sido considerados como tendo atividade pró-tumoral (Chimal-Ramírez *et al.*, 2013). Tanto os MDSC da linhagem granulocítica como os TANs ganharam muita relevância mais recentemente e, devido as similaridades de suas características pró-tumorais e fenotípicas, não tem sido simples sua distinção (Bronte *et al.*, 2016; Moses e Brandau, 2016). O epitélio transformado pelo HPV produz fatores solúveis e recruta TAM, TIL e MDSC que foram recentemente identificadas no câncer cervical e associados à expressão de G-CSF do tumor e quimiorresistência (Kawano *et al.*, 2015; Bashaw *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2018). No câncer cervical, os neutrófilos tem sido considerados como tendo atividade pró-tumoral (Punt *et al.*, 2015). Nos nossos dados de casos positivos para HPV16 e com

lesões cervicais encontramos que 80% das amostras tiveram leucócitos com expressão acentuada para IDO (Tabela 7). Sugerimos que essas células possam ser similares as MDSCs ou TANs.

Fica evidente, a partir dos resultados, a contribuição de leucócitos com a marcação de IDO. Em relação às células escamosas observa-se que há aumento da expressão de IDO nas células displásicas, principalmente em LIEAG e em magnitude maior do que a observada no carcinoma escamoso. Assim no câncer cervical, ao contrário de outros tumores nos quais a IDO é expressa constitutivamente (Uyttenhove *et al.*, 2003; Löb *et al.*, 2009), a expressão de IDO parece estar concentrada no microambiente e na célula precursora da célula tumoral. De certa forma é como se a células displásicas tivessem mais recursos de imunoescape do que a célula tumoral, pelo menos no que diz respeito a metabolização do Trp.

Estudos prévios mostraram a expressão de IDO em NIC 2 e 3 e câncer cervical, identificando IDO em células tumorais e Treg Foxp3 (Nakamura *et al.*, 2007; Kobayashi *et al.*, 2008). Nos casos de carcinoma, a IDO foi encontrada no infiltrado inflamatório ao longo da fronte invasiva, sugerindo que essas células adquirem um fenótipo imunossupressor durante a carcinogênese (Sedlmayr *et al.*, 2003; Nakamura *et al.*, 2007). Nas nossas biópsias também observamos que a IDO é expressa nas células tumorais, células endoteliais e no infiltrado leucocitário da região adjacente do carcinoma cervical invasivo. Nas lesões cervicais observamos marcação de IDO nas células displásicas, leucócitos e endotélio. A expressão de IDO em leucócitos também foi observada nas biópsias de cervicite que foram usadas como nosso controle.

Sabemos que a LIEAG e o CCE ocorrem após a persistência do HPV de alto risco na célula escamosa, permitindo a inserção de oncogenes E6 e E7 no DNA da célula hospedeira, com consequente instabilidade genômica e distúrbios de proliferação e diferenciação (Doorbar, 2005). Em nosso trabalho, usamos culturas cutâneas organotípicas de queratinócitos transduzidos por oncogenes E6/ E7 HPV16, um modelo que mimetiza uma infecção transformante, e encontramos uma maior expressão de IDO. Esses resultados são concordantes com as marcações de IDO nas nossas amostras clínicas de mulheres com lesões cervicais associadas ao HPV 16, onde há grande expressão de IDO em células escamosas displásicas.

Além da IDO, a TDO também catalisa a oxidação do Trp e produção de QUIN. A possibilidade da TDO também estar envolvida no imuno escape de tumores tem ganhado atenção crescente. Estudos mostraram que a expressão de TDO em gliomas leva a imunossupressão favorecendo a sobrevivência e invasão das células tumorais (Opitz *et al.*, 2011; Pilotte *et al.*, 2012). Também tem sido discutido que a TDO tem como alvo as respostas de células T, em condições de saúde e doença, e que os fenótipos funcionais dessas respostas podem mudar conforme as condições do indivíduo (Hjortsø *et al.*, 2015). No contexto da lesão e carcinogênese cervical, até onde sabemos, este estudo é o primeiro a mostrar a expressão de TDO. O que nos chamou atenção nas biópsias foi que a marcação de TDO foi bastante específica para o infiltrado leucocitário na região perivascular e adjacente a lesão. Fica claro que no contexto de supressão da resposta imune no ambiente da cérvix tanto a IDO quanto a TDO devam ser consideradas.

Como o câncer do colo do útero é uma doença de progressão lenta precedida por lesões intraepiteliais bem definidas, o entendimento do microambiente tumoral em termos de imunotolerância pode indicar alvos celulares e moleculares do câncer associado ao HPV, com implicações práticas na prevenção e tratamento. Nossos dados indicam que mecanismos imunossupressivos envolvendo o metabolismo do Trp, com ação das enzimas IDO e TDO, emergem no epitélio infectado pelo HPV e nas neoplasias intraepiteliais cervicais e carcinoma de células escamosas. Observamos ainda que existe uma expressão basal de IDO no epitélio cervical normal, mas tal expressão torna-se mais evidente tanto em leucócitos e células escamosas displásicas em mulheres apresentando infecção por HPV e lesões cervicais associadas.

5. CONCLUSÃO

No epitélio vaginal normal há uma leve expressão de IDO em células escamosas e leucócitos, sugerindo que a mesma participe na interação microbiota-epitélio e equilíbrio do ecossistema vaginal. O aumento da expressão de IDO na vaginose bacteriana indica que o desequilíbrio na produção desta enzima poderia ser um fator favorecedor da proliferação bacteriana que leva à vaginose ou da aquisição de infecções genitais.

A indução da expressão de IDO pelas oncoproteínas E6/E7 do HPV16 em culturas organotípicas e em células escamosas e leucócitos cervicais de mulheres com lesões intraepiteliais ou carcinoma escamoso sugerem a participação do metabolismo do Trp nos mecanismos imunossupressores envolvidos na doença. Além da IDO, mostramos a presença de TDO no epitélio vaginal, na neoplasia intraepitelial cervical e no carcinoma de células escamosas, especialmente nos infiltrados do estroma e da parede dos vasos sanguíneos. Células de morfologia típica de neutrófilos, parecem ser fontes importantes de IDO e TDO na cérvix uterina. Estes fatos devem ser futuramente melhor explorados para a compreensão da fisiopatologia de doenças cervicovaginais e podem amparar a proposta de novas terapias.

6. REFERÊNCIAS

ALVAREZ, K. L. F. et al. Local and systemic immunomodulatory mechanisms triggered by Human Papillomavirus transformed cells: a potential role for G-CSF and neutrophils. **Sci Rep,** v. 7, n. 1, p. 9002, Aug 2017. ISSN 2045-2322. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28827632 >.

AMJADI, F. et al. Role of the innate immunity in female reproductive tract. **Adv Biomed Res,** v. 3, p. 1, 2014. ISSN 2277-9175. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24592358 >.

ASSOCIAÇÃO HOSPITALAR MOINHOS DO VENTO. Estudo epidemiológico sobre a prevalência nacional de infecção pelo HPV (POP-Brasil). Resultados Preliminares**:** 120 p. 2017.

AUDIRAC-CHALIFOUR, A. et al. Cervical Microbiome and Cytokine Profile at Various Stages of Cervical Cancer: A Pilot Study. **PLoS One,** v. 11, n. 4, p. e0153274, 2016. ISSN 1932-6203. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27115350 >.

BADALAMENTI, G. et al. Role of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with solid tumors: Can a drop dig a stone? **Cell Immunol**, Jan 2018. ISSN 1090-2163. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29395859 >.

BASHAW, A. A. et al. Modulation of antigen presenting cell functions during chronic HPV infection. **Papillomavirus Res,** v. 4, p. 58-65, Dec 2017. ISSN 2405-8521. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29179871 >.

BERNARD, Hans-Ulrich et al. Classification of Papillomaviruses (PVs) Based on 189 PV Types and Proposal of Taxonomic Amendments. Virology, v. 401, n. 1, p. 70, 2010.

BOCCARDO, E. et al. HPV-18 confers resistance to TNF-alpha in organotypic cultures of human keratinocytes. **Virology,** v. 328, n. 2, p. 233-43, Oct 2004. ISSN 0042-6822. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15464843 >.

BORGDORFF, H. et al. Cervicovaginal microbiome dysbiosis is associated with proteome changes related to alterations of the cervicovaginal mucosal barrier. **Mucosal Immunol,** v. 9, n. 3, p. 621-33, 05 2016. ISSN 1935-3456. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26349657 >.

BORGES, S.; SILVA, J.; TEIXEIRA, P. The role of lactobacilli and probiotics in maintaining vaginal health. **Arch Gynecol Obstet,** v. 289, n. 3, p. 479-89, Mar 2014. ISSN 1432-0711. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24170161 >.

BOSCH, F. X.; MUÑOZ, N. The viral etiology of cervical cancer. **Virus Res,** v. 89, n. 2, p. 183-90, Nov 2002. ISSN 0168-1702. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12445658 >.

BRANDACHER, G. et al. Prognostic value of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in colorectal cancer: effect on tumor-infiltrating T cells. **Clin Cancer Res,** v.12, n.4, p.1144-51, Feb 2006. ISSN 1078-0432. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16489067 >.

BRONTE, V. et al. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. **Nat Commun,** v. 7, p. 12150, Jul 2016. ISSN 2041-1723. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27381735 >.

CAMPAGNOLI EB et al. Citologia em base líquida - uma nova opção para o diagnóstico de lesões bucais. Rev Bras Patol Oral. 2005;4:119-27.

CHIMAL-RAMÍREZ, G. K.; ESPINOZA-SÁNCHEZ, N. A.; FUENTES-PANANÁ, E. M. Protumor activities of the immune response: insights in the mechanisms of immunological shift, oncotraining, and oncopromotion. **J Oncol,** v. 2013, p. 835956, 2013. ISSN 1687-8450. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23577028 >.

CONSOLARO, M. E. L.; MARIA-ENGLER, S. S. **Citologia Clínica Cérvico- Vaginal: Texto e Atlas**. 2012.

CUBIE, Heather A. Diseases associated with human papillomavirus infection. Virology, v. 445, n. 1-2, p. 21-34, 2013.

DAI, X.; ZHU, B. T. Indoleamine 2,3-dioxygenase tissue distribution and cellular localization in mice: implications for its biological functions. **J Histochem Cytochem,** v. 58, n. 1, p. 17-28, Jan 2010. ISSN 1551-5044. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19741271 >.

DE POKOMANDY, A.; FRANCO E. HPV infection and cervical carcinogenesis: epidemiology and prevention. In: Ayhan A, Reed N, Gultekin M, Dursun P, editors. Textbook of gynaecological oncology. Gu¨nes Publishing; Ankara, Turkey: 2011. p. 75

DE VILLIERS, E. M. et al. Classification of papillomaviruses. **Virology,** v. 324, n. 1, p. 17-27, Jun 2004. ISSN 0042-6822. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15183049 >.

DISCACCIATI, M. G. et al. MMP-9/RECK Imbalance: A Mechanism Associated with High-Grade Cervical Lesions and Genital Infection by Human Papillomavirus and Chlamydia trachomatis. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention,** v. 24, n. 10, p. 1539-1547, Oct 2015. ISSN 1055-9965. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26261088>.

DISCACCIATI, M. G. et al. Outcome of expectant management of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 in women followed for 12 months. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol,** v. 155, n. 2, p. 204-8, Apr 2011. ISSN 1872-7654. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21193261 >.

DONDERS, G. G. et al. Definition of a type of abnormal vaginal flora that is distinct from bacterial vaginosis: aerobic vaginitis. **BJOG,** v. 109, n. 1, p. 34-43, Jan 2002. ISSN 1470-0328. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11845812 >.

DOORBAR, J. The papillomavirus life cycle. **J Clin Virol,** v. 32 Suppl 1, p. S7-15, Mar 2005. ISSN 1386-6532. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15753007 >.

FAZIO, F. et al. Xanthurenic Acid Activates mGlu2/3 Metabotropic Glutamate Receptors and is a Potential Trait Marker for Schizophrenia. **Sci Rep,** v. 5, p. 17799, Dec 2015. ISSN 2045-2322. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26643205 >.

FERNS, D. M. et al. Indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) metabolic activity is detrimental for cervical cancer patient survival. **Oncoimmunology,** v. 4, n. 2, p. e981457, Feb 2015. ISSN 2162-4011. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25949879 >.

FERRAZ, L. D. C. et al. Ciclo celular , HPV e evolução da neoplasia intraepitelial cervical : seleção de marcadores biológicos. Journal of the Health Sciences Institute, v. 30, n. 2, p. 107–111, 2012.

FOLGIERO, V. et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) activity in leukemia blasts correlates with poor outcome in childhood acute myeloid leukemia. **Oncotarget,** v. 5, n. 8, p. 2052-64, Apr 2014. ISSN 1949-2553. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24903009 >.

FOTOPOULOU, C. et al. Systemic changes of tryptophan catabolites via the indoleamine-2,3-dioxygenase pathway in primary cervical cancer. **Anticancer Res,** v. 31, n. 8, p. 2629-35, Aug 2011. ISSN 1791-7530. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21778315 >.

FRANCO, E. et al. Design and methods of the Ludwig-McGill longitudinal study of the natural history of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Brazil. Ludwig-McGill Study Group. **Rev Panam Salud Publica,** v. 6, n. 4, p. 223-33, Oct 1999. ISSN 1020-4989. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10572472 >.

FRIDLENDER, Z. G. et al. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. **Cancer Cell,** v. 16, n. 3, p. 183-94, Sep 2009. ISSN 1878-3686. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19732719 >.

GALDIERO, M. R. et al. Tumor associated macrophages and neutrophils in cancer. **Immunobiology,** v. 218, n. 11, p. 1402-10, Nov 2013. ISSN 1878-3279. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23891329 >.

GAO, J. et al. Impact of the Gut Microbiota on Intestinal Immunity Mediated by Tryptophan Metabolism. **Front Cell Infect Microbiol,** v. 8, p. 13, 2018. ISSN 2235-2988. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29468141 >.

GIRALDO, P. C. et al. Identification of immune cells by flow cytometry in vaginal lavages from women with vulvovaginitis and normal microflora. **Am J Reprod Immunol,** v. 67, n. 3, p. 198-205, Mar 2012. ISSN 1600-0897. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22151521 >.

GRAHAM, SV. Late events in the life cycle of human papillomaviruses. In: Campo MS, editor. Papillomavirus research: from natural history to vaccines and beyond. Caister Academic Press; Wymondham, Norfolk: 2006. pp. 193–212.

HICKEY, D. K. et al. Innate and adaptive immunity at mucosal surfaces of the female reproductive tract: stratification and integration of immune protection against the transmission of sexually transmitted infections. **J Reprod Immunol,** v. 88, n. 2, p. 185-94, Mar 2011. ISSN 1872-7603. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21353708 >.

HJORTSØ, M. D. et al. Tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO)-reactive T cells differ in their functional characteristics in health and cancer. **Oncoimmunology,** v. 4, n. 1, p. e968480, Jan 2015. ISSN 2162-4011. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25949861 >.

IARC. **Biological Agents**. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 100B 2012.

INABA, T. et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase expression predicts impaired survival of invasive cervical cancer patients treated with radical hysterectomy. **Gynecol Oncol,** v.117, n.3, p. 423-8, Jun 2010. ISSN 1095-6859.Disponível em:< https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20350764 >.

INCA. **Diretrizes Brasileiras para o Rastreamento do Câncer do Colo do Útero** 2016. Disponível em:<http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/DDiretrizes_para_o_Rastreamento_do_cancer_do_colo_do_utero_2016_corrigido.pdf>.

INCA. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil:** 128 p. 2017.Disponível em:< http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/>.

JENSEN, K. E. et al. Chlamydia trachomatis and risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 or worse in women with persistent human papillomavirus infection: a cohort study. **Sex Transm Infect,** v. 90, n. 7, p. 550-5, Nov 2014. ISSN 1472-3263. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24728044 >.

KAWANO, M. et al. The significance of G-CSF expression and myeloid-derived suppressor cells in the chemoresistance of uterine cervical cancer. **Sci Rep,** v. 5, p. 18217, Dec 2015. ISSN 2045-2322. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26666576 >.

KING, C. C. et al. Bacterial vaginosis and the natural history of human papillomavirus. **Infect Dis Obstet Gynecol,** v. 2011, p. 319460, 2011. ISSN 1098-0997. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21869857 >.

KOBAYASHI, A. et al. Evolving immunosuppressive microenvironment during human cervical carcinogenesis. **Mucosal Immunol,** v. 1, n. 5, p. 412-20, Sep 2008. ISSN 1935-3456. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19079205 >.

KRUGER, P. et al. Neutrophils: Between host defence, immune modulation, and tissue injury. **PLoS Pathog,** v. 11, n. 3, p. e1004651, Mar 2015. ISSN 1553-7374. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25764063 >.

LEE, S. J. et al. Immunotherapy for human papillomavirus-associated disease and cervical cancer: review of clinical and translational research. **J Gynecol Oncol,** v. 27, n. 5, p. e51, Sep 2016. ISSN 2005-0399. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27329199 >.

LI, N. I. et al. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: variation by geographical region, histological type and year of publication. International journal of cancer, v. 128, n. 4, p. 927-935, 2011.

LINHARES, I. M.; GIRALDO, P. C.; BARACAT, E. C. [New findings about vaginal bacterial flora]. **Rev Assoc Med Bras (1992),** v. 56, n. 3, p. 370-4, 2010 May-Jun 2010. ISSN 1806-9282. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20676549 >.

LITJENS, Rogier JNTM et al. Molecular biomarkers in cervical cancer diagnosis: a critical appraisal. **Expert opinion on medical diagnostics**, v. 7, n. 4, p. 365-377, 2013.

LÖB, S. et al. IDO1 and IDO2 are expressed in human tumors: levo- but not dextro-1-methyl tryptophan inhibits tryptophan catabolism. **Cancer Immunol Immunother,** v. 58, n. 1, p. 153-7, Jan 2009. ISSN 1432-0851. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18418598>.

LOUGHMAN, J. A.; HUNSTAD, D. A. Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by uropathogenic bacteria attenuates innate responses to epithelial infection. **J Infect Dis,** v. 205, n. 12, p. 1830-9, Jun 2012. ISSN 1537-6613. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22474038 >.

MA, B.; FORNEY, L. J.; RAVEL, J. Vaginal microbiome: rethinking health and disease. **Annu Rev Microbiol,** v. 66, p. 371-89, 2012. ISSN 1545-3251. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22746335 >.

MARCONI, C. et al. Cervicovaginal levels of proinflammatory cytokines are increased during chlamydial infection in bacterial vaginosis but not in lactobacilli-dominated flora. **J Low Genit Tract Dis,** v. 18, n. 3, p. 261-5, Jul 2014. ISSN 1526-0976. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24633167 >.

MCCANCE, Dennis J. et al. Human papillomavirus type 16 alters human epithelial cell differentiation in vitro. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 85, n. 19, p. 7169-7173, 1988.

MCMURRAY, HR et al. “Biology of Human Papillomaviruses.” International Journal of Experimental Pathology 82.1 (2001): 15–33. PMC. Web. 19 Oct. 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Diagnóstico laboratorial de doenças sexualmente transmissíveis, incluindo o vírus da imunodeficiência humana** 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia prático sobre HPV: guia de perguntas e respostas para profissionais de saúde.** 2017.

MONCLA, B. J. et al. The Effects of Hormones and Vaginal Microflora on the Glycome of the Female Genital Tract: Cervical-Vaginal Fluid. **PLoS One,** v. 11, n. 7, p. e0158687, 2016. ISSN 1932-6203. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27437931 >.

MOODY, C. A.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. **Nat Rev Cancer,** v. 10, n. 8, p. 550-60, Aug 2010. ISSN 1474-1768. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20592731 >.

MOSES, K.; BRANDAU, S. Human neutrophils: Their role in cancer and relation to myeloid-derived suppressor cells. **Semin Immunol,** v. 28, n. 2, p. 187-96, 04 2016. ISSN 1096-3618. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27067179 >.

MUNN, D. H.; MELLOR, A. L. IDO in the Tumor Microenvironment: Inflammation, Counter-Regulation, and Tolerance. **Trends Immunol,** v. 37, n. 3, p. 193-207, Mar 2016. ISSN 1471-4981. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26839260 >.

MUNN, D. H.; MELLOR, A. L. Indoleamine 2,3 dioxygenase and metabolic control of immune responses. **Trends Immunol,** v. 34, n. 3, p. 137-43, Mar 2013. ISSN 1471-4981. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23103127 >.

MUÑOZ, N. et al. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine,** v. 24 Suppl 3, p. S3/1-10, Aug 2006. ISSN 0264-410X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16949995 >.

MUÑOZ, N. et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **N Engl J Med,** v. 348, n. 6, p. 518-27, Feb 2003. ISSN 1533-4406. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12571259 >.

NAGLAK, E. K.; MORRISON, S. G.; MORRISON, R. P. Neutrophils Are Central to Antibody-Mediated Protection against Genital Chlamydia. **Infect Immun,** v. 85, n. 10, 10 2017. ISSN 1098-5522. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28739831 >.

NAKAMURA, T. et al. Expression of indoleamine 2, 3-dioxygenase and the recruitment of Foxp3-expressing regulatory T cells in the development and progression of uterine cervical cancer. **Cancer Sci,** v. 98, n. 6, p. 874-81, Jun 2007. ISSN 1347-9032. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17433037 >.

NARISAWA-SAITO, M.; KIYONO, T. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: roles of E6 and E7 proteins. **Cancer Sci,** v. 98, n. 10, p. 1505-11, Oct 2007. ISSN 1347-9032. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17645777 >.

NAYAR, R.; WILBUR, D.C. The Pap Test and Bethesda 2014."The reports of my demise have been greatly exaggerated."(after a quotation from Mark Twain). **Acta Cytol,** v.59, n. 2, p.121-32, 2015. ISSN 0001-5547.Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25997404 >.

NIAID. **Papillomavirus Episteme (PaVE)**.Disponível em:< http://pave.niaid.nih.gov/#home>. Acesso em 30 de julho de 2018.

NIÑO-CASTRO, A. et al. The IDO1-induced kynurenines play a major role in the antimicrobial effect of human myeloid cells against Listeria monocytogenes. **Innate Immun,** v. 20, n. 4, p. 401-11, May 2014. ISSN 1753-4267. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23940074 >.

OKAMOTO, A. et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase serves as a marker of poor prognosis in gene expression profiles of serous ovarian cancer cells. **Clin Cancer Res,** v. 11, n. 16, p. 6030-9, Aug 2005. ISSN 1078-0432. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16115948 >.

OPITZ, C. A. et al. An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. **Nature,** v. 478, n. 7368, p. 197-203, Oct 2011. ISSN 1476-4687. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21976023 >.

OSTÖR, A. G. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. **Int J Gynecol Pathol,** v. 12, n. 2, p. 186-92, Apr 1993. ISSN 0277-1691. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8463044 >.

PEPE, MS. et al. Pivotal evaluation of the accuracy of a biomarker used for classification or prediction: standards for study design. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100(20):1432-8.

PEROBELLI, S. M. et al. Plasticity of neutrophils reveals modulatory capacity. **Braz J Med Biol Res,** v. 48, n. 8, p. 665-75, Aug 2015. ISSN 1414-431X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26108096 >.

PILOTTE, L. et al. Reversal of tumoral immune resistance by inhibition of tryptophan 2,3-dioxygenase. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 109, n. 7, p. 2497-502, Feb 2012. ISSN 1091-6490. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22308364 >.

PLATTEN, M.; WICK, W.; VAN DEN EYNDE, B. J. Tryptophan catabolism in cancer: beyond IDO and tryptophan depletion. **Cancer Res,** v. 72, n. 21, p. 5435-40, Nov 2012. ISSN 1538-7445. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23090118 >.

PUNT, S. et al. Angels and demons: Th17 cells represent a beneficial response, while neutrophil IL-17 is associated with poor prognosis in squamous cervical cancer. **Oncoimmunology,** v. 4, n. 1, p. e984539, Jan 2015. ISSN 2162-4011. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25949866 >.

RAVEL, J. et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 108 Suppl 1, p. 4680-7, Mar 2011. ISSN 1091-6490. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20534435 >.

REID, G.; BOCKING, A. The potential for probiotics to prevent bacterial vaginosis and preterm labor. **Am J Obstet Gynecol,** v. 189, n. 4, p. 1202-8, Oct 2003. ISSN 0002-9378. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14586379 >.

RICHART, R. M. Cervical intraepithelial neoplasia. **Pathol Annu,** v. 8, p. 301-28, 1973. ISSN 0079-0184. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4583016 >.

RITTER, J. L.; GENCO, C. A. Induced Inflammatory Pyroptosis in Human Macrophages is Dependent on Intracellular Gonococci and Lipooligosaccharide. **J Cell Death,** v. 11, p. 1179066017750902, 2018. ISSN 1179-0660. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29434478 >.

ROMAGNANI, S. Immunological tolerance and autoimmunity. **Intern Emerg Med,** v. 1, n. 3, p. 187-96, 2006. ISSN 1828-0447. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17120464 >.

ROMANI, L. et al. Microbiota control of a tryptophan-AhR pathway in disease tolerance to fungi. **Eur J Immunol,** v. 44, n. 11, p. 3192-200, Nov 2014. ISSN 1521-4141. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25256754 >.

SATO, N. et al. Downregulation of indoleamine-2,3-dioxygenase in cervical cancer cells suppresses tumor growth by promoting natural killer cell accumulation. **Oncol Rep,** v. 28, n. 5, p. 1574-8, Nov 2012. ISSN 1791-2431. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22923135 >.

SEDLMAYR, P. et al. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in carcinoma of human endometrium and uterine cervix. **Adv Exp Med Biol,** v. 527, p. 91-5, 2003. ISSN 0065-2598. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15206720 >.

SICA, A. et al. Macrophage polarization in tumour progression. **Semin Cancer Biol,** v. 18, n. 5, p. 349-55, Oct 2008. ISSN 1096-3650. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18467122 >.

SMITH, S. B.; RAVEL, J. The vaginal microbiota, host defence and reproductive physiology. **J Physiol,** v. 595, n. 2, p. 451-463, 01 2017. ISSN 1469-7793. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27373840 >.

SNIJDERS, P. J. et al. HPV-mediated cervical carcinogenesis: concepts and clinical implications. **J Pathol,** v. 208, n. 2, p. 152-64, Jan 2006. ISSN 0022-3417. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16362994 >.

SOUZA, R.P. et al. Simultaneous detection of seven sexually transmitted agents in human immunodeficiency virus—infected Brazilian women by multiplex polymerase chain reaction. Am J Trop Med Hyg 2013;30: 1199–202.

STABILE, Sueli Aparecida Batista et al . Comparative study of the results from conventional cervico-vaginal oncotic cytology and liquid-based cytology. Einstein (São Paulo), São Paulo , v. 10, n. 4, p. 466-472, Dec. 2012 .

STANLEY, M. A. Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus. **Clin Microbiol Rev,** v. 25, n. 2, p. 215-22, Apr 2012. ISSN 1098-6618. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22491770 >.

THÉATE, I. et al. Extensive profiling of the expression of the indoleamine 2,3-dioxygenase 1 protein in normal and tumoral human tissues. **Cancer Immunol Res,** v. 3, n. 2, p. 161-72, Feb 2015. ISSN 2326-6074. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25271151 >.

TUROVSKIY, Y.; SUTYAK NOLL, K.; CHIKINDAS, M. L. The aetiology of bacterial vaginosis. **J Appl Microbiol,** v. 110, n. 5, p. 1105-28, May 2011. ISSN 1365-2672. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21332897 >.

UYTTENHOVE, C. et al. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. **Nat Med,** v. 9, n. 10, p. 1269-74, Oct 2003. ISSN 1078-8956. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14502282 >.

VAN DE WIJGERT, J. H. et al. The vaginal microbiota: what have we learned after a decade of molecular characterization? **PLoS One,** v. 9, n. 8, p. e105998, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25148517 >.

VITALI, B. et al. Vaginal microbiome and metabolome highlight specific signatures of bacterial vaginosis. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis,** v. 34, n. 12, p. 2367-76, Dec 2015. ISSN 1435-4373. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26385347 >.

WALBOOMERS, J. M. et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **J Pathol,** v. 189, n. 1, p. 12-9, Sep 1999. ISSN 0022-3417. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10451482 >.

WEI, L. et al. High Indoleamine 2,3-Dioxygenase Is Correlated With Microvessel Density and Worse Prognosis in Breast Cancer. **Front Immunol,** v. 9, p. 724, 2018. ISSN 1664-3224. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29719533 >.

WHO. Comprehensive cervical cancer control: a guide to essential practice 2014. Disponível em:<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/144785/9789241548953_eng.pdf?sequence=1>

WHO. Global health sector strategy on sexually transmitted infections 2016-2021: toward ending STIs. 2016.

WHO. Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections - 2008: 20 p. 2012.

WITKIN, S. S. et al. An altered immunity hypothesis for the development of symptomatic bacterial vaginosis. **Clin Infect Dis,** v. 44, n. 4, p. 554-7, Feb 2007. ISSN 1537-6591. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17243059 >.

WORKOWSKI, K. A.; BERMAN, S.; (CDC), C. F. D. C. A. P. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2010. **MMWR Recomm Rep,** v. 59, n. RR-12, p. 1-110, Dec 2010. ISSN 1545-8601. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21160459 >.

WU, L. et al. Circulating and tumor-infiltrating myeloid-derived suppressor cells in cervical carcinoma patients. **Oncol Lett,** v. 15, n. 6, p. 9507-9515, Jun 2018. ISSN 1792-1074. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29844835 >.

XUE, Bin et al. Disordered interactome of human papillomavirus. **Current pharmaceutical design**, v. 20, n. 8, p. 1274-1292, 2014.

YU, J. et al. Myeloid-derived suppressor cells suppress antitumor immune responses through IDO expression and correlate with lymph node metastasis in patients with breast cancer. **J Immunol,** v. 190, n. 7, p. 3783-97, Apr 2013. ISSN 1550-6606. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23440412 >.

YU, P.; FU, Y. X. Tumor-infiltrating T lymphocytes: friends or foes? **Lab Invest,** v. 86, n. 3, p. 231-45, Mar 2006. ISSN 0023-6837. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16446705 >.

ZHANG, T. et al. Expression and Prognostic Value of Indoleamine 2,3-dioxygenase in Pancreatic Cancer. **Chin Med J (Engl),** v. 130, n. 6, p. 710-716, Mar 2017. ISSN 0366-6999. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28303855 >.

ZHOU, J. Z.; WAY, S. S.; CHEN, K. Immunology of the Uterine and Vaginal Mucosae. **Trends Immunol,** v. 39, n. 4, p. 302-314, Apr 2018. ISSN 1471-4981. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29433961 >.

ZIKLO, N. et al. Dysbiosis of the Vaginal Microbiota and Higher Vaginal Kynurenine/Tryptophan Ratio Reveals an Association with. **Front Cell Infect Microbiol,** v. 8, p. 1, 2018. ISSN 2235-2988. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29404279 >.

APÊNDICE A: RESULTADOS PRELIMINARES IDO EM CÉLULAS ESCAMOSAS NAS INFECÇÕES GENITAIS

Tabela 3: Dados preliminares sobre a associação entre IDO em células escamosas e as infecções que foram pouco prevalentes neste tamanho amostral.

	Expressão de IDO em células escamosas			
	Moderada/ Acentuada	**Negativa/Leve**	**Odds ratio (IC 95%)**	
	N (%)	**N (%)**		**Valor p**
Chlamydia/ Neisseria			2.18 (0,45-10,53)	0.7304**
Positivo	05 (56)	04 (44)		
Negativo	51 (45)	63 (55)		
Candida sp			1,20 (0,16-8,83)	
Positivo	2	2		1,0000**
Negativo	54	65		
Trichomonas vaginalis			1,49 (0,08-28,57)	0.5909**
Positivo	02 (67)	01 (33)		
Negativo	54 (45)	66 (55)		
Herpes I/II			1,05 (0,09-12,17)	1,000**
Positivo	1	02 (67)		
Negativo	55 (46)	65 (54)		
HPV			1,43 (0,49-4,07)	0,3086***
Positivo	12 (54)	10 (45)		
Negativo	40 (43)	54 (57)		
B-globina negativa	4	3		

* Odds Ratio (análise multivariada ajustada pela presença de infecções genitais)

** Teste Exato de Fisher

***Teste Qui-quadrado

APÊNDICE B : RESULTADOS PRELIMINARES IDO EM LEUCÓCITOS NAS INFECÇÕES GENITAIS

Tabela 4: Resultados preliminares sobre a expressão de IDO em leucócitos de acordo com as infecções cervicovaginais

	Expressão de IDO em leucócitos		
	Moderada/Acentuada N (%)	**Negativa/Leve N (%)**	**Valor p**
Vaginose Bacteriana			1.0000*
	04 (40)	06 (60)	
	14 (36)	24 (63)	
Chlamydia/Neisseria			0.0634*
	04 (80)	01 (20)	
	14 (33)	28 (66)	
Trichomonas vaginalis			0.3829*
	01 (100)	00 (00)	
	17 (33)	29 (63)	
Herpes I/II			0.3829*
	01 (100)	00 (00)	
	17 (37)	29 (63)	
HPV			**0.0224***
	07 (70)	03 (30)	
	09 (26)	25 (74)	
	02	01	

* Teste Exato de Fisher

Embora nesse estudo não caracterizamos o fenótipos dos leucócitos presentes nas amostras, observamos que há uma grande importância destes no microambiente vaginal. Serão necessários estudos que façam a distinção dos fenótipos das células imunológicas vaginais nas diferentes condições de saúde e doença, para melhor entendimento dos mecanismos de imunotolerância.

ANEXOS

ANEXO A: Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado

ANEXO B: Parecer do Cômite de Ética em Pesquisa

ANEXO C: Currículo Lattes

ANEXO D: Ficha do aluno

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1. Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1. Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2. Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 05 de maio de 2017.

Prof. Dr. João Roberto Oliveira do Nascimento
Presidente da CPG/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091 3621 - Fax (11) 3091 3141 – e-mail: pgfarma@usp.br

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Expressão de indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), triptofano 2,3 dioxigenase (TDO) e concentração de quinurenina (QUIN) em amostras cervicais de mulheres com vaginose e em diferentes graus de neoplasia intraepitelial cervical e carcinoma escamoso

Pesquisador: Ana Campa
Área Temática:
Versão: 2
CAAE: 59709416.5.0000.0067
Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.862.243

Apresentação do Projeto:
De acordo com as estimativas mundiais, o câncer do colo do útero é o terceiro mais incidente em mulheres no mundo e o segundo mais incidente no Brasil, sendo considerado a quarta causa de mortalidade. O câncer de colo do útero vem precedido por lesões precursoras associadas a persistência do vírus do as células das lesões pré-neoplásicas ou neoplásicas cervicais escapem da vigilância imunológica. Tumores em geral apresentam o aumento da enzima IDO 1 (indoleamina 2,3-dioxigenase 1), que induzida por interferon (IFN-), oxida triptofano (Trp) a quinurenina (QUIN) levando a um processo de tolerância imunológica e progressão tumoral. Outra enzima envolvida nesse processo responsável pela produção de QUIN é a TDO (triptofano 2,3- dioxigenase). Não há estudos que avaliem a sua expressão em câncer de colo do útero. O colo do útero é um sitio anatômico susceptível a diversos agentes infecciosos e de alteração de microbiota, que propiciam o efeito carcinogênico do HPV, como as vaginoses bacterianas (VB). Diante do exposto, nosso objetivo é avaliar a expressão dos marcadores envolvidos no catabolismo do triptofano (IDO e TDO) em amostras de mulheres com diferentes graus de lesão cervical associado ao HPV, carcinoma microinvasivo e carcinoma invasor por meio da técnica de Imunocitoquímica e medir o metabólito quinurenina nessas amostras pela

técnica de HPLC. Também avaliaremos se a expressão de IDO e TDO correlaciona-se ao grau das lesões cervicais associadas ao HPV e se esta expressão é influenciada pela presença de infecções genitais concomitantes. Através do isolamento de neutrófilos de sangue periférico e de sua incubação com os agentes etiológicos que levam à vaginose, verificaremos se há aumento na expressão de IDO e produção de quinurenina a fim de elucidar o seu papel como cofator na história natural do câncer do colo do útero.
Papiloma Humano (HPV) de alto risco oncogênico e de outros fatores que causam transformações no epitélio e consequentemente o desenvolvimento de lesões intraepiteliais. Sabe-se que o HPV é eficiente na evasão da resposta imune, porém é necessário conhecer sobre os mecanismos que permitem que as células das lesões pré-neoplásicas ou neoplásicas cervicais escapem da vigilância imunológica. Tumores em geral apresentam o aumento da enzima IDO 1 (indoleamina 2,3-dioxigenase 1), que induzida por interferon (IFN-), oxida triptofano (Trp) a quinurenina (QUIN) levando a um processo de tolerância imunológica e progressão tumoral. Outra enzima envolvida nesse processo responsável pela produção de QUIN é a TDO (triptofano 2,3- dioxigenase). Não há estudos que avaliem a sua expressão em câncer de colo do útero. O colo do útero é um sitio anatômico susceptível a diversos agentes infecciosos e de alteração de microbiota, que propiciam o efeito carcinogênico do HPV, como as vaginoses bacterianas (VB).
Diante do exposto, nosso objetivo é avaliar a expressão dos marcadores envolvidos no
catabolismo do triptofano (IDO e TDO) em amostras de mulheres com diferentes graus de lesão cervical associado ao HPV, carcinoma microinvasivo e carcinoma invasor por meio da técnica de Imunocitoquímica e medir o metabólito quinurenina nessas amostras pela técnica de HPLC. Também avaliaremos se a expressão de IDO e TDO correlaciona-se ao grau das lesões cervicais associadas ao HPV e se esta expressão é influenciada pela presença de infecções genitais concomitantes. Através do isolamento de neutrófilos de sangue periférico e de sua incubação com os agentes etiológicos que levam à vaginose, verificaremos se há aumento na expressão de IDO e produção de quinurenina a fim de elucidar o seu papel como cofator na história natural do câncer do colo do útero.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar se neutrófilos isolados de sangue periférico humano quando incubados com os agentes etiológicos que levam à vaginose tem aumento na expressão de IDO e produzem QUIN.

Objetivos específicos

1- Avaliar a expressão proteica de IDO e TDO em amostras cervicais de mulheres apresentando diferentes graus de lesão cervical associados ao HPV, a saber: cervicites, NIC1, NIC2, NIC3, carcinoma cervical microinvasivo e carcinoma cervical invasor, por meio da técnica de imunocitoquímica
2- Medir o metabólito QUIN em amostras cervicais de mulheres apresentando diferentes graus de lesão cervical associados ao HPV;
3- Avaliar se neutrófilos isolados de sangue periférico humano quando incubados com os agentes etiológicos que levam à vaginose tem aumento na expressão de IDO e produzem QUIN.
4- Avaliar se a presença de infecções genitais concomitantes (Chlamydia trachomatis, Candida sp, Trichomonas vaginalis, vírus do grupo Herpes e vaginose bacteriana) está relacionado à expressão de IDO e TDO em mulheres com lesões cervicais.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:
O risco da pesquisa é mínimo.
Benefícios: O estudo da expressão de biomarcadores associados às alterações moleculares causadas pelo HPV pode contribuir para aumentar a acurácia da detecção morfológica de lesões de alto grau e identificar casos de lesões de baixo grau com potencial de progredir para lesão mais grave e assim auxiliar na melhor conduta clínica.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:
Serão avaliadas neste estudo 100 mulheres participantes de um estudo anterior (aprovado pelo CEP da FCF-USP sob número 411.692/2013). Os grupos serão divididos da seguinte maneira:
Grupo caso: mulheres que foram submetidas à biópsia cervical no CAISM/UNICAMP, com diagnóstico histológico de NIC2, NIC3 e carcinoma escamoso
Grupo controle: mulheres incluídas no Planejamento Familiar da UNICAMP e que apresentaram dois diagnósticos citológicos consecutivos negativos para lesões intraepiteliais ou malignidade.
Todas estas mulheres já possuem diagnóstico microbiológico completo de infecções e HPV.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:
O TCLE foi reformulado e está adequado

Recomendações:

Nenhuma

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências apontadas foram corrigidas.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este CEP entende que o projeto de pesquisa pode ser considerado aprovado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_786319.pdf	01/11/2016 17:05:33		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_final.docx	01/11/2016 17:05:07	Ana Campa	Aceito
Outros	declaracao_anuencia.docx	01/11/2016 17:04:07	Ana Campa	Aceito
Outros	carta_aprovacao_comissao_caism.pdf	01/11/2016 17:02:00	Ana Campa	Aceito
Outros	carta_autorizacao_uso_amostras.pdf	01/11/2016 16:59:08	Ana Campa	Aceito
Outros	carta_resposta_Paloma.pdf	01/11/2016 16:57:10	Ana Campa	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_APROVADO.pdf	01/11/2016 16:56:48	Ana Campa	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Novo_TCLE_Projeto_Paloma.doc	01/11/2016 16:56:02	Ana Campa	Aceito
Folha de Rosto	folha.pdf	02/09/2016 14:20:13	Ana Campa	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Paloma.pdf	01/09/2016 13:42:00	Ana Campa	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEpaloma.pdf	01/09/2016 13:41:16	Ana Campa	Aceito
Declaração de Pesquisadores	ORIENTADORA.pdf	01/09/2016 13:40:00	Ana Campa	Aceito

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 **Fax:** (11)3031-8986 **E-mail:** cepfcf@usp.br

Declaração de Pesquisadores	PALOMA.pdf	01/09/2016 13:39:44	Ana Campa	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DEPARTAMENTO.pdf	01/09/2016 13:39:32	Ana Campa	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

SAO PAULO, 12 de Dezembro de 2016

Assinado por:
Cristina Northfleet de Albuquerque
(Coordenador)

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 **Fax:** (11)3031-8986 **E-mail:** cepfcf@usp.br

Currículo Lattes

Paloma Almeida Venancio

Endereço para acessar este CV:http://lattes.cnpq.br/2778070061410221

Última atualização do currículo em 27/07/2018

Resumo informado pelo autor

Graduada em Biomedicina pela Universidade Anhembi Morumbi (2015). Mestranda no Laboratório de Bioquímica Clínica, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP). Atuamente dedica-se a estudos e pesquisa relacionados a bioquímica do câncer, infecções genitais femininas e disbioses vaginais.
(Texto informado pelo autor)

Nome civil

Nome Paloma Almeida Venancio

Dados pessoais

Filiação Marcelo Douglas Venancio e Edna Conceição Almeida

Nascimento 08/02/1993 - Brasil

Carteira de Identidade 494179478 SSP - SP - 26/10/2010

CPF 413.587.888-12

Formação acadêmica/titulação

2016 Mestrado em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia).
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
Título: Expressão de indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) e triptofano 2,3-dioxigenase (TDO) no ambiente cervicovaginal normal, na vaginose bacteriana e nas lesões cervicais associadas ao HPV
Orientador: Ana Campa
Co-orientador: Michelle Garcia Discacciati de Carvalho
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

2012 - 2015 Graduação em Biomedicina.
Universidade Anhembi Morumbi, UAM, Sao Paulo, Brasil
Título: Estudo das Amostras Insatisfatórias na Citologia Ginecológica
Orientador: Sandra Lorente

Formação complementar

2015 - 2015 Extensão universitária em II Curso de Fisiopatologia e Análises Clínicas. (Carga horária: 40h).
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil

2014 - 2014 Extensão universitária em Escola de Inverno de Radiofarmácia e Radioquímica. (Carga horária: 40h).
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil

2014 - 2014 Curso de curta duração em INTRODUÇÃO À REPRODUÇÃO ASSISTIDA. (Carga horária: 6h).
Instituto Gera de Ensino e Pesquisa em Medicina Reprodutiva de SP, GERA, Brasil

2013 - 2013 Curso de curta duração em Curso em Reprodução Humana. (Carga horária: 20h).
Instituto Paulista de Ginecologia e Obstetrícia, IPGO, Brasil

Atuação profissional

1. Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP - FCF-USP

Vínculo institucional

2016 - Atual Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Aluno pesquisador , Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva

Áreas de atuação

1. Citologia Clínica
2. Patologia Clínica
3. Bioquímica

Producão

Produção bibliográfica

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. VENANCIO, P. A; MARIA-ENGLER, S. S.; CONSOLARO, M. E. L.; DERCHAIN, S. F.; CAMPA, A.; DISCACCIATI, M. G.
TDO and IDO role in cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer: diffuse tissue expression of IDO and focal expression of TDO in infiltrating neutrophils- preliminar results In: 3rd ICGEB Workshop on Human Papillomavirus and associated malignancies: biology, prevention and therapy., 2017, São Paulo.
3rd ICGEB Workshop on Human Papillomavirus and associated malignancies: biology, prevention and therapy.. , 2017.

2. VENANCIO, P. A; MARIA-ENGLER, S. S.; CONSOLARO, M. E. L.; VILLA, L. L.; DERCHAIN, S. F.; CAMPA, A.; DISCACCIATI, M. G.
Up-regulation of IDO in bacterial vaginosis (BV): role in HPV co-infection In: AACR International Conference on Translational Cancer Medicine, 2017, São Paulo.
AACR International Conference on Translational Cancer Medicine Abstracts. , 2017.

Apresentação de trabalho e palestra

1. **VENANCIO, P. A**
Importância do rastreamento do câncer do colo do útero: Exame de Papanicolaou e marcadores imunohistoquímicos, 2018. (Conferência ou palestra,Apresentação de Trabalho)

Eventos

Eventos

Participação em eventos

1. **VIII Simpósio de pós-graduação em análises clínicas– SIMPAC and III International symposium on pathophysiology and toxicology - ISPAT**, 2018. (Simpósio)
.

2. Apresentação de Poster / Painel no(a) **3rd ICGEB Workshop on Human Papillomavirus and associated Malignancies : Biology, Prevention and Therapy**, 2017. (Outra)
TDO and IDO role in cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer: diffuse tissue expression of IDO and focal expression of TDO in infiltrating neutrophils- preliminar results.

3. Apresentação de Poster / Painel no(a) **AACR International Conference on Translational Cancer Medicine**, 2017. (Outra)
Up-regulation of IDO in bacterial vaginosis: role in HPV co-infection.

4. **VIII Workshop on Melanoma Models**, 2017. (Outra)
.

5. **XXIX Semana Interna de Prevenção de Acidentes de Trabalho - SIPAT**, 2017. (Simpósio)
.

6. **3rd Prof.Eric A. Newsholme Research Symposium- Metabolic Regulation**, 2016. (Simpósio)
.

7. **Clube de Citologia no Adolfo Lutz**, 2016. (Encontro)
.

8. **Liga de Imuno-Histoquímica Comparada**, 2016. (Encontro)
.

9. **UofT-USP Workshop on Cancer,Inflammation and Immunity**, 2016. (Seminário)
.

10. **VII Simpósio de Pós-Graduação em Análises Clínicas - SIMPAC and II Internacional Symposium on Pathophysiologyand Toxicology- ISPAT A a**, 2016. (Simpósio)
.

11. **XV Simpósio de Biossegurança e Segurança Química e Biológica em Instituições de Ensino e Pesquisa**, 2016. (Simpósio)
.

12. **Clube de Citologia no Instituto Adolf Lutz**, 2015. (Encontro)
.

13. **V Congresso Internacional de Ginecologia Oncológica**, 2014. (Congresso)
.

14. **Seminário de Lançamento da Revista Questões Reprodutivas sobre Cirurgia Estética, Imagem Corporal e Sexualidade**, 2012. (Seminário)
.

Página gerada pelo sistema Currículo Lattes em 27/07/2018 às 10:21:04.

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9142 - 9144164/1 - Paloma Almeida Venancio

Email:	palomavenancio@usp.br
Data de Nascimento:	08/02/1993
Cédula de Identidade:	RG - 49.417.947-8 - SP
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Bacharela em Biomedicina - Universidade Anhembi Morumbi - São Paulo - Brasil - 2015

Curso:	Mestrado
Programa:	Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Área:	Fisiopatologia
Data de Matrícula:	04/07/2016
Início da Contagem de Prazo:	04/07/2016
Data Limite para o Depósito:	04/01/2019
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Ana Campa - 04/01/2018 até o presente. Email: anacampa@usp.br
Co-orientador:	Prof(a). Dr(a). Michelle Garcia Discacciati de Carvalho - 04/01/2018 até o presente. Email: michelle.garciadisc@gmail.com
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 04/07/2016
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 08/08/2017
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Primeira Matrícula em 04/07/2016

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor a partir de 20/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 16/07/2018

Impresso em: 23/07/2018 23:24:13

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9142 - 9144164/1 - Paloma Almeida Venancio

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5757-7/1	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia II	02/08/2016	14/11/2016	15	1	100	A	N	Concluída
QBQ5744-6/3	Noções de Segurança em Laboratórios de Química e Bioquímica, Ética e Responsabilidade em Pesquisa (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	10/08/2016	16/08/2016	30	2	100	A	N	Concluída
FBC5793-13/1	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia I	07/03/2017	19/06/2017	15	1	100	A	N	Concluída
BMI5841-7/1	Tópicos Avançados em Imunologia Fundamental (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	22/05/2017	11/06/2017	45	3	100	A	N	Concluída
FBA5728-4/4	Aprimoramento Pedagógico	30/05/2017	26/06/2017	60	4	100	A	N	Concluída
FBF5805-2/4	Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	03/08/2017	11/10/2017	90	6	100	A	N	Concluída
ICB5732-2/1	Câncer como Doença Infecciosa (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	23/10/2017	17/12/2017	120	8	100	B	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	25
Estágios:			
Total:	0	25	25

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 16/07/2018

Impresso em: 23/07/2018 23:24:13