

**RAFAELLA ALMEIDA LIMA NUNES**

**Avaliação funcional da via da interleucina-1 em queratinócitos que expressam os oncogenes de HPV**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo para obtenção do título de  
Doutor em Ciências

Programa de Oncologia

Orientadora: Dra. Lara Termini

**São Paulo**

**2020**

Almeida Lima Nunes, R. **Avaliação funcional da via da interleucina-1 em queratinócitos que expressam os oncogenes de HPV** [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

Avaliado em:

Banca Examinadora:

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

# Dedicatória

---

*A Deus, à minha família, aos meus amigos.*

---

# Agradecimentos

---

*Ao programa de Pós-graduação em Oncologia e Laboratório de Inovação em Câncer, nas pessoas da Profa. Dra. Luisa Villa e Raquel Hessel*

*À minha orientadora, Dra Lara Termini*

*Ao grupo de Infecções e Biologia do Câncer da Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), na pessoa do Dr. Massimo Tommasino*

*A todos do Laboratório de Biologia Molecular (CTO/ICESP), Laboratório de Oncovirologia (ICB/USP), Laboratório de Imunogenética (ICB/USP), Laboratório de Imunomodulação (ICB/USP) e Departamento de Tocoginecologia da UNICAMP, nas pessoas da Profa. Dra. Laura Sicheo, Prof. Dr. Enrique Boccardo, Profa. Dra. Alessandra Pontillo, Profa. Dra. Ana Paula Lepique e Prof. Dr. Luiz Carlos Zeferino.*

*Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPESP, pela bolsa de doutorado concedida e financiamento da pesquisa que resultou neste trabalho (CNPq: 573799/2008-3; FAPESP: 2008/03232-1; 2008/57889-1; 2015/26573-2).*

# Agradecimentos

---

*Aos meus amigos e família, faço um agradecimento especial:*

*Neste período, aprendi o verdadeiro significado da gratidão. Em todos os momentos, de alegria ou dificuldade, nunca estive sozinha. Fui amparada de todas as formas possíveis, por pessoas iluminadas que me acolheram com todo amor, cuidando do meu bem-estar físico, mental e espiritual, abrindo as portas de suas casas e de seus corações. Conquistei muitas coisas, conheci lugares com os quais sempre sonhei, vivi experiências incríveis, pessoal e academicamente, graças à ajuda de pessoas que, tenho certeza, o fizeram de coração. Mesmo estando longe de casa, fui intensamente amada e sustentada pela minha família, isso sem falar na família que ganhei de presente, e que me esperava todos os dias no laboratório, disposta a cuidar de mim com verdadeira amizade.*

*Telmo, Raquel, Giana, Gabi, Mayara, Neide, Dra. Luisa, Dra. Noely, Ricardo, Pepisco, sei que vão se encontrar nessas linhas. Sou grata de todo o meu coração.*

*“Pois será como a árvore plantada junto a ribeiros de águas, a qual dá seu fruto na estação própria, e cujas folhas não caem, e tudo quanto fizer, prosperará”.*

*Salmos 1:3,4*

*“We must work together to eliminate cervical cancer as a public health issue and to reduce the burden that millions face from all cancers.”*

*UN Secretary-General’s Message World Cancer Day, 4 February 2016*

## Resumo

Nunes RAL. *Avaliação funcional da via da interleucina-1 em queratinócitos que expressam os oncogenes de HPV* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

**Introdução:** A resposta imune desempenha um papel importante na eliminação das infecções causadas pelo HPV. Como estratégia de evasão do sistema imunológico, o vírus pode modular a produção e secreção de citocinas pelas células infectadas. Além disso, a resposta imune pode contribuir para a criação de um quadro de inflamação crônica, que favorece a progressão das lesões relacionadas ao vírus e o desenvolvimento do câncer. **Objetivos:** O objetivo deste estudo foi avaliar o papel da via da interleucina-1, mais especificamente IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-18, importantes citocinas pró-inflamatórias, no estabelecimento e progressão dos tumores cervicais. **Material e métodos:** Queratinócitos normais e transduzidos com os oncogenes E6 e/ou E7 de HPV16, além das linhagens tumorais de origem cervical C33, SiHa e HeLa, foram avaliados quanto à expressão (transcritos e proteínas) de IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-18, seus receptores e antagonistas naturais. O gene codificador de IL-18 foi editado por meio do sistema CRISPR-Cas9, e as linhagens celulares silenciadas foram avaliadas quanto à capacidade de invasão, migração, proliferação, viabilidade e indução da angiogênese. Além disso, 62 biópsias provenientes de pacientes diagnosticadas com câncer cervical avançado foram analisadas por imuno-histoquímica visando à avaliação da expressão de IL-18 nos tecidos tumorais e sua relação com o prognóstico. **Resultados:** Foi verificado que, embora presente nos queratinócitos normais e transduzidos com os oncogenes do HPV, a expressão de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  encontra-se drasticamente reduzida nas linhagens tumorais de origem cervical, ao contrário de IL-18, que permanece sendo expressa de forma significativa. O silenciamento de IL-18 por CRISPR-Cas9 reduziu a capacidade proliferativa e de formação de colônias das linhagens tumorais cervicais HPV positivas, mas associou-se à tendência de maior capacidade invasiva e de indução da angiogênese. A análise imuno-histoquímica das biópsias mostrou que a expressão de IL-18 na borda dos tumores está associada à resposta completa ao tratamento e menor risco de recorrência linfática ( $p=0.027$  e  $p=0.034$ , respectivamente). Embora não se tenha atingido significância estatística, observou-se clara tendência a maiores taxas de sobrevida global e sobrevida livre de doença nos tumores em cuja localização do infiltrado inflamatório era peritumoral ( $p=0.056$  e  $p=0.165$ , respectivamente). Da mesma forma, a maior expressão de IL-18 no núcleo e no citoplasma das células tumorais foi associada à tendência de melhor prognóstico. **Conclusões:** Considerando-se os resultados acima expostos, verificou-se que, embora presentes nos queratinócitos normais e transduzidos com os oncogenes de HPV16, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , seu antagonista natural e seus receptores são modulados negativamente de forma importante nas linhagens tumorais de origem cervical C33, SiHa e HeLa. Ao contrário, IL-18, seu antagonista natural e seus receptores continuam sendo expressos nas mesmas células. A análise conjunta dos resultados envolvendo as linhagens silenciadas para IL-18 e dos dados obtidos por imunohistoquímica sugere um papel protetor de IL-18, que deve ser confirmado por meio da ampliação da amostra estudada. Deve ser considerada a interação entre as células tumorais e o microambiente, mais especificamente, neste caso, o microambiente imune tumoral, no qual IL-18 constitui um importante mediador. Pretende-se que esta seja a próxima etapa deste estudo.

**Descritores:** HPV; Resposta imune inata; Interleucina-1; Interleucina-18; Câncer cervical; Prognóstico.

## Abstract

Nunes RAL. *Functional evaluation of the interleukin-1 pathway in keratinocytes that express HPV oncogenes* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2020.

**Introduction:** The immune response plays an important role in clearing HPV infections. As a strategy to evade the immune system, the virus can modulate cytokine production and secretion by infected cells. In addition, the immune response can contribute to create a chronic inflammatory condition, which can favor the progression of virus related lesions and cancer development. **Objectives:** The objective of this study was to evaluate the role of the interleukin-1 pathway, more specifically IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-18, important pro-inflammatory cytokines, in the establishment and progression of cervical tumors. **Material and methods:** Normal keratinocytes and keratinocytes transduced with HPV16 E6 and/or E7 oncogenes, in addition to the cervical tumor cell lines C33, SiHa and HeLa, were evaluated for the expression (transcripts and proteins) of IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-18, their natural antagonists and receptors. The gene encoding IL-18 was edited using CRISPR-Cas9 system, and silenced cell lines were evaluated for invasiveness, migration, proliferation, colony-forming capacity and angiogenesis induction. In addition, 62 biopsies from patients diagnosed with advanced cervical cancer were assessed by immunohistochemistry to assess IL-18 expression in tumor tissues and its relationship with the patients' prognosis. **Results:** It was found that, although present in normal and transduced keratinocytes, the expression of IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  is drastically reduced in cervical tumor cell lines, in contrast to IL-18, which remains expressed in a meaningful way. IL-18 silencing by CRISPR-Cas9 reduced the proliferative and colony-forming capacity of HPV-positive cervical tumor cell lines, but was associated with the tendency towards greater invasive capacity and angiogenesis induction. The biopsies immunohistochemical analysis showed that IL-18 expression at the edge of the tumor is associated with a complete response to the treatment and a lower risk of lymphatic recurrence ( $p=0.027$  and  $p=0.034$ , respectively). Although no statistical significance was reached, there is a clear tendency towards higher rates of overall survival and disease-free survival in tumors showing peritumoral location of the inflammatory infiltrate ( $p=0.056$  and  $p=0.165$ , respectively). Likewise, the increased IL-18 expression in tumor cells nucleus and cytoplasm was associated with a trend towards better prognosis. **Conclusions:** Considering the above results, it was found that, although present in normal and transduced keratinocytes, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , their natural antagonist and receptors are significantly negatively modulated in cervical tumor cell lines C33, SiHa and HeLa. In contrast, IL-18, its natural antagonist and receptors continue to be expressed in the same cells. Together, IL-18 silenced cells analysis and immunohistochemistry data suggest a protective role for IL-18, which should be confirmed by expanding the studied sample. The interaction between tumor cells and the microenvironment must be considered, more specifically, in this case, the tumor immune microenvironment, in which IL-18 is an important mediator. This is intended to be the next stage of this study.

**Descriptors:** HPV; Innate immune response; Interleukin-1; Interleukin-18; Cervical cancer; Prognosis.



Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Sistema Integrado de Bibliotecas da USP. **Diretrizes para a apresentações de dissertações e teses da USP: parte I (ABNT)**. 3. ed. rev. ampl. mod. São Paulo: SIBiUSP, 2016. 100p. (Cadernos de Estudos n. 9). ISBN 978-85-7314-060-6.

Disponível em: <<http://www.livrosbertos.sibi.usp.br/portaldelivrosUSP/catalog/book/111>>

Acesso em 30 jan. 2019.

# Sumário

<b>1. Introdução.....</b>	<b>8</b>
<b>1.1. Câncer do colo do útero _____</b>	<b>9</b>
<b>1.2. Papilomavírus Humano (HPV) _____</b>	<b>10</b>
1.2.1. Estrutura da partícula viral e organização do genoma do HPV .....	10
1.2.2. Classificação dos Papilomavírus Humanos.....	12
1.2.3. Ciclo de Replicação do HPV .....	13
1.2.4. Carcinogênese mediada pelo HPV .....	14
1.2.5. Alterações intraepiteliais associadas à infecção persistente pelo HPV.....	15
<b>1.3. História natural da infecção pelo Papilomavírus Humano _____</b>	<b>16</b>
<b>1.4. HPV e Câncer _____</b>	<b>18</b>
<b>1.5. Resposta imune à infecção pelo HPV _____</b>	<b>18</b>
1.5.1. Mecanismos imunes de controle da infecção pelo HPV .....	19
1.5.2. HPV: mecanismos de evasão da resposta imune .....	20
<b>1.6. Inflamação e câncer _____</b>	<b>22</b>
<b>1.7. Via da interleucina-1 _____</b>	<b>23</b>
1.7.1. Interleucina-1 alfa e interleucina-1 beta .....	25
1.7.2. Interleucina-18 .....	27
<b>1.8. HPV e via da interleucina-1 _____</b>	<b>28</b>
<b>1.9. Opções terapêuticas para o tratamento do câncer cervical relacionadas à IL-1 e IL-18__</b>	<b>29</b>
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>33</b>
<b>2.1. Objetivo geral _____</b>	<b>33</b>
<b>2.2. Objetivos específicos _____</b>	<b>33</b>
<b>3. Material e Métodos .....</b>	<b>34</b>
<b>3.1. Culturas celulares _____</b>	<b>34</b>
3.1.1. Culturas de queratinócitos .....	34
3.1.2. Culturas de linhagens tumorais.....	34
<b>3.2. Inserção dos oncogenes do HPV _____</b>	<b>35</b>
3.2.1. Vetores retrovirais.....	35
3.2.2. Transdução.....	36
<b>3.3. Sistema CRISPR-Cas9 para <i>knockout</i> gênico _____</b>	<b>37</b>
3.3.1. Cultura de células .....	37
3.3.2. Desenho do gRNA.....	37
3.3.3. Clonagem dos gRNAs nos vetores para o sistema CRISPR .....	38
3.3.4. Obtenção de vírus para o sistema lentiviral.....	40
<b>3.4. Tratamento com IL-1<math>\beta</math>, IL-18, LPS e cisplatina _____</b>	<b>40</b>

<b>3.5. Análise dos níveis proteicos</b>	<b>40</b>
3.5.1. Extração de proteínas	40
<b>3.5.2. Western Blot</b>	<b>41</b>
3.5.3. Ensaio imunoenzimático (ELISA)	41
3.5.4. Detecção de citocinas nos sobrenadantes das culturas celulares via plataforma Luminex	42
<b>3.6. Imunohistoquímica</b>	<b>42</b>
3.6.1. Seleção de casos	42
3.6.2. Metodologia utilizada na coloração	43
<b>3.7. Análise dos níveis de mRNA</b>	<b>43</b>
3.7.1. Extração de RNA	43
3.7.2. PCR em tempo real	44
<b>3.8. Ensaio funcionais</b>	<b>44</b>
3.8.1. Ensaio de proliferação celular	44
3.8.2. Ensaio clonogênico	44
3.8.3. Ensaio de fechamento de ferida (wound healing)	44
3.8.4. Ensaio de invasão	45
3.8.5. Ensaio de indução da angiogênese	45
<b>3.9. Ensaio de viabilidade, citotoxicidade e apoptose</b>	<b>46</b>
<b>3.10. Análise estatística</b>	<b>46</b>
3.10.1. Imunohistoquímica	46
3.10.2. Demais experimentos	46
<b>4. Resultados</b>	<b>47</b>
<b>4.1. Avaliação dos componentes da via da IL-1 nas linhagens celulares: IL-1<math>\alpha</math>, IL-1<math>\beta</math>, IL-1Ra, IL-1R1, IL-1RAcP e IL-1R2</b>	<b>47</b>
4.1.1. Redução dos níveis de IL-1 $\alpha$ e IL-1 $\beta$ , transcrito e proteína	47
4.1.2. Redução dos níveis dos receptores IL-1R1, IL-1RAcP e IL-1R2, transcrito e proteína	48
4.1.3. Redução dos níveis do antagonista IL-1Ra, transcrito e proteína	49
4.1.4. Impacto do tratamento com 5-AZA na transcrição dos genes da via da IL-1	50
4.1.5. Secreção de citocinas da via da IL-1 pelos queratinócitos transduzidos	51
4.1.6. Ativação da via da IL-1 nas linhagens tumorais HPV após indução	52
<b>4.2. Avaliação dos componentes da via da IL-1 nas linhagens celulares: IL-18, IL-18BP, IL-18R<math>\alpha</math> e IL-18R<math>\beta</math></b>	<b>52</b>
4.2.1. IL-18 e IL-18BP: atividade do promotor, níveis de transcrito e proteína	52
4.2.2. Receptores de IL-18	54
<b>4.3. Ativação do Inflamassoma</b>	<b>54</b>
<b>4.4. Edição gênica de IL-18 por CRISPR-Cas9</b>	<b>55</b>
4.4.1. Ensaio Funcionais	56
<b>4.5. Avaliação histopatológica: IL-18 em amostras de câncer cervical</b>	<b>67</b>
<b>4.6. Avaliação histopatológica: caracterização do infiltrado inflamatório</b>	<b>78</b>
<b>5. Discussão</b>	<b>81</b>
<b>6. Conclusões</b>	<b>92</b>

<b>7. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>94</b>
<b>8. Anexos .....</b>	<b>103</b>

# 1. Introdução

---

O conhecimento acerca das características dos tumores evoluiu significativamente nas últimas décadas. A composição heterogênea e a importância do microambiente tumoral são, hoje, conceitos muito bem estabelecidos, que influenciam diretamente o prognóstico e a terapêutica do câncer.

O câncer é uma doença dinâmica, o que implica na possibilidade de que sejam acumuladas várias alterações durante sua progressão. Como resultado, muitos tumores são compostos por subpopulações distintas de células, heterogêneas geneticamente, e que exigem abordagens específicas. Tal conhecimento é fundamental para a redução da resistência ao tratamento e aumento da efetividade terapêutica [1].

Além de uma população de células tumorais heterogênea, a massa tumoral é composta por uma variedade de células infiltrantes não tumorais, a depender do tipo e origem do tumor, como fibroblastos, componentes celulares e secretados do sistema imunológico e vascular, fatores de crescimento e proteínas de matriz extracelular, que em conjunto compõem o microambiente tumoral. A interação entre células tumorais e microambiente é determinante para a iniciação e progressão do tumor, prognóstico e resposta à terapia. Alguns tratamentos, inclusive, são destinados a alvos específicos como fatores pró-angiogênicos, receptores celulares e bloqueadores de *checkpoints* imunes [2][3].

Schreiber e colaboradores (2011) publicaram uma revisão discutindo a dualidade do impacto do sistema imunológico no desenvolvimento e progressão do câncer: supressão e promoção tumoral. Se por um lado a resposta imune é capaz de controlar o desenvolvimento da doença, destruindo as células tumorais e inibindo seu crescimento, pode, por outro lado, promover sua progressão, favorecendo a seleção de células refratárias à resposta imune e contribuindo para o estabelecimento de um microambiente pró-inflamatório patológico, que fomenta a instabilidade celular e o acúmulo de alterações ao nível molecular e tecidual [4].

A atuação do sistema imunológico é tão marcante no contexto tumoral que propriedades como evasão do sistema imune e promoção da inflamação têm sido consideradas, por muitos pesquisadores, como “*Emerging Hallmarks of Cancer*” [5].

A diversidade e complexidade do microambiente imune tumoral, variável entre diferentes tipos de cânceres e, inclusive, heterogêneo dentro do mesmo tumor, no mesmo indivíduo, pode justificar os diferentes desfechos obtidos pela imunoterapia, tão eficaz para alguns pacientes e minimamente relevante para outros [6].

Certamente, ainda distante da completa compreensão, mas de inegável importância, a relação entre carcinogênese e resposta imunológica constitui um campo fértil para a pesquisa básica e clínica, fonte promissora de novos biomarcadores e opções terapêuticas.

### **1.1. Câncer do colo do útero**

O câncer do colo do útero é o quarto tipo de tumor mais frequente em mulheres em todo o mundo, com cerca de 570 mil novos casos em 2018 (6,6% de todos os casos de câncer em mulheres). Em 2012 foram registradas 266 mil mortes em decorrência do câncer cervical, o equivalente a uma morte a cada 2 minutos, das quais 90% ocorreram em países em desenvolvimento. Em 2018, o número de mortes registradas foi de 311 mil [7][8].

A infecção persistente por alguns tipos de Papilomavírus Humano (HPV) de alto risco oncogênico é comprovadamente uma causa necessária, embora não suficiente, para o desenvolvimento de lesões pré-malignas e malignas da cérvix uterina, além de relacionada a uma fração das neoplasias de vulva, vagina, ânus, pênis e orofaringe. Dessa forma, a vacinação e o rastreamento precoce das lesões são formas eficazes de prevenção [9].

Nos países desenvolvidos, a efetividade dos programas de Saúde Pública possibilita ações preventivas que incluem a vacinação e o rastreio de lesões pré-malignas, de relativamente fácil tratamento, capazes de prevenir até 80% dos casos de câncer cervical. Um exemplo bem sucedido e consolidado de vacinação contra o HPV é o programa australiano, um dos países pioneiros na implementação de estratégias públicas de prevenção contra a infecção, e o primeiro a criar um Programa Nacional de Vacinação para meninas e mulheres jovens, posteriormente expandido para meninos, cuja expectativa é a eliminação da infecção associada aos tipos virais incluídos na vacina, dentre os quais estão os HPV de alto risco oncogênico [8][10].

Nos países em desenvolvimento, no entanto, o acesso limitado da população, em especial a mais carente, aos programas de prevenção e rastreamento, culmina na

detecção tardia do câncer do colo do útero, cujo tratamento é mais complexo e menos eficaz, elevando as taxas de mortalidade relacionadas [8].

No Brasil, aproximadamente 16 mil novos casos de câncer cervical foram diagnosticados em 2018, configurando o segundo tipo de câncer mais frequente em mulheres entre 15 e 44 anos no país. Em 2017 foram mais de 6 mil mortes registradas [11].

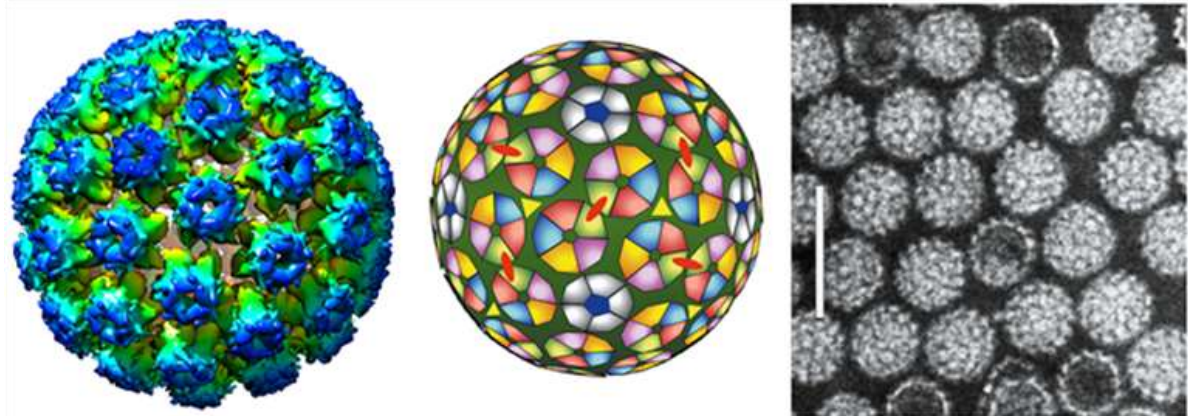
A vacina quadrivalente contra o HPV foi introduzida no Programa Nacional de Vacinação brasileiro em 2014, destinada às meninas com idade entre 9 e 13 anos, e ampliada para meninos de 11 a 13 anos em 2017. Neste período, a cobertura vacinal cumulativa foi de 45,1% para duas doses e 72,4% para ao menos uma dose. No caso dos meninos, a cobertura para ao menos uma dose foi de apenas 20,2% [12][13].

Apesar dos índices satisfatórios de vacinação contra o HPV observados nos países mais desenvolvidos, apenas 12% das adolescentes haviam sido vacinadas entre 2006 e 2014 no mundo. A população dos países em desenvolvimento, principalmente na África e Ásia, atingidos pelas maiores taxas de incidência e mortalidade do câncer cervical, permanecem vulneráveis. Nesse cenário, a vacinação pode ser a principal estratégia para reduzir as desigualdades relativas à ocorrência do câncer do colo do útero e demais doenças relacionadas ao HPV [14].

## **1.2. Papilomavírus Humano (HPV)**

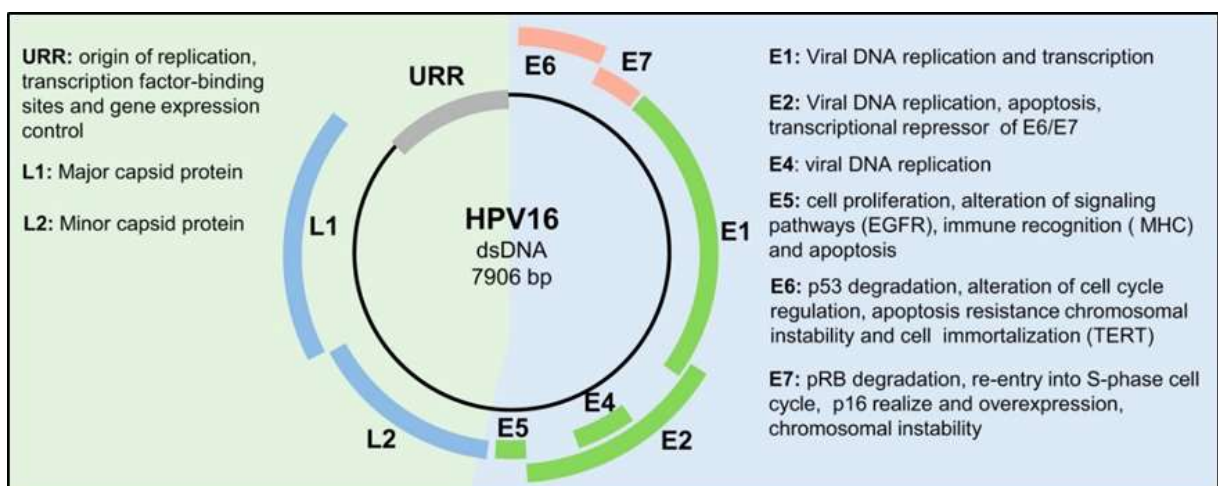
### ***1.2.1. Estrutura da partícula viral e organização do genoma do HPV***

Os papilomavírus são pequenos vírus não envelopados. O capsídeo, de simetria icosaédrica, mede cerca de 55nm e consiste de 360 cópias, arranjadas em 72 pentâmeros da proteína principal L1, e aproximadamente 12 moléculas da proteína L2 (Figura 1) [15][16].



**Figura 1 - Papilomavírus Humano.** Da esquerda para a direita: Renderização atômica de um capsídeo derivada da reconstrução da imagem obtida por microscopia crioeletrônica do HPV16; Diagrama esquemático representando os 72 capsômeros do HPV; Micrografia eletrônica de contraste negativo do HPV (barra 100nm). ICTV, 2019 [15].

Cada partícula viral contém uma única cópia de DNA de dupla fita circular de aproximadamente 7.500pb [15]. O genoma está estruturado em três regiões principais: região precoce (E), que contém genes que codificam proteínas importantes para o ciclo de replicação viral e para o processo de transformação celular, a saber: E1, E2, E4, E5, E6 e E7; região tardia (L), que codifica as proteínas L1 e L2 do capsídeo; e região longa de controle (LCR ou URR), porção não codificadora que contém a origem de replicação, sítios de ligação de fatores de transcrição, e controla a transcrição de genes virais e a replicação do DNA viral (Figura 2) [17][18].

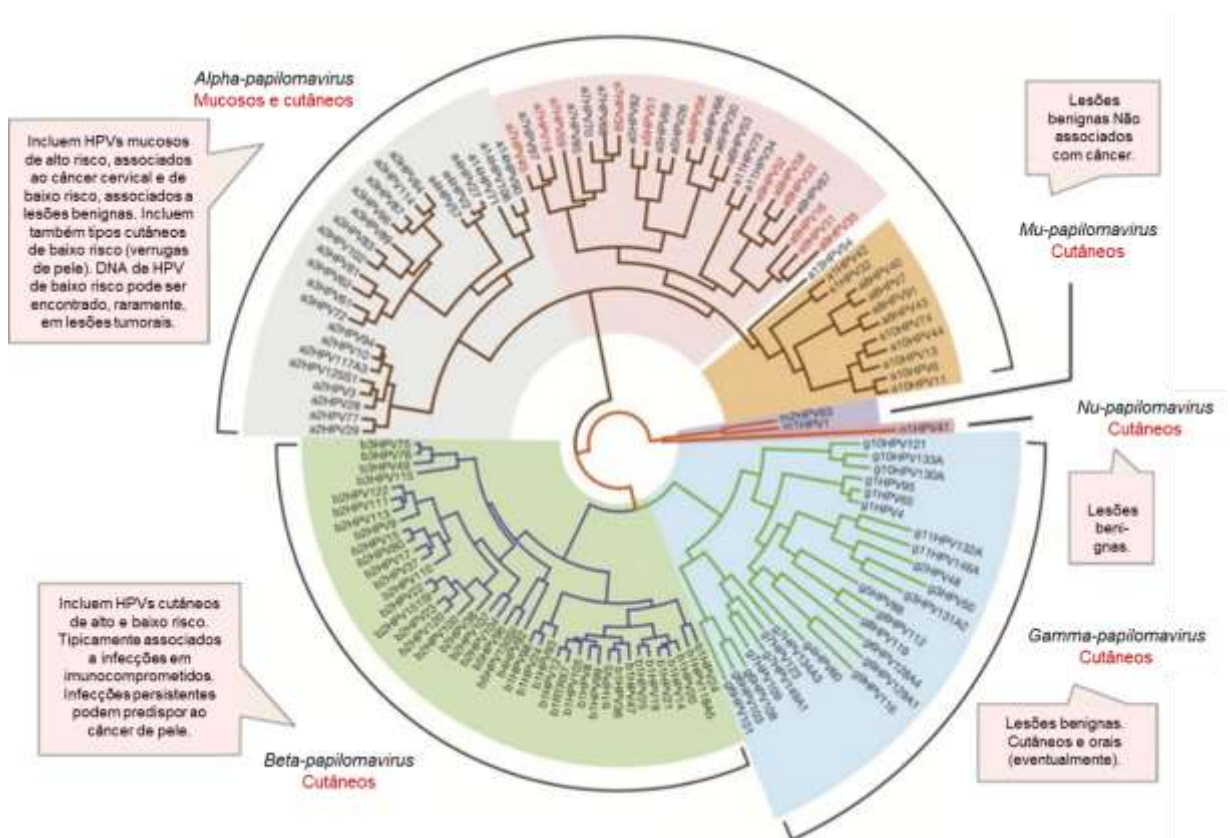


**Figura 2 - Estrutura do genoma do HPV.** Sanjosé *et al.*, 2018 [18].



### 1.2.2. Classificação dos Papilomavírus Humanos

Os HPVs pertencem à família *Papillomaviridae*. Até o momento, foram identificados mais de 200 tipos, agrupados nos gêneros Alpha-, Beta-, Nu-/Mu- e Gamma- papillomavirus de acordo com a sequência do genoma viral e tropismo pelos tecidos epiteliais humanos. De forma geral, os tipos relacionados à ocorrência de câncer anogenital pertencem ao gênero Alpha-papillomavirus, enquanto os pertencentes aos gêneros Beta- e Gamma-papillomavirus cursam, geralmente, com infecções assintomáticas, embora possam, mais raramente, estar associados ao desenvolvimento de tumores (Figura 3) [16][18].



**Figura 3 - Classificação dos HPVs.** Adaptado de Doorbar et al., 2012 [17].

Os HPVs são classificados em alto e baixo risco, conforme descrito na tabela 1. De acordo com a *International Agency for Research on Cancer (IARC)*, os HPVs de alto risco, dentre os quais os mais prevalentes são o HPV16 e 18, estão entre os agentes infecciosos classificados como carcinógenos pertencentes ao grupo 1 (que apresentam evidências suficientes entre a exposição ao agente infeccioso e a ocorrência do tumor). Os HPVs de baixo risco, dentre os quais estão o HPV 6 e 11, estão geralmente

associados às patologias benignas causadas por estes vírus, como verrugas genitais [18][19].

**Tabela 1** - Classificação dos HPVs de acordo com o risco oncogênico e doenças associadas (IARC)

Papilomavírus Humano	Genotipos	Doenças associadas
HPV de alto risco	HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59	Lesões precursoras e câncer cervicais, anais, vaginais, vulvares, penianos e orofaríngeos
HPV de baixo risco	HPV 6, 11	Verrugas genitais, papilomatose respiratória recorrente
Provavelmente carcinogênicos	HPV 68	Câncer cervical
Possivelmente carcinogênicos	HPV 5, 8	Carcinoma escamoso de pele em pacientes com epidermodisplasia verruciforme
Possivelmente carcinogênicos	HPV 26, 30, 34, 53, 66, 67, 69, 70, 73, 82, 85, 97	Incerto

**Fonte:** Adaptado de Sanjosé *et al.*, 2018 [18].

### 1.2.3. Ciclo de Replicação do HPV

Na maioria dos casos, o ciclo de replicação do HPV tem início com a infecção da camada basal do epitélio estratificado, à qual o vírus tem acesso através de microlesões epiteliais geralmente originadas durante o coito. Dessa forma, é possível a ocorrência de infecção produtiva, que culmina na liberação de novas partículas virais, e é dependente do completo programa de diferenciação dos queratinócitos [18][20].

Após a infecção das células da camada basal do epitélio, ocorre a amplificação do DNA do HPV de forma independente do ciclo celular, originando cerca de 50 a 100 cópias, mantidas na forma episomal, em número constante, e com mínima expressão do genoma viral [17]. Nesta etapa do ciclo de replicação, a expressão dos oncogenes E6 e E7 é rigorosamente controlada.

Quando os queratinócitos infectados migram para o compartimento de diferenciação do epitélio, a replicação e expressão do genoma viral, que incluem tanto genes precoces quanto tardios, acontece de forma intensa, originando milhares de cópias por célula. A montagem das partículas virais acontece nas camadas mais superficiais do epitélio, a partir das quais as novas partículas virais são liberadas, podendo, inclusive, infectar os tecidos adjacentes (Figura 4) [17][21][22].

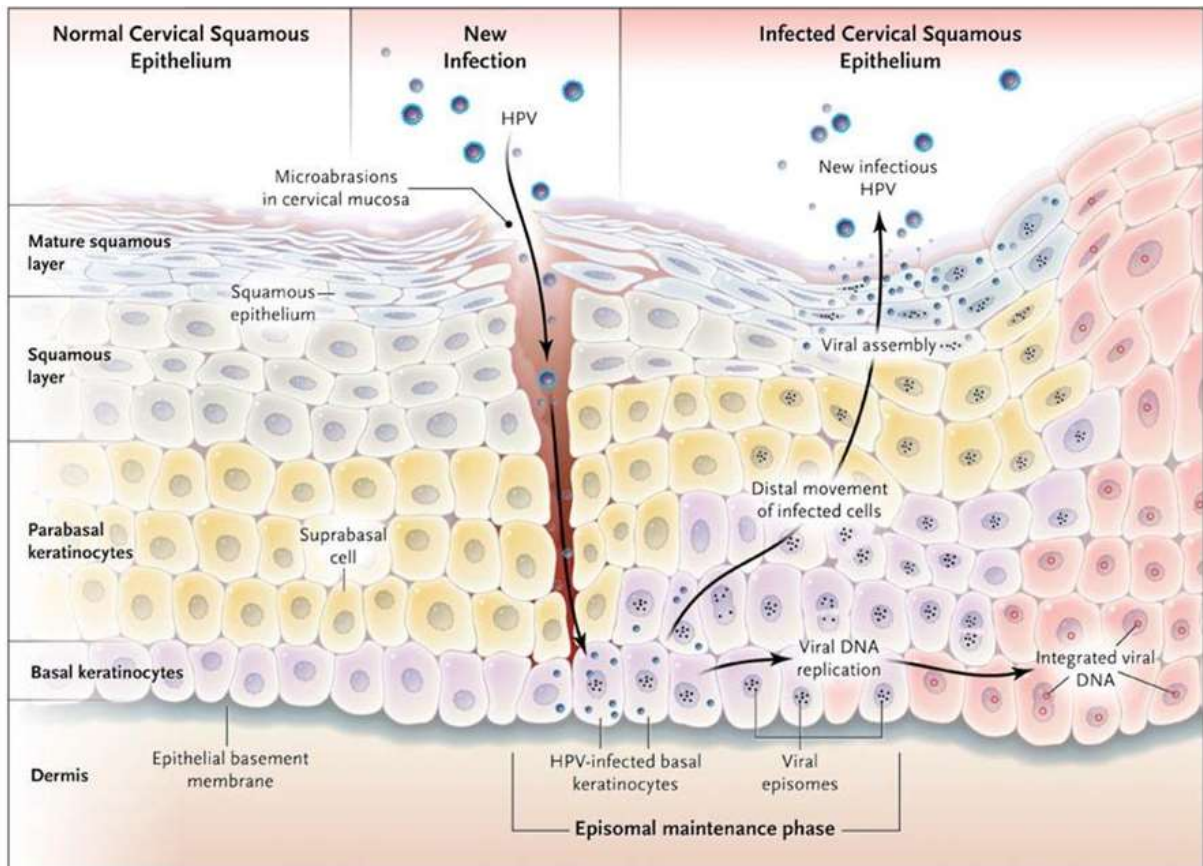


Figura 4 – Ciclo de replicação do HPV. Kahn, 2009 [22].

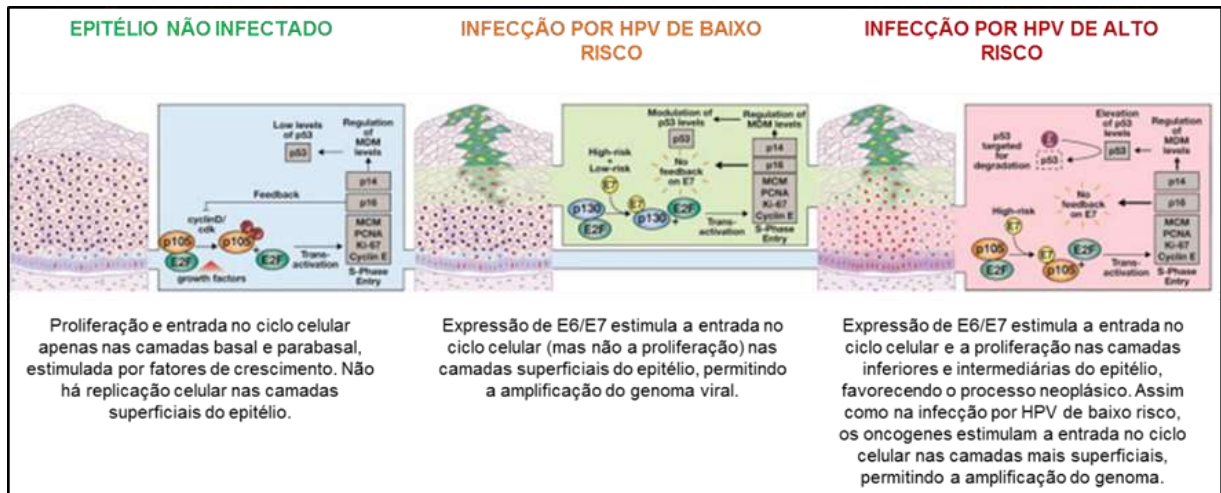
#### 1.2.4. Carcinogênese mediada pelo HPV

Na grande maioria das vezes, a infecção pelo HPV não implica na transformação maligna do epitélio. Quando isso ocorre, no entanto, o papel desempenhado pelas oncoproteínas virais E6 e E7 é fundamental para processo tumoral [18][20]. Ao contrário do observado nos HPVs de baixo risco, raramente associados aos processos neoplásicos, as oncoproteínas dos tipos de alto risco estão claramente associadas à indução da proliferação celular nas camadas basais e parabasais [17].

Enquanto os HPVs de alto risco são majoritariamente encontrados nas lesões de alto grau e tumores, os de baixo risco predominam nas lesões não malignas e verrugas genitais. Já foi demonstrado que apenas as proteínas E6 e E7 de HPV de alto risco são capazes de immortalizar células humanas *in vitro* [23].

Ao nível molecular, E6 e E7 contribuem para a carcinogênese principalmente através da inibição das proteínas supressoras de tumor p53 e pRB. Dessa forma, a infecção viral compromete a apoptose e desregula o ciclo e a proliferação celular. A oncoproteína E6 também atua promovendo a atividade da telomerase, enquanto E7

aumenta a instabilidade genômica. Em conjunto, as oncoproteínas virais favorecem a transformação da célula [18]. Cabe ressaltar o impacto da integração do genoma viral no processo de transformação celular, que geralmente implica na inativação de E2, principal proteína envolvida no controle da expressão de E6 e E7 [22][24]. A figura a seguir resume a atuação dos oncogenes dos HPVs de baixo e alto risco na infecção e transformação do epitélio (Figura 5):



**Figura 5 – Atuação dos oncogenes E6 e E7 de HPV de baixo e alto risco na infecção e transformação do epitélio em comparação com o tecido não infectado.** Adaptado de Doorbar et al., 2012 [17].

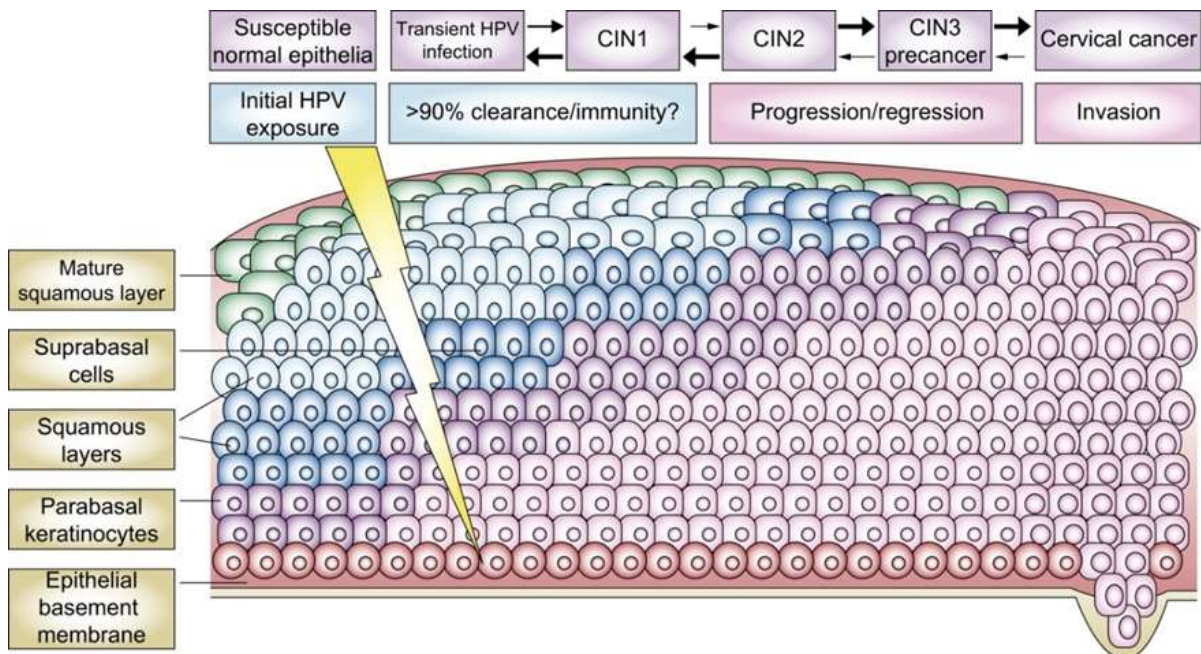
### 1.2.5. Alterações intraepiteliais associadas à infecção persistente pelo HPV

A progressão desde a infecção pelo HPV até o desenvolvimento do câncer cervical é caracterizada por alterações intraepiteliais. As neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC) representam alterações histológicas no tecido epitelial, potencialmente precursoras do câncer de colo do útero [25].

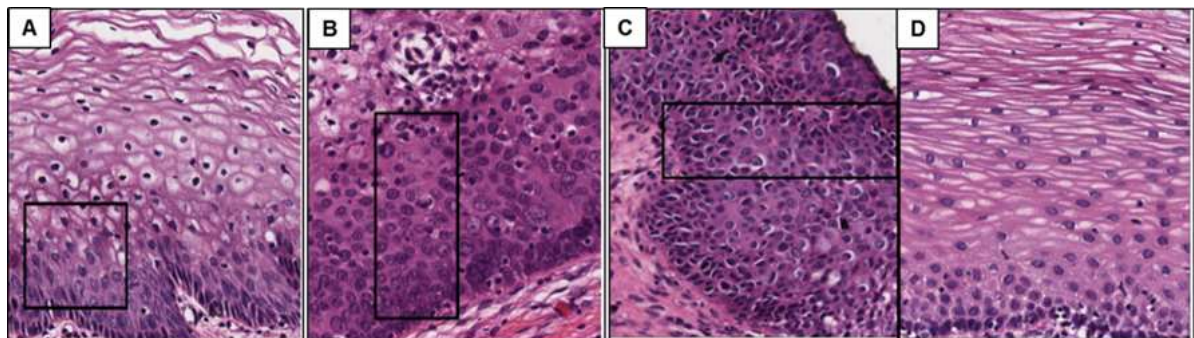
De acordo com o grau de comprometimento do epitélio, são classificadas em NIC1, 2 e 3. As lesões de grau 1 são caracterizadas por displasia leve e presença de anormalidades no terço inferior do epitélio. As NIC2 apresentam displasia moderada e anormalidades celulares nos dois terços inferiores do epitélio. Displasia severa e alterações em praticamente toda a camada epitelial caracterizam as NIC3 (Figuras 6 e 7) [22][26][27].

Entre 70 a 90% das neoplasias intraepiteliais de grau 1 regredem espontaneamente, independentemente do tratamento, e a evolução para lesões de maior grau é rara. As lesões de grau 2 apresentam-se de forma muito heterogênea entre as pacientes, tanto do ponto de vista histológico quanto prognóstico, e podem tanto

regredir (a maioria) quanto progredir. Há, inclusive, um debate sobre se as NIC2 devem ser consideradas como lesões de baixo ou alto grau [25].



**Figura 6 – Alterações intraepiteliais associadas à infecção pelo HPV (representação gráfica).** Mariewheeler, 2008 [25].



**Figura 7 - Alterações intraepiteliais associadas à infecção pelo HPV (cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina).** A) NIC1; no detalhe, alterações celulares no terço inferior do epitélio cervical. B) NIC2; no detalhe, alterações celulares nos dois terços inferiores do epitélio cervical. C) NIC3; no detalhe, alterações celulares em toda a extensão do epitélio cervical. D) Epitélio normal. Adaptado de O'Leary *et al.* 2018 [27].

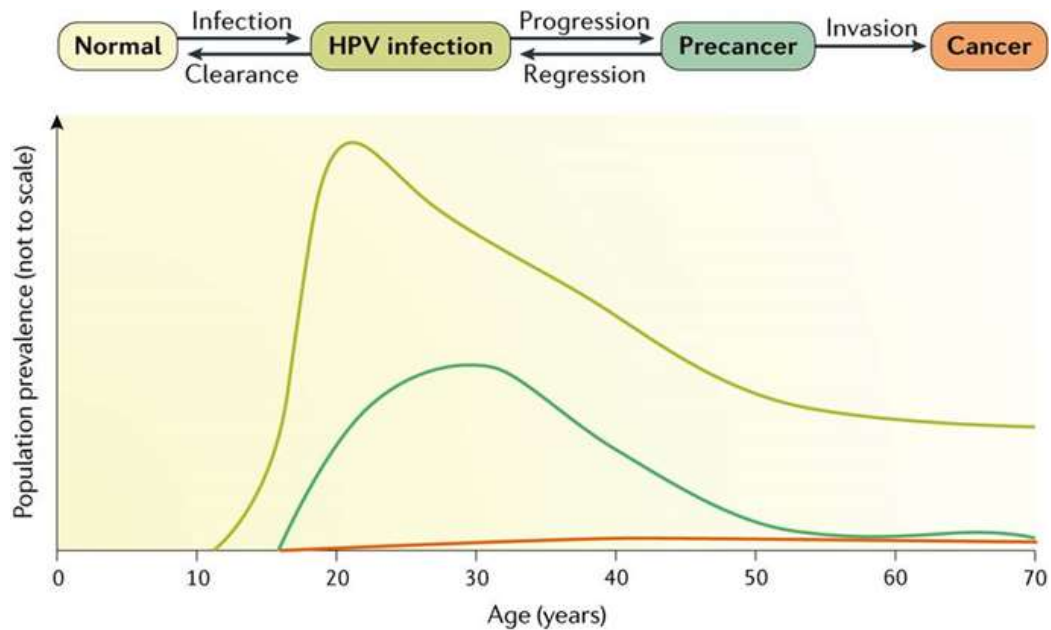
### 1.3. História natural da infecção pelo Papilomavírus Humano

A transmissão do HPV é predominantemente sexual. De forma geral, as infecções são assintomáticas e transitórias, eliminadas naturalmente pelo sistema imune do hospedeiro dentro de 1 a 2 anos. No entanto, uma pequena fração das infecções, em especial as causadas por HPVs de alto risco oncogênico, podem persistir e contribuir

para o acúmulo de alterações moleculares associadas ao desenvolvimento de lesões intraepiteliais e câncer [18][19][28].

A maioria das mulheres é infectada no início da vida sexual, e o pico de prevalência ocorre por volta dos 25 anos de idade, apresentando uma queda significativa após esta faixa etária.

Estudos transversais têm apontado para a existência de um segundo pico de incidência de infecção em mulheres de idade mais avançada, período que também coincide com a ocorrência máxima de lesões de alto grau e pré-câncer decorrentes de infecções persistentes adquiridas no início da vida sexual. Um platô representativo da ocorrência de câncer invasivo pode ser observado, principalmente, a partir dos 40 anos de idade (Figura 8) [29][30].



**Figura 8 - Prevalência da infecção pelo HPV e lesões associadas.** Schiffman *et al.*, 2016 [30].

Além da infecção pelo HPV, predominantemente os tipos de alto risco oncológico, a contribuição de determinados cofatores é fundamental para a persistência viral e progressão das lesões associadas. Tais variáveis podem ser inerentes ao vírus, ao hospedeiro, ou de natureza comportamental, e incluem: características genéticas e epigenéticas dos diferentes tipos de HPV; persistência viral; resposta imune do hospedeiro; fatores comportamentais como fumo; multiparidade; e uso prolongado de contraceptivos orais [30][31][32][33].

## 1.4. HPV e Câncer

O HPV está associado, virtualmente, a 100% dos tumores cervicais, e a uma proporção importante dos tumores de cabeça e pescoço, vulva, vagina, pênis e ânus, conforme apresentado na tabela 2 [34].

**Tabela 2 – Fração dos tumores atribuída ao HPV**

	Type of studies used for AF estimation	Laboratory method	Population and AF (95% CI)
<b>HPV (high-risk types)</b>			
Cervix uteri carcinoma (C53)	Case-control	DNA PCR	World: 100%
Penile carcinoma† (C60)	Case-control	DNA PCR	World: 51% (47–55)
Anal carcinoma† (C21)	Case-control	DNA PCR with p16 <sup>INK4</sup>	World: 88% (85–91)
Vulvar carcinoma† (C51)	Case-control	DNA PCR with p16 <sup>INK4</sup>	Age 15–54 years: 48% (42–54) Age 55–64 years: 28% (23–33) Age ≥65 years: 15% (11–18)
Vaginal carcinoma† (C52)	Case-control	DNA PCR	World: 78% (68–86)
Carcinoma of the oropharynx, including tonsils and base of tongue† (C01, C09–10)	Case-control	PCR for DNA and HPV E6/E7 mRNA expression	North America: 51% (41–57) Northwest Europe: 42% (34–47) East Europe: 50% (39–57) South Europe: 24% (17–30) China: 23% (17–27) Japan: 46% (39–59) India: 22% (5–44) South Korea: 60% (46–70) Australia: 41% (32–47) Elsewhere: 13% (5–23)
Cancer of the oral cavity† (C02–06)	Case-control	PCR for DNA and HPV E6/E7 mRNA expression	World: 4.3% (3.2–5.7)
Laryngeal cancer (C32)	Case-control	PCR for DNA and HPV E6/E7 mRNA expression	World: 4.6% (3.3–6.1)

AF=attributable fraction. HPV=human papillomavirus. EBV=Epstein-Barr virus. \*In situ. †These subtypes were not directly available in GLOBOCAN 2012; therefore, data from the Cancer Incidence in Five Continents (CI5-X) database were used to estimate the corresponding incidence. †NS=not shown because country-specific estimates were used (appendix). †N/A=not available because a different method was used to calculate AF.

Fonte: Plummer *et al.*, 2016 [35].

## 1.5. Resposta imune à infecção pelo HPV

As infecções virais, de forma geral, são bastante imunogênicas, em especial as líticas. O HPV, no entanto, exibe mecanismos de evasão da resposta imune que possibilitam o estabelecimento de infecção persistente, permitindo que o ciclo de replicação viral, relativamente lento, possa ser completo. Em determinadas situações, a persistência viral pode cursar com alterações histológicas características de lesões epiteliais de baixo e alto grau e câncer [36].

Tanto a resposta imune inata quanto a adaptativa, estão envolvidas no controle da infecção pelo HPV, representadas por citocinas e quimiocinas, células imunes inatas, células T e anticorpos. Ainda que passíveis de persistência por longos períodos (em média 1,5 ano), a maioria das infecções é eliminada pelo sistema imunológico do hospedeiro, e apenas uma minoria dos indivíduos infectados evolui com quadro de câncer [37].

### 1.5.1. Mecanismos imunes de controle da infecção pelo HPV

Embora possam persistir por vários anos em alguns indivíduos, permitindo a promoção de alterações celulares mediadas pelas oncoproteínas virais, as infecções pelo HPV, na grande maioria das vezes, são transientes, eliminadas após alguns meses pelo sistema imune do hospedeiro. Cerca de 90% dos indivíduos imunocompetentes elimina a infecção dentro de três anos, e apenas 1% desenvolve câncer cervical [38].

Dentre as células apresentadoras de antígenos (APCs), as células de Langerhans (LCs), altamente especializadas, são as que detêm maior acesso ao epitélio, sendo, portanto, capazes de detectar a produção das proteínas virais. As demais APCs, incluindo células dendríticas (DCs) e macrófagos, localizadas predominantemente na derme, têm acesso restrito ao vírus, cujo ciclo de replicação é epitélio-dependente [39].

Cabe ressaltar, também, que os próprios queratinócitos, células-alvo da infecção pelo HPV, são considerados células imunes não profissionais, aptas, por exemplo, à produção de diversas citocinas importantes. Ainda assim, alguns dos mecanismos de evasão do vírus incluem a redução da capacidade de ativação da resposta imune pelas LCs e da expressão de E-caderinas, o que leva à diminuição da população de LCs no epitélio [39][40][41].

As APCs deslocam-se até os linfonodos, onde os antígenos virais são apresentados via complexo de histocompatibilidade principal de classe 2 (MHC II), promovendo a diferenciação de linfócitos TCD4+ em linfócitos T *helper* (Th) e ativando a resposta imune adaptativa. Os linfócitos Th ativados diferenciam-se em Th1 ou Th2, funcionalmente envolvidos na resposta imune mediada por células ou na resposta imune humoral, respectivamente. Soma-se a isso a ativação de DCs e macrófagos pela ligação de componentes virais, como DNA de fita simples, RNA ou motivos CpG, aos receptores do tipo *Toll* (TLRs), estimulando a expressão de genes e a produção de citocinas inflamatórias como interleucina-1 (IL-1), interleucina-18 (IL-18), interleucina-6 (IL-6), interleucina-12 (IL-12) e fator de necrose tumoral (TNF), também fundamentais para a resposta adaptativa [39].

Linfócitos TCD8+ também são ativados via MHC de classe I, por intermédio das mesmas DCs, diferenciando-se em linfócitos T citotóxicos (CTL) que, na presença de citocinas Th1 (IL-2, IL-12 e IFN- $\gamma$ ), tornam-se células T efectoras, capazes de eliminar células que expressam os antígenos do HPV, inclusive tumorais [39][38].



A resposta humoral direcionada contra o HPV envolve a estimulação de células B de memória pela interação direta, via CD-40, com linfócitos Th2 ou, indiretamente, pela ação de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-6. Os linfócitos B diferenciam-se em plasmócitos, capazes de produzir anticorpos contra proteínas do HPV como E2, E4, E6, E7, L2 e, principalmente, L1. No entanto, os níveis de anticorpos produzidos após a infecção natural pelo vírus são geralmente baixos, podendo não ser detectáveis em todos os indivíduos. Ao contrário, os anticorpos anti-L1 (neutralizantes), produzidos após a vacinação profilática com *virus-like particles* (VLPs), são detectados em maior número e por um período muito superior [42].

### 1.5.2. HPV: mecanismos de evasão da resposta imune

Uma das principais características do HPV é a capacidade de causar infecções persistentes, para a qual contribuem várias características do ciclo de replicação viral, bem como sua interação com as células epiteliais e componentes do sistema imune.

#### *1.5.2.1. Mecanismos inerentes ao ciclo de replicação viral*

As características do ciclo de replicação do HPV contribuem para que a infecção seja menos perceptível ao sistema imunológico do hospedeiro. A expressão dos genes precoces virais, inclusive dos principais oncogenes E6 e E7, é estritamente controlada, tanto ao nível transcricional quanto traducional, ao menos no início da infecção. A progressão da doença e a integração do DNA viral ao genoma do hospedeiro, geralmente acompanhada da ruptura do gene E2, leva à maior expressão dos genes precoces, e nesta etapa, maior produção de imunógenos virais [24].

Outros fatores importantes incluem o fato de que a maior expressão das proteínas do HPV, bem como a liberação dos vírions, acontecem nas camadas mais superficiais do epitélio, onde o acesso dos componentes imunológicos é menor. Além disso, a infecção não provoca lise celular [20].

#### *1.5.2.2. Alteração da expressão gênica das células hospedeiras*

Já foi descrita a relação entre o HPV e alterações nos padrões de metilação gênica e modificação de histonas. A oncoproteína E7 pode associar-se, por exemplo, à DNA metiltransferase I (DNMT1), ativando-a [43]. A hipermetilação geralmente implica na redução dos níveis de transcrição, como observado no caso do promotor de CXCL14, uma importante quimiocina envolvida na atração de células *natural killer* (NK), linfócitos T e DCs [44]. E7 também pode levar à hipermetilação do promotor de E-

caderina, proteína envolvida na adesão celular e na migração das DCs através do epitélio [45]. E6 pode interferir na transcrição de Interferon- $\kappa$  (IFN- $\kappa$ ) em queratinócitos e DCs, comprometendo, também, a resposta antiviral [46].

Outro importante mecanismo epigenético é a modificação de histonas. Foi descrito que a proteína E7 de HPV38 e HPV16 reduz a expressão de *Toll-like receptor 9* (TLR9) ao recrutar proteínas que interferem na metilação e acetilação de histonas. O resultado é a menor capacidade de detecção do DNA viral pelas células infectadas [47][48].

#### 1.5.2.3. Interações entre proteínas virais e celulares

Os queratinócitos são considerados células sentinelas do sistema imunológico, não somente pelo seu papel estrutural na constituição da pele, primeira barreira do organismo à entrada de patógenos, mas também por produzirem grande variedade de receptores, fatores de transcrição, citocinas, entre outras moléculas capazes de ativar a resposta imune. Neste contexto, já foi descrita a interação de E6 e E7 de HPV16 e 18 com os fatores de resposta a interferons (IRFs) e com o sistema *cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate syntase-stimulator of interferon genes* (cGAS-STING), comprometendo a expressão dos genes induzidos por IFN. Cabe ressaltar que a sinalização via IFN tem importante papel na resposta antiviral [49][50][51][20].

#### 1.5.2.4. Processamento de antígenos

Foi referida a interferência das oncoproteínas de HPV16 e 18 em diversas etapas do processamento de antígenos, desde a formação do imunoproteossoma, transporte dos peptídeos processados até o retículo endoplasmático, clivagem e apresentação via HLA, provocando efeito direto na resposta citotóxica específica contra o vírus mediada por linfócitos T CD8<sup>+</sup> [52][53][54][55].

#### 1.5.2.5. Ação sobre células do sistema imunológico

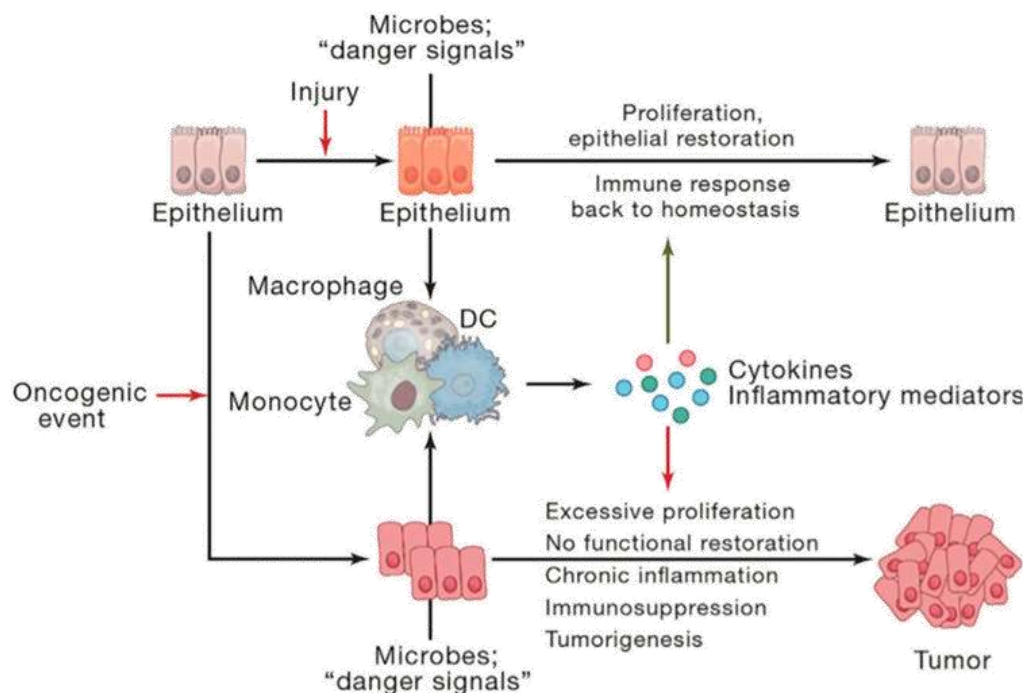
Estudos mostraram que *HPV virus-like particles* (VLPs) não foram capazes de ativar LCs de forma efetiva, com conseqüente comprometimento da resposta mediada por linfócitos T CD8<sup>+</sup> [56][20]. Também foi observado que o vírus pode modular a produção de citocinas envolvidas na polarização Th1/Th2 da resposta imune. Aparentemente, há o predomínio da resposta Th2 no estágio inicial das lesões associadas ao HPV, concomitantemente à redução das respostas Th1 mediadas por

IFN, favorecendo a persistência e progressão da doença. Nas lesões intraepiteliais de alto grau, ambas as respostas são observadas de forma não coordenada [57].

No que tange aos tumores associados ao HPV, assim como observado em outros tipos de câncer, pode ser observado um microambiente composto por células e citocinas de fenótipo imunossupressor, como macrófagos associados a tumor (*tumor associated macrophages* – TAMs), células supressoras de origem mieloide (*myeloid-derived suppressor cells* – MDSCs) e células T regulatórias (Tregs), além de interleucina-10 (IL-10) e fator beta de crescimento tumoral (*tumor growth factor-beta* – TGF $\beta$ ) [58][59].

### 1.6. Inflamação e câncer

Em condições normais e bem reguladas, a inflamação é benéfica e fundamental para o controle de infecções e danos celulares, e pode atuar de forma antitumoral. No entanto, quando crônico, o processo inflamatório é potencialmente pró-tumoral, predispondo as células à transformação através da indução de instabilidade genômica e alterações epigenéticas, promoção da angiogênese e da proliferação celular, favorecendo a iniciação e progressão tumoral, além do desenvolvimento de metástases (Figura 9) [60].



**Figura 9 - Diferentes desfechos da inflamação e interação entre mediadores inflamatórios e tumorais** Greten *et al.*, 2019 [61].

Deve ser considerado que o microambiente tumoral é muito complexo. A interação entre células tumorais, células imunes e demais componentes celulares e solúveis do microambiente tumoral provoca alterações fenotípicas e funcionais constantes. A depender de tais interações, o desfecho da resposta pode ser anti ou pró-tumoral [61].

### 1.7. Via da interleucina-1

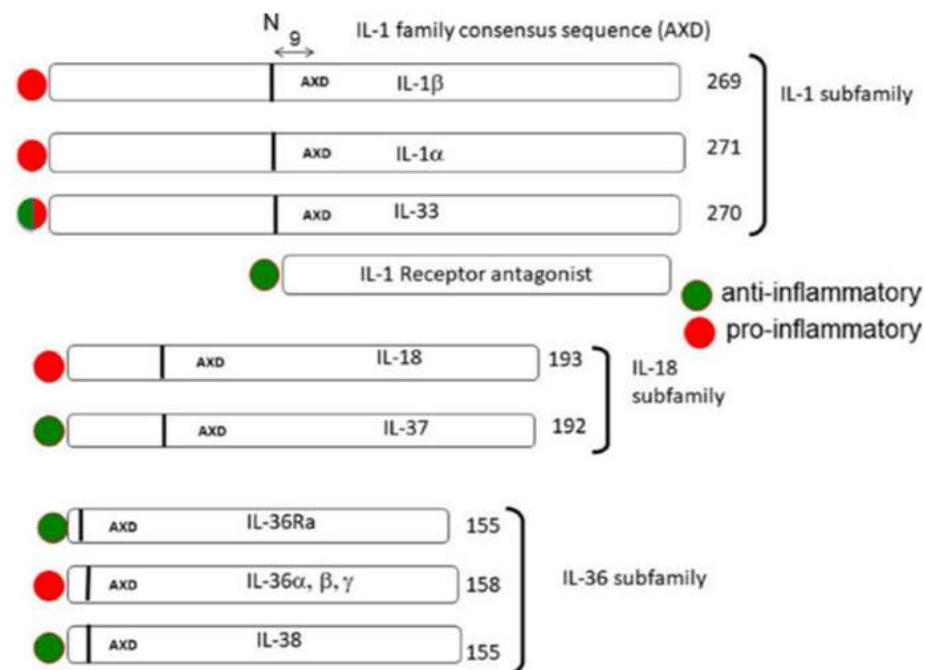
A família da Interleucina-1 (IL-1) compreende 11 ligantes e 10 receptores (Tabela 3), sendo os ligantes codificados, em humanos, por 11 genes distintos (*IL1A*, *IL1B*, *IL1RN*, *IL18* e *IL1F5* a *IL1F11*) [62]. A nomenclatura inicial baseava-se no termo “*IL-1 family*”, e as citocinas foram identificadas como IL-1F1 a 11. Em 2010, Dinarello e colaboradores, considerando a semelhança entre sua ligação aos receptores e sinalização, propuseram uma nova nomenclatura, de acordo com a qual IL-1F1 a IL-1F11 foram designadas, respectivamente, como IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1Ra, IL-18, IL-36Ra, IL-36 $\alpha$ , IL-37, IL-36 $\beta$ , IL-36 $\gamma$ , IL-38 e IL-33 [63]. A representação estrutural básica dos ligantes é apresentada na figura 10.

**Tabela 3** – Família da interleucina-1 (ligantes e receptores)

IL-1 family	Specific receptor	Coreceptor	Function
IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$	IL-1R1	IL-1R3	Pro-inflammatory
IL-1 $\beta$	IL-1R2	IL-1R3	Anti-inflammatory
IL-1Ra	IL-1R1	NA	Anti-inflammatory
IL-18	IL-1R5	IL-1R7	Pro-inflammatory
IL-33	IL-1R4	IL-1R3	Pro-inflammatory
IL-36 $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$	IL-1R6	IL-1R3	Pro-inflammatory
IL-36Ra	IL-1R6	IL-1R3	Anti-inflammatory
IL-37	IL-1R5	IL-1R8	Anti-inflammatory
IL-38	IL-1R6	IL-1R9	Anti-inflammatory

\*NA: Não se aplica.

**Fonte:** Dinarello, 2018 [62].



**Figura 10 - Subfamílias da IL-1.** São representados os precursores de cada citocina, seguidos pelo número de aminoácidos à direita. São indicadas as sequências consenso (AXD), bem como os 9 aminoácidos que as precedem. A região N-terminal é indicada pela barra vertical. IL-1Ra apresenta um peptídeo de sinal, e é diretamente secretada. Dinarello, 2018 [62].

A principal função desta família de citocinas é participar do controle das reações pró-inflamatórias desencadeadas, por exemplo, por padrões moleculares associados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns* – PAMPs), como produtos de origem bacteriana ou viral, ou padrões moleculares associados a danos (*damage- or danger associated molecular patterns* – DAMPs), liberados por células submetidas a algum tipo de dano ou injúria [64].

A participação dos membros da família da IL-1 no processo de recrutamento dos componentes do sistema imune em resposta a danos ou infecções é associada à homologia entre seus receptores e os receptores do tipo *Toll* (TLR), o que caracteriza estas citocinas como importantes componentes da resposta imune inata [62].

O domínio intracitoplasmático do receptor do tipo I de IL-1 (IL-1R1), denominado *Toll interleukin-1 receptor (TIR) domain*, é muito semelhante estrutural e funcionalmente ao observado nos receptores do tipo *Toll*. A ativação de ambos induz, como resposta, a produção de citocinas, quimiocinas, ciclooxigenase-2 (COX-2), moléculas de adesão, óxido nítrico (NO), entre outras moléculas [62]. As vias de sinalização intracelular iniciadas pela ativação dos receptores da família da IL-1 e TLR é apresentada na figura 11.

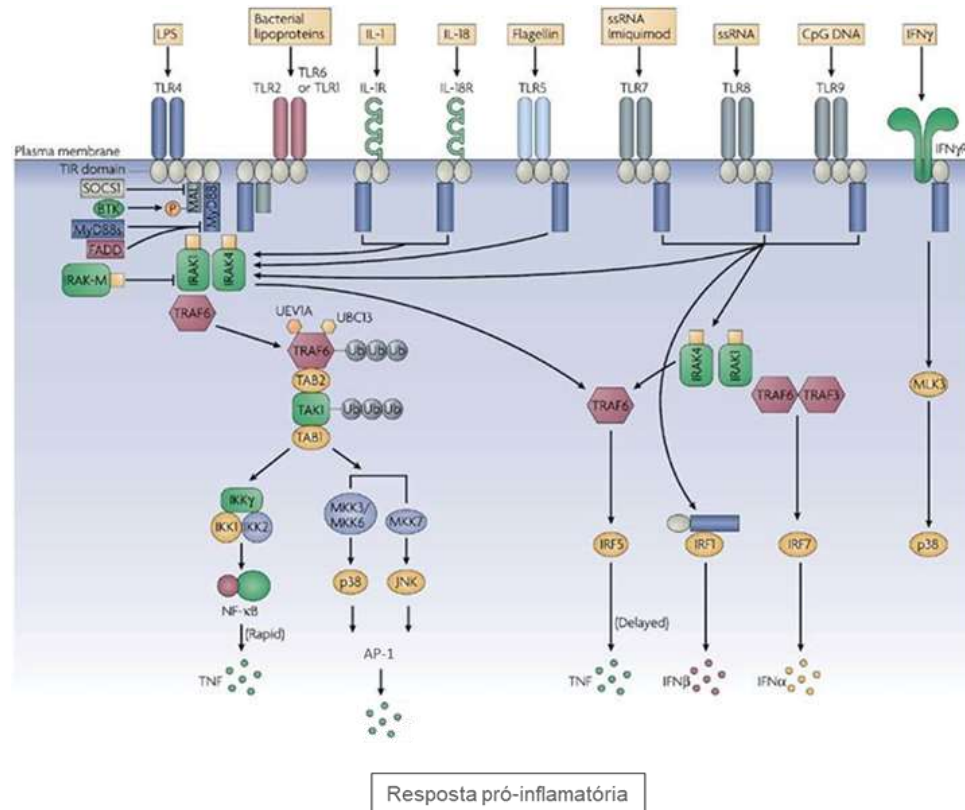


Figura 11 - Mapa da cascata de sinalização de IL-1, IL-18 e TLR. O'NEILL & BOWIE, 2007 [65].

### 1.7.1. Interleucina-1 alfa e interleucina-1 beta

As citocinas da família da IL-1 são importantes mediadores da inflamação, principalmente da resposta imune inata. O envolvimento de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (pró-inflamatórias) em doenças de base inflamatória, autoimunes e câncer já foi descrito [64].

Os genes que codificam para IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  localizam-se em sequência, no cromossomo 2. Embora com homologia menor que 30%, apresentam estrutura tridimensional semelhante, ligam-se aos mesmos receptores de superfície celular e medeiam atividades biológicas similares. São produzidas, principalmente, por monócitos e macrófagos ativados, além de neutrófilos, queratinócitos, linfócitos, células do músculo liso, fibroblastos, células epiteliais e endoteliais [66].

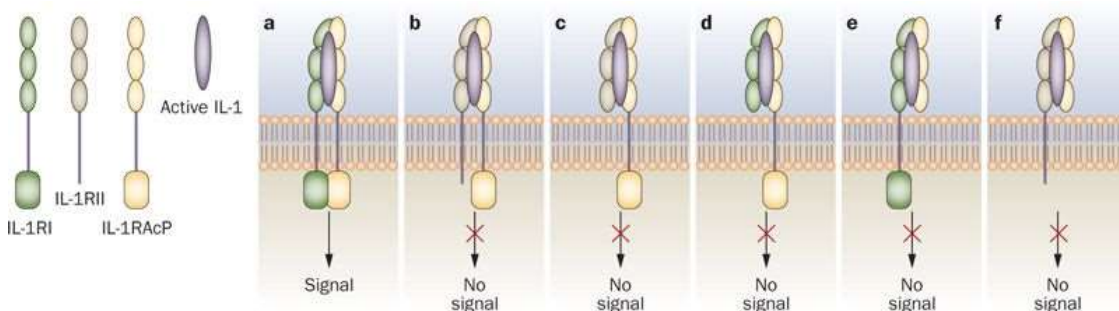
Ambas as citocinas são sintetizadas na forma de seus precursores de 31kDa. A maturação do precursor de IL-1 $\beta$  para sua forma ativa de 17kDa ocorre pela ação da caspase-1, regulada por um complexo proteico multimérico citosólico chamado inflamassoma. O inflamassoma é composto pela caspase-1, pela proteína adaptadora ASC, e por um domínio proteico pertencente à família dos *NOD-like receptors* (NLR), ativado por padrões moleculares de dano celular ou associados a patógenos [67][68].

Em contrapartida, IL-1 $\alpha$  parece não requerer a ativação do inflamassoma, e tanto seu precursor quanto a forma clivada apresentam atividade [66] [68]. Embora a maioria das células não produza IL-1 $\alpha$  constitutivamente em condições normais, os queratinócitos são uma exceção, e podem armazenar esta citocina em quantidades importantes, disponíveis para liberação local em caso de infecção ou lesão [69].

Enquanto IL-1 $\alpha$  é encontrada principalmente associada à membrana, embora a secreção desta citocina tenha sido relatada por alguns autores [69], IL-1 $\beta$  apresenta atividade autócrina, parácrina e sistêmica. Ambas as citocinas compartilham os mesmos receptores: receptor do tipo I de interleucina-1 (IL-1R1), constitutivamente expresso em diversos tipos celulares; e o receptor acessório de IL-1 (IL-1RAcP), também fundamental na resposta mediada por esta via [62].

Outras duas proteínas estão envolvidas na inibição da via da IL-1: o antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra), que compete com os agonistas da via (IL-1- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ); e o receptor do tipo 2 de IL-1 (IL-1R2), ou receptor *decoy*, que carece do domínio TIR intracitoplasmático, e cuja ligação às formas ativas da IL-1 não induz resposta celular. O equilíbrio entre reguladores positivos e negativos da via exerce papel importante no controle da inflamação induzida pela IL-1 [70].

Todos os receptores são, também, encontrados na forma solúvel. Neste caso, sua ligação à IL-1 não implica na sinalização da via, e atua como forma de controle da resposta inflamatória. Os receptores da via da IL-1 são representados na figura 12.



**Figura 12 - Receptores solúveis e de membrana da via da IL-1.**

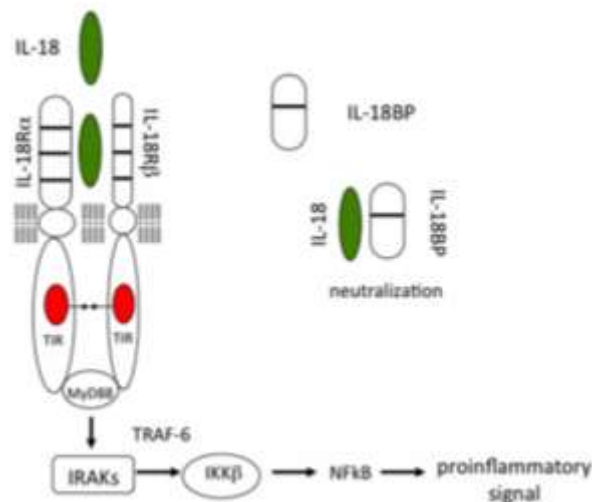
Em condições não efetivas, a atividade pró-inflamatória da IL-1 está relacionada ao seu papel na promoção da carcinogênese e iniciação e progressão tumoral. Neste caso, a citocina favorece o desenvolvimento de um microambiente inflamatório crônico e induz angiogênese, recrutamento de macrófagos associados ao tumor e de células

supressoras mieloide derivadas (MDSC), indução da resposta Th17, invasão e metástase. Estudos indicam que o bloqueio de IL-1 pode reduzir as complicações sistêmicas, além de prevenir a incidência e mortalidade relacionadas a alguns tipos de câncer [71][72][73].

### 1.7.2. Interleucina-18

Outra citocina pró-inflamatória de grande importância, que faz parte da família da IL-1, é a interleucina-18 (IL-18). Assim como IL-1 $\beta$ , IL-18 está relacionada a uma variedade de processos inerentes à resposta imune inata e adaptativa. Também produzida sob a forma de seu precursor de 24kDa (inativo), sua ativação ocorre de forma semelhante à da IL-1 $\beta$ , através da ação da caspase-1 via complexo do inflamassoma, que origina a proteína madura de 18kDa [74].

O complexo que forma o receptor de IL-18 (IL-18R) é constituído por duas cadeias denominadas IL-18R $\alpha$  e IL-18R $\beta$ . A proteína ligante de IL-18 (*Interleukin-18 Binding Protein* - IL-18BP), que é secretada, atua como regulador negativo da via, ligando-se à IL-18 e impedindo sua interação com o receptor (Figura 13) [74].



**Figura 13 - Ligantes e receptores de IL-18.** Adaptado de Dinarello *et al.*, 2013 [74].

A IL-18 é produzida por uma diversidade de células de origem linfóide e não linfóide, inclusive queratinócitos. Desempenha importante papel na regulação dos processos inflamatórios, e há evidências de seu envolvimento tanto nas respostas Th1 quanto Th2. Em combinação com a interleucina-12 (IL-12), ativa linfócitos T citotóxicos



(CTLs) e células NK, induzindo a produção de interferon gama (IFN $\gamma$ ). Dessa forma, é importante nos mecanismos de defesa contra vírus e bactérias intracelulares, e pode contribuir para a resposta imune tumoral, o que já foi apontado em alguns estudos envolvendo modelos animais, nos quais a administração de IL-18 foi associada à regressão do tumor [75][76][77].

No entanto, estudos também associam a IL-18 à progressão tumoral, promoção da angiogênese e desenvolvimento de metástases, através da supressão de CD70, que favorece a evasão do sistema imune pelo tumor, e aumento de CD44 e do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), enfatizando a dualidade de suas funções no contexto tumoral [78].

### **1.8. HPV e via da interleucina-1**

Embora várias publicações discutam a relação entre as citocinas da via da IL-1 e o câncer, os resultados ainda são contraditórios. Em se tratando da relação entre IL-1 e HPV, no entanto, os dados da literatura apontam para o controle da expressão desta citocina pelo vírus como uma estratégia de evasão imunológica, que culmina na persistência viral e maior propensão ao desenvolvimento do câncer. Considerando a magnitude de mediadores inflamatórios, além da IL-1, envolvidos na resposta à infecção (TNF, IFN, TGF $\beta$ , entre outros), fica clara a complexidade das interações e o potencial tanto de prevenir e eliminar infecções quanto de promover a persistência viral e a progressão de lesões associadas [79]

Merrick e colaboradores, em 1996, demonstraram que a indução da expressão de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  em linhagens tumorais associou-se à inibição moderada da tumorigênese. Quando co-injetadas linhagens não tumorais produtoras de IL-1 e linhagens tumorais em camundongos, a formação do tumor foi inibida, demonstrando a importância da expressão contínua destas citocinas no controle da progressão do câncer cervical [80].

De acordo com o trabalho publicado por Niebler *et al.* (2013), a oncoproteína E6 de HPV está envolvida na redução da ativação e secreção de IL-1 $\beta$  através da indução da degradação da citocina mediada pela ubiquitina-ligase E6-AP e indução do proteassoma [68].

Na mesma direção, mas com o envolvimento de outras vias de sinalização celular, Ainouze e colaboradores (2018) mostraram que a infecção dos queratinócitos

humanos pelo HPV induz a secreção de IL-1 $\beta$ , mas a expressão dos oncogenes virais induz o bloqueio da transcrição da citocina via inibição de IRF6 [81].

Com relação à IL-18, foi demonstrado que E6 e E7 de HPV16 inibem a produção de INF $\gamma$  induzida por IL-18 em células mononucleares do sangue periférico e células NK [82]. Além disso, a oncoproteína E7 de diversos tipos de HPV aumentou a produção do antagonista natural da citocina, IL-18BP. Uma das consequências seria o comprometimento da ativação de linfócitos TCD4+, uma possível estratégia de evasão imunológica [83].

A análise dos níveis de RNA mensageiro de IL-1 $\beta$  e IL-18 em biópsias cervicais de pacientes diagnosticadas com lesões intraepiteliais de baixo grau, alto grau e câncer apontou para o aumento do risco de progressão tumoral em 2,5 e 2,08 vezes em mulheres com baixa expressão de IL-1 $\beta$  e IL-18, respectivamente [84].

Por fim, estudo desenvolvido por Pontillo e colaboradores (2016), demonstrou que determinados polimorfismos em *IL1* e *IL18*, assim como em outros genes associados ao inflamassoma, podem interferir na suscetibilidade à infecção pelo HPV, persistência viral e progressão tumoral [85].

### **1.9. Opções terapêuticas para o tratamento do câncer cervical relacionadas à IL-1 e IL-18**

O envolvimento de IL-1 e IL-18 em diversos tipos de tumores além dos cervicais já foi descrito na literatura, e abriu uma gama de possibilidades para o uso terapêutico destas citocinas no tratamento do câncer. [86][87]. As tabelas abaixo apresentam alguns estudos clínicos que incluem potenciais terapias envolvendo as citocinas discutidas acima (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4 – Ensaios clínicos envolvendo inibidores da IL-1

Name Other/previous names	Company	Target molecular mechanism	Cancer indication	Most advanced phase	Status	Trial number
Xilonix	Xbiotech	IL-1 $\alpha$	Pancreatic cancer with cachexia	Phase I	Recruiting	NCT03207724
MABp1, CV-18C3, T2-18C3, RA-18C3, CA-18C3, bermekimab, lutroo		IgG1 True Human mAb	Advanced cancers NSCLC (subgroup)	Phase I	Completed	NCT01021072
			CRC	Phase III	Completed	NCT02138422
				Phase III	Completed	NCT01767857
			Hematologic malignancies	Phase I	Completed	NCT01260545
Canakinumab	Novartis	IL-1 $\beta$	NSCLC	Phase III	Not yet recruiting	NCT03631199
				Phase III	Not yet recruiting	NCT03626545
				Phase III	Not yet recruiting	NCT03447769
					Recruiting	
			Melanoma	Phase II	Not yet recruiting	NCT03484923
Ilaris, ACZ885		Human IgG1/ $\kappa$ mAb	CRC, TNBC, NSCLC— adenocarcinoma	Phase IB	Recruiting	NCT02900664
			Atherosclerosis $\rightarrow$ lung cancer		Active, not recruiting	NCT01327846
P2D7KK	A*STAR	IL-1 $\beta$ mAb	Multiple myeloma		Preclinical phase	
Anakinra	Swedish Orphan Biovitrum AB	A recombinant, nonglycosylated IL-1Ra	Multiple myeloma	Phase II	Recruiting	NCT03233776
				Phase II	Completed	NCT00635154
			Early multiple myeloma	Phase I/II	Suspended (09/ 2018)	NCT02492750
			Pancreatic cancer	Phase I	Recruiting	NCT02550327
				Phase I	Active, not recruiting	NCT02021422
Kineret			Metastatic colorectal cancer	Phase II	Completed	NCT02090101
			Metastatic breast cancer	Phase I	Unknown	NCT01802970
			Advanced cancers	Phase I	Active, not recruiting	NCT01624766
			Metastatic adult solid tumors	Phase I	Completed	NCT00072111
IP-1510 IP-1510D	Itis Pharmaceuticals	A synthetic IL-1Ra	Cancer-related cachexia	Phase I/II		

(continua)

**Tabela 4 – Ensaios clínicos envolvendo inibidores da IL-1 (continuação)**

Name Other/previous names	Company	Target molecular mechanism	Cancer indication	Most advanced phase	Status	Trial number
Nidanilimab	Cantargia	IL-1RAP	NSCLC, PDAC, TNBC, CRC	Combined phase I/IIA	Recruiting	NCT03267316
Can-04		IgG1 True Human and ADCC enhanced mAb	Leukemia	Preclinical		
CSC012-ADC CLT012	Cellerant Therapeutics	IL-1RAP Ab–drug conjugate	Acute myeloid leukemia	Preclinical		

\**mAb*: anticorpo monoclonal, *NSCLC*: câncer de pulmão de células não pequenas, *CRC*: câncer colorretal, *TNBC*: câncer de mama triplo negativo, *PDAC*: adenocarcinoma ductal pancreático.

Fonte: Adaptado de Litmanovich *et al.*, 2019 [86].

**Tabela 5 – Ensaios clínicos envolvendo a IL-18**

Clinical trials/sponsor	Phase/status/dates	Intervention	Results/objectives
NCT00085904 (GlaxoSmithKline, Brentford, United Kingdom)	Phase I completed 2004–2008	SB-485232 (human rIL-18), administered as 5 daily i.v. infusions, repeated every 28 days in adult subjects with advanced solid tumors or lymphomas	IL-18 is biologically active (increase of IFN- $\gamma$ , GM-CSF, IL-18BP plasma levels). Disease stabilizations were observed in a fraction of patients.
NCT00085878 (GlaxoSmithKline)	Phase I completed 2004–2008	IL-18 administered as daily s.c. injections in adult patients with solid tumors	No results available
NCT00107718 (GlaxoSmithKline)	Phase II completed 2005–2010	IL-18 administered as 5 daily i.v. infusions every 28 days in subjects with previously untreated metastatic melanoma	IL-18 is well tolerated but has limited activity as a single agent (1 partial response and 4 stabilizations out of 63 patients).
NCT00500058 (GlaxoSmithKline)	Phase I completed 2007–2012	IL-18 administered by i.v. infusion in combination with Rituximab in adult patients with B cell non-Hodgkin's lymphoma	Increase in proinflammatory cytokines and chemokines; objective responses were recorded in 5 out of 18 patients
NCT00659178 (GlaxoSmithKline)	Phase I completed 2008–2012	IL-18 combined with pegylated liposomal doxorubicin in patients with epithelial ovarian cancer	The combination is safe and mediates biologic responses. Out of 10 patients, 1 partial response and 38% stable disease rate were recorded.
NCT01768338 (Indiana University, Bloomington, IN, USA)	Phase I recruiting 2013–2014	IL-18, in combination with ofatumumab, after autologous peripheral blood stem-cell transplantation for lymphoma	To evaluate the toxicity and biologic effects of IL-18 given in combination with ofatumumab
NCT02277392 (Abramson Cancer Center of the University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA)	Phase I recruiting 2014–2021	Dose escalation study of IL-18, combined with adoptive transfer of vaccine-primed, CD3/CD28- costimulated, autologous T cells following lymphodepletion for patients with recurrent ovarian, fallopian-tube, or primary peritoneal cancer	To assess the safety and biologic activity in patients with recurrent cancer, who previously underwent vaccination with whole tumor vaccine

Fonte: Adaptado de Fabbi *et al.*, 2014 [87].

No que tange ao câncer cervical, os protocolos atuais de condutas em oncologia padronizam o tratamento com cisplatina, na dose de 40mg/m<sup>2</sup> de superfície corpórea, administrada semanalmente via intravenosa (IV). A quimioterapia deve ser iniciada no D1 da radioterapia (associada à braquiterapia a depender do caso) por seis semanas, em dose total mínima de 200mg/m<sup>2</sup>. Em pacientes com contraindicação à cisplatina,

pode ser indicada a carboplatina (AUC 2, IV). Para pacientes debilitados ou que apresentem recidiva da doença, podem ser utilizados paclitaxel ( $80\text{mg}/\text{m}^2$ , IV, semanal) e vinorelbina ( $25\text{mg}/\text{m}^2$ , IV, semanal). A depender do caso, são indicados tratamentos cirúrgicos como a conização (para mulheres que desejam manter a fertilidade), histerectomia radical e linfadenectomia pélvica [88].

De acordo com o exposto acima, a avaliação da interação entre o HPV e o sistema imune tem muito a acrescentar na compreensão da infecção, tumorigênese e tratamento do câncer cervical. Embora muito tenha sido alcançado até o momento, grande parte em função do desenvolvimento de vacinas contra o vírus, ainda há muito a ser feito, principalmente no que tange à assistência às populações mais carentes, nas quais se encontram grande parte dos casos que fazem do câncer cervical a quarta causa de morte associada a tumores, a despeito dos avanços alcançados em sua prevenção, rastreamento e tratamento.

Além disso, muito do que se tem descoberto no campo do câncer cervical e sua interação com o microambiente tumoral pode ser extrapolado para outros tumores, e sem dúvida, contribuir para os avanços atuais no campo da imunoterapia, o que justifica o desenvolvimento deste estudo.

## 2. Objetivos

---

### 2.1. Objetivo geral

Realizar a análise funcional da via da IL-1 em queratinócitos transduzidos com os oncogenes de HPV16 e linhagens tumorais HPV positivas, bem como em amostras de pacientes diagnosticadas com lesões intraepiteliais cervicais e câncer cervical.

### 2.2. Objetivos específicos

Nas linhagens celulares acima mencionadas, avaliar:

- A expressão das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-18;
- Os níveis dos antagonistas naturais das vias ativadas por IL-1 e IL-18, a saber: IL-1Ra e IL-18BP, respectivamente;
- A expressão dos receptores IL-1R1, IL-1RAcP, IL-1R2, IL-18R $\alpha$  e IL-18R $\beta$ ;
- O efeito do silenciamento de IL-18 na proliferação, capacidade de formação de colônias, migração, invasão e indução da angiogênese;
- Viabilidade, citotoxicidade e indução da apoptose nas linhagens tumorais silenciadas para IL-18 após tratamento com cisplatina.

Nas amostras provenientes de pacientes diagnosticadas com câncer cervical, avaliar:

- Os níveis de IL-18 em amostras de tecido de pacientes diagnosticadas com câncer cervical e seu potencial prognóstico;

## 3. Material e Métodos

---

### 3.1. Culturas celulares

Queratinócitos primários humanos normais (PHK), queratinócitos que expressam os principais oncogenes de HPV16 (que codificam para as oncoproteínas E6 e E7) e linhagens tumorais derivadas de carcinoma do colo do útero positivas para HPV de alto risco foram cultivadas. A partir das referidas culturas (células e sobrenadantes), foram realizadas as análises referentes à via da IL-1 e demais citocinas propostas neste estudo.

#### 3.1.1. Culturas de queratinócitos

Foram utilizadas culturas de queratinócitos primários humanos obtidos a partir de prepúcios de recém-nascidos (*Primary Human Keratinocytes*, Lonza, Basel, Suíça). As culturas de PHK foram mantidas em meio KSM (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD) suplementado com fator de crescimento epidérmico (5 ng/ml) e extrato de pituitária bovina (50 ug/ml), em estufa a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 3.1.2. Culturas de linhagens tumorais

As linhagens celulares C33, SiHa e HeLa foram cultivadas em meio mínimo essencial Eagle (#12000022, MEM; Gibco<sup>®</sup>, MD, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (#F063, SFB; Cultilab, Campinas, SP, Brasil), e mantidas em estufa a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub>. Segue a descrição das linhagens tumorais utilizadas:

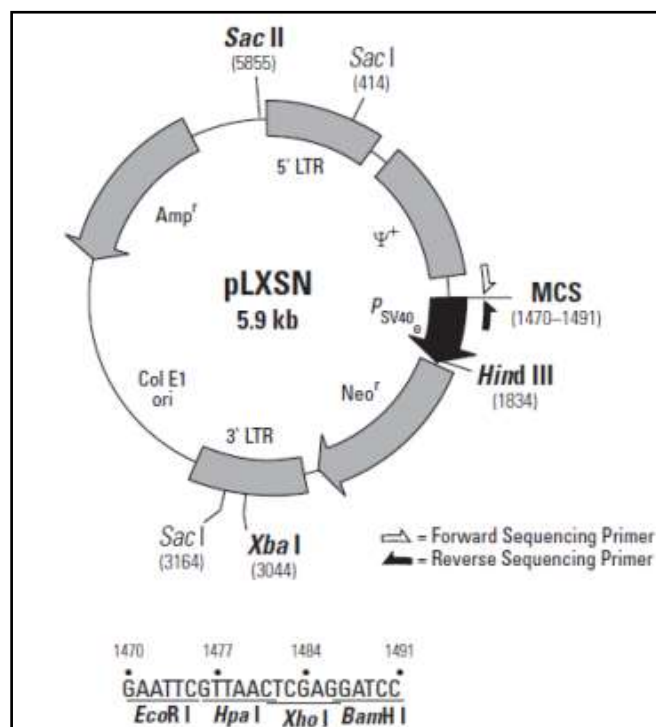
- **C33A:** Linhagem derivada de carcinoma escamoso cervical, negativa para HPV. Possui mutações nos genes *p53* e *pRb* (ATCC<sup>®</sup>HTB31<sup>™</sup>).
- **SiHa:** Linhagem derivada de carcinoma escamoso cervical contendo genoma de HPV16 (ATCC<sup>®</sup>HTB35<sup>™</sup>).
- **HeLa:** Linhagem derivada de adenocarcinoma cervical contendo genoma de HPV18 (ATCC<sup>®</sup>CCL2<sup>™</sup>).

### 3.2. Inserção dos oncogenes do HPV

#### 3.2.1. Vetores retrovirais

Queratinócitos primários humanos normais foram transduzidos com vetores retrovirais que codificam para as proteínas E6 e/ou E7 de HPV16. Os vetores foram gentilmente cedidos pela Dra. Denise A. Galloway (*Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, USA*) e estão devidamente caracterizados [89]. As seqüências virais foram inseridas no vetor pLXSN (No. de acesso M28248, *GeneBank*), sob controle do promotor presente na LTR (*Long Terminal Repeat*) retroviral.

- **pLXSN**: vetor retroviral contendo sítio de múltipla clonagem (Clonitech).
- **pLXSN16 E6**: vetor retroviral contendo a seqüência do gene E6 de HPV16 [89].
- **pLXSN16 E7**: vetor retroviral contendo a seqüência do gene E7 de HPV16 [89].
- **pLXSN16 E6/E7**: vetor retroviral contendo as seqüências dos genes E6 e E7 de HPV16 [89].



**Figura 14 - Mapa do vetor retroviral pLXSN.** As seqüências dos genes E6 e E7 de HPV16 foram inseridas no sítio múltiplo de clonagem (MCS). O vetor contém seqüências que conferem resistência à ampicilina, para seleção em bactérias, e à neomicina, para seleção de células transduzidas.



### 3.2.2. Transdução

Inicialmente, células Bosc23 foram transfectadas com os vetores retrovirais acima descritos, contendo os genes que codificam para as oncoproteínas E6 e/ou E7 de HPV16. Para a transfecção foi utilizado o reagente *FuGENE<sup>®</sup> HD Transfection Reagent* (#E2311, Promega Corporation, Madison, USA), segundo as orientações do fabricante. A seguir, as células foram incubadas a 37°C e 5 % de CO<sub>2</sub> por 48 horas.

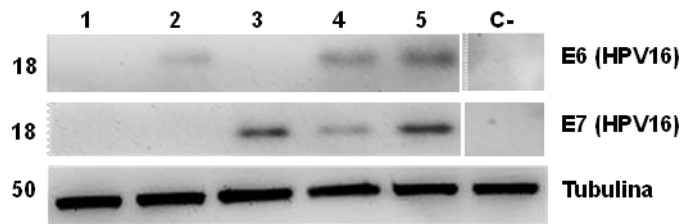
Após este período, o sobrenadante contendo os retrovírus produzidos foi coletado, filtrado através de filtro de 0,45 µm, e gotejado sobre a cultura de células Am12, acrescido de 10 µg/mL de polibreno (#TR-1003, *Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*), de forma a possibilitar a transdução das mesmas. As células permaneceram em cultura por 24 horas, quando o meio foi substituído por meio DMEM contendo 10% de SFB e antibiótico específico, de acordo com o vetor utilizado. Após uma semana de seleção, as células Am12 foram mantidas em meio fresco para recuperação até que fosse observada a formação de colônias.

Para a transdução das PHK foi utilizado o sobrenadante das Am12 contendo os retrovírus produzidos, como já descrito anteriormente. Em seguida, as células foram selecionadas em meio KSFM (#17005-042, *Keratinocyte Serum Free Medium, Gibco, Waltham, MA, USA*) com antibiótico por 48h, e utilizadas nos diversos experimentos realizados.

Os queratinócitos, tanto normais quanto transduzidos, foram mantidos em cultura por no máximo 10 passagens, evitando que principalmente os PHK normais ou transduzidos com o vetor vazio entrassem em processo senescência e morte. As células transduzidas com E6/E7 simultaneamente, mantidas por até 10 passagens, são descritas no decorrer do trabalho como “não imortalizadas”.

Após este período em cultura (cerca de 10 passagens), os queratinócitos contendo ambos os oncogenes virais passam por uma fase de crise, com diminuição da velocidade de crescimento. Em seguida, as células recuperam a capacidade de proliferação, podendo ser cultivadas por tempo indeterminado. Estas linhagens são descritas como “imortalizadas”. Cabe ressaltar que o processo de imortalização é resultado das alterações celulares causadas pela presença dos oncogenes E6 e E7 de HPV16 nestas células.

A expressão proteica foi confirmada por ensaio de *western blot* de forma a permitir o uso das linhagens celulares (Figura 15).



**Figura 15 - Expressão proteica de E6 e E7 observada após reação de *western blot*.** 1: PHK pLXSN  $\Phi$ ; 2: PHK pLXSN16 E6; 3: PHK pLXSN16 E7; 4: PHK pLXSN16 E6/E7 (não imortalizada); 5: PHK pLXSN16 E6/E7 (imortalizada); C-: Controle negativo (Extrato celular de SiHa incubado apenas com anticorpo secundário). Os níveis de tubulina foram utilizados para normalizar os resultados.

### 3.3. Sistema CRISPR-Cas9 para *knockout* gênico

#### 3.3.1. Cultura de células

As linhagens celulares SiHa (ATCC® HTB-35™) e HeLa (ATCC® CCL-2™) foram cultivadas em meio MEM suplementado com 10% de SFB. Para a produção de lentivírus, foram utilizadas células 293T (ATCC® CRL-3216™) cultivadas meio MEM suplementado com 10% de SFB. Todas as culturas celulares foram mantidas em estufa com condições padronizadas de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Todas as linhagens foram cultivadas em meios contendo 100 µg/mL de estreptomicina e 100 µg/mL de penicilina.

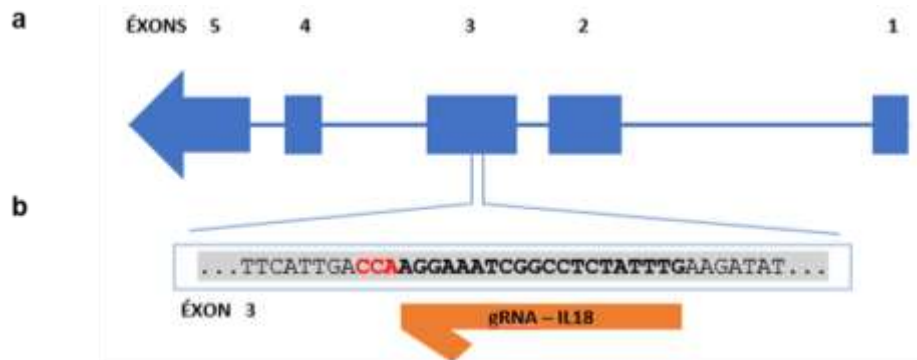
#### 3.3.2. Desenho do gRNA

A abordagem utilizada para o silenciamento da interleucina-18 teve como objetivo promover um *indel* e conseqüentemente a geração de uma proteína truncada não funcional ou mesmo um *stop códon* precoce. Para isso foi desenhado um gRNA (*guide RNA*) que alvejasse o início da CDS do gene em uma região da proteína ativa (éxon 3), já que a IL-18 é traduzida em uma forma precursora inativa, que deve ser posteriormente clivada para apresentar atividade biológica (Tabela 6).

**Tabela 6 – Desenho dos oligonucleotídeos utilizados para a edição de IL-18 via CRISPR-Cas9**

gRNA	Terminal 5'	Sequência (score 80)	Oligonucleotídeo final
IL-18 F	CACCG	CAAATAGAGGCCGATTTCT	CACCGCAAATAGAGGCCGATTTCT
IL-18 R	AAAC	AGGAAATCGGCCTCTATTTG	AAACAGGAAATCGGCCTCTATTTGC

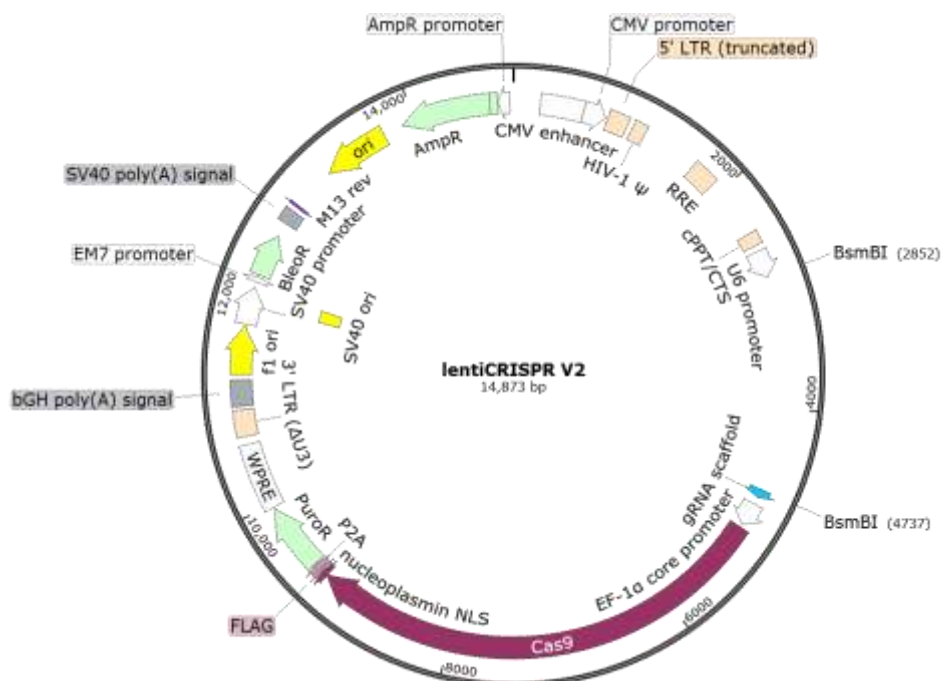
Para o *design* dos oligonucleotídeos foi utilizada uma ferramenta *online* (<http://crispr.mit.edu>) capaz de gerar *guides* com base em um algoritmo que prevê possíveis *off-targets* indesejáveis (Figura16). Devem estar presentes sequências nucleotídicas acessórias para a clonagem no vetor conforme esquema abaixo.



**Figura 16 - (a)** Esquema do gene da IL-18 dividido em seus 5 éxons. **(b)** Esquema do desenho do gRNA em seu respectivo alvo (note que a sequência do oligo IL-18 F é complementar à sequência gênica destacada em **(b)**).

### 3.3.3. Clonagem dos gRNAs nos vetores para o sistema CRISPR

Para a utilização do sistema CRISPR, utilizou-se o plasmídeo comercial fornecido pela Addgene lentiCRISPR v2 (#52961) que apresenta o gene de resistência à puromicina como marca de seleção (Figura 17).



**Figura 17 - Representação do vetor lentiCRISPR v2 com os sítios de restrição para a enzima BsmBI, localização da Cas9 e do gene de resistência para a puromicina.**

Os oligonucleotídeos liofilizados foram reconstituídos na concentração de 100 $\mu$ M e 1 $\mu$ L de cada oligo com seu complementar foram submetidos às reações de fosforilação e anelamento utilizando a enzima T4 polinucleotídeo quinase (PNK) (Promega) utilizando 1  $\mu$ L do Buffer da enzima T4 ligase em uma reação final de 10 $\mu$ L. As condições da reação foram de 37°C por 30 minutos, inativação da enzima a 95°C por 5 minutos, seguida de um *rampdown* para 25°C com taxa de 5°C por minuto para o anelamento dos mesmos. Após esse processo, faz-se necessária uma diluição de 100x.

Para a inserção dos *guides* nos plasmídeos foram utilizados 100ng do vetor em questão (lentiCRISPR v2), 2 $\mu$ L dos oligos anelados e diluídos, 2  $\mu$ L de Tango Buffer 10X, 1 $\mu$ L de Ditioneitol (DTT – 10mM), 1 $\mu$ L de ATP (10mM), 0,5  $\mu$ L de enzima de restrição do tipo IIS BsmB I, 0,5 $\mu$ L da enzima T4 ligase (Promega) em uma reação final de 20 $\mu$ L. As condições para a reações foram otimizadas em 24 ciclos de 37°C por 5 minutos seguidos de 21°C por 5 minutos. Foram utilizados 5 $\mu$ L da reação anterior para transformar 50 $\mu$ L de bactérias competentes por eletroporação, seguido de recuperação em 1 mL de meio SOC sob agitação a 37°C por 1 hora. Em seguida foram plaqueados 50 $\mu$ L do produto em placas de LB ágar com 100 $\mu$ g/mL de ampicilina.

Após incubação *overnight*, 5 colônias foram submetidas a uma PCR utilizando um oligonucleotídeo da região promotora U6 do plasmídeo como *forward* (5'-GACTATCATATGCTTACCGT-3) e o oligo complementar do *guide* como *reverse primer*. As reações foram realizadas em um volume final de 25 $\mu$ L contendo uma concentração final de 1x *TaqGold PCR Buffer*® (*Applied Biosystems*, Texas, USA), 250 $\mu$ M de cada dNTP, 2,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 1U de *AmpliTaqGold* DNA polimerase (*Applied Biosystems*, Texas, USA) e 300nM de cada iniciador no termociclador *GeneAmp*® *PCR System 9700* (*Applied Biosystems*, Texas, USA).

Cada ciclo incluiu 30 segundos de desnaturação a 95°C, 30 segundos de anelamento do *primer* F a 49°C, 30 segundos de anelamento do *primer* R a 60°C e 30 segundos para o alongamento a 72°C. O primeiro ciclo foi precedido por 10 minutos para a ruptura da célula bacteriana e desnaturação a 95°C e o último ciclo estendido por 7 minutos de alongamento a 72°C. Foi incluído como controle negativo o DNA plasmidial antes do processo de restrição e ligação. Essa reação gera um fragmento de 99 pares de bases para plasmídeos cujo *guide* foi corretamente inserido. Após confirmada a inserção do *guide*, seguiu-se com a amplificação do vetor através de Midiprep (Sambrook, 2012) e purificação com o kit Reliaprep® (Promega).

### 3.3.4. Obtenção de vírus para o sistema lentiviral

As células HEK 293T foram transfectadas utilizando o reagente Mission™ Lentiviral Pack Mix (Sigma-Aldrich) que consiste de um conjunto de vetores para a produção de lentivirus. Foram utilizados 26µL do reagente Mission com 16µL do reagente de transfecção Fugene®HD (Promega) e 2,6µg do vetor para o sistema CRISPR em placas de 100mm. Foram feitas coletas em 24, 48 e 72 horas.

As linhagens celulares SiHa e HeLa foram, então, transduzidas com o meio contendo lentivírus produzidos com o vetor para o sistema CRISPR-Cas9. Para a otimização do processo, foram utilizados 6µg/mL de Polibreno por 48 horas seguido de um período de seleção de 72 horas com 2,5µg/mL de Puomicina. Passado o processo de seleção, o *pool* de células resistentes à puomicina foi expandido e coletados DNA, RNA e proteína para a caracterização do *Knockout* e demais ensaios.

### 3.4. Tratamento com IL-1β, IL-18, LPS e cisplatina

As linhagens celulares incluídas neste estudo foram tratadas com IL-1β, IL-18 e LPS. As linhagens celulares cultivadas nas condições anteriormente descritas foram semeadas em placas de Petri. Ao atingirem confluência de 40% a 50%, o meio de cultura foi substituído por meio fresco contendo 1ng/mL de IL-1β recombinante humana (#11457756001, Roche, Mannheim, Germany), 100 ou 200ng/mL de IL-18 recombinante Humana (#9124-IL, R&D Systems, Minneapolis, USA) ou 5µg/mL de LPS (#tlrl-pb5lps, InvivoGen, San Diego, CA, USA). Tais concentrações foram utilizadas com base em estudos prévios do grupo e dados da literatura. Após 24 horas de tratamento, foram coletados os sobrenadantes das culturas e extraídas proteínas e RNA celular.

À semelhança de uma das opções de tratamento do câncer cervical na prática clínica, as células foram, também, tratadas com cisplatina. A concentração utilizada de 4µg/ml durante 48h foi definida após realização de ensaios para a definição da IC50 e confirmada por dados da literatura. O quimioterápico foi preparado e fornecido pelo Serviço de Farmácia Oncológica do Instituto do Câncer do estado de São Paulo, ICESP.

### 3.5. Análise dos níveis proteicos

#### 3.5.1. Extração de proteínas

A extração de proteínas das culturas celulares foi realizada mediante lise celular em tampão de extração (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,5% NP40 e 0,1 mM

EDTA), suplementado com inibidores de proteases (#11836153001, Complete Mini, Roche Diagnostics, Basel, Suíça) e posterior separação da fração proteica. A concentração proteica foi determinada pelo método de Bradford (#5000006, Bio-Rad *Protein Assay Dye*, Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

### 3.5.2. Western Blot

Os extratos proteicos foram submetidos à eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida utilizando-se o sistema mini-Protean II Cell (Bio-Rad, CA, USA), transferidos para membrana de polivinilidene difluoreto (PVDF) (#10600023 Hybond-P, GE Healthcare, UK) e analisados na presença de anticorpos específicos para as proteínas de interesse (Tabela 7). Após incubação com anticorpo secundário, foi observada a expressão proteica mediante reação de quimioluminescência utilizando-se o *kit ECL Prime* (#RPN2232, GE Healthcare, UK).

**Tabela 7 – Anticorpos primários utilizados para a detecção das proteínas de interesse.**

<b>Proteína de interesse</b>	<b>Anticorpo (catálogo / marca)</b>	<b>Concentração</b>
<b>IL-1<math>\alpha</math></b>	ab9614 / Abcam	1:500
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	ab2105 / Abcam	1:500
<b>IL-1R1</b>	ab115497 / Abcam	1:250
<b>IL-1R2</b>	ab97388 / Abcam	1:500
<b>IL-1RAcP</b>	ab154382 / Abcam	1:500
<b>IL-1RA</b>	ab135570 / Abcam	1:500
<b>IL-18</b>	ab137664 / Abcam	1:1000
<b>E6 (HPV16)</b>	AVC1006 / Arbovita	1:500
<b>E7</b>	AVC1015 / Arbovita	1:500
<b>GAPDH</b>	Ab/181602 / Abcam	1:5000
<b>Actina</b>	ab179467 / Abcam	1:5000
<b><math>\alpha</math>-Tubulina</b>	T9026 / Sigma	1:5000

### 3.5.3. Ensaio imunoenzimático (ELISA)

A produção de citocinas foi avaliada nos sobrenadantes das culturas celulares. Antes e após o tratamento com IL-1 $\beta$ , IL-18 e LPS, conforme mencionado anteriormente, o sobrenadante foi recolhido e centrifugado a 1800rpm por 2 minutos e 30 segundos. A porção superior do meio foi armazenada a -80°C até o momento da execução dos ensaios. Foram utilizados os *kits Human Total DuoSet ELISA* (R&D, Minneapolis, USA) para a detecção de IL-6 (#DY206), IL-8 (#DY208) e IL-18 (#DY318), de acordo com as instruções do fabricante.

#### 3.5.4. Detecção de citocinas nos sobrenadantes das culturas celulares via plataforma Luminex

Os ensaios via plataforma Luminex foram realizados utilizando-se o painel de citocinas humanas *Human Cytokine/Chemokine* (HCYTOMAG-60K-30, Merck, Darmstadt, Germany) e o painel e receptores solúveis de citocinas humanas *Human Soluble Cytokine Receptor* (HSCRMAG-32K-11, Merck, Darmstadt, Germany), que permitem escolher uma variedade de citocinas de interesse e seus receptores, a serem pesquisadas nos sobrenadantes das culturas celulares. As reações foram processadas em equipamento Luminex 200.

### 3.6. Imunohistoquímica

#### 3.6.1. Seleção de casos

Amostras (biópsias) provenientes de pacientes diagnosticadas com câncer cervical avançado (estágio IIB) foram incluídas neste estudo. As pacientes foram atendidas no Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti – CAISM, e a utilização das amostras foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CAAE: 55014816.5.0000.5404, parecer: 3.275.945.

Inicialmente, foram selecionadas amostras provenientes de uma coorte composta 147 por mulheres diagnosticadas com carcinoma cervical epidermoide estágio IIB, acompanhadas de forma prospectiva por até sete anos. As pacientes foram tratadas com cisplatina concomitante a radioterapia e braquiterapia de alta taxa de dose (CRT-72 pacientes) *versus* radioterapia isolada (RT-75 pacientes).

No geral, todas as mulheres receberam teleterapia com uma dose de 45Gy para a região pélvica em 25 frações, 14,4Gy de reforço nos parâmetros comprometidos e braquiterapia com alta taxa de dose em quatro frações semanais de 7Gy. Mulheres no grupo CRT também receberam quimioterapia semanal com cisplatina ( $40\text{mg/m}^2$ ) concomitante à teleterapia. A resposta ao tratamento foi avaliada um mês após a sua conclusão. O acompanhamento das mulheres tratadas foi realizado a cada quatro meses nos dois anos iniciais após o tratamento, a cada seis meses no terceiro ano e, posteriormente, uma vez por ano. O período de acompanhamento estendeu-se até junho de 2013.

No momento da execução do presente trabalho, das 147 mulheres incluídas no estudo, 49 não possuíam tecido fixado e parafinado suficiente para ensaios imunohistoquímicos adicionais, e 35 mulheres não possuíam tecido fixado e parafinado disponível visto que seu diagnóstico foi estabelecido em outros centros de saúde. Assim, após cuidadosa seleção, este estudo incluiu 63 mulheres. As amostras disponíveis foram novamente cortadas e coradas com hematoxilina e eosina (HE) para verificar o tecido correspondente e a qualidade do componente do tumor. Uma amostra foi, ainda, excluída durante os ensaios, restando 62 blocos.

### 3.6.2. Metodologia utilizada na coloração

As amostras foram avaliadas quanto à marcação para IL-18, CD4, CD8, FOXP3 e NCAM1 (CD56). Para tal, foram realizados cortes de 4µM para a confecção das lâminas, que foram analisadas através de reação automatizada utilizando-se os anticorpos: anti-IL-18 humano (#ab137664, 1:300, Abcam, Cambridge, UK); anti-CD4 humano ([EPR6855], #ab13361, 1:200, Abcam, Cambridge, UK); anti-CD8 humano (#ab4055, 1:200, Abcam, Cambridge, UK); anti-FOXP3 humano ([236A/E7], #ab2003, 1:200, Abcam, Cambridge, UK); e anti-NCAM1 humano ([EP2567Y], #ab75813, 1:200, Abcam, Cambridge, UK). Para coloração foi utilizado o *kit ultraView Universal DAB Detection Kit®* (#760-500, Ventana Medical Systems, Inc., Roche, Tucson, Arizona) em equipamento *Ventana BenchMark GX* (Roche Diagnostics, Mannheim Germany), conforme instruções do fabricante.

As lâminas foram avaliadas por patologista quanto à localização da marcação (núcleo, citoplasma e membrana citoplasmática), intensidade - negativa, fraca, moderada e forte - e extensão - negativas, +1(menos que 5% do tecido marcado), +2 (entre 5% e 50% do tecido marcado) e +3 (mais que 50%do tecido marcado). Os escores foram determinados multiplicando-se a leitura da intensidade pela extensão em cada caso. Também foi avaliada a intensidade da marcação na borda do tumor e no infiltrado inflamatório. Quanto à localização, o infiltrado foi classificado como peritumoral (margem de invasão do tumor), intratumoral, ou localizado no estroma.

## 3.7. **Análise dos níveis de mRNA**

### 3.7.1. Extração de RNA

O RNA das culturas celulares foi extraído utilizando-se *TRizol Reagent* (#15596026, Invitrogen, Calrsbad, CA, USA) conforme as instruções do fabricante.



### 3.7.2. PCR em tempo real

A expressão de mRNA foi determinada através de PCR em tempo real. Após extração do RNA das culturas celulares, foi realizada a reação de transcrição reversa para obtenção do cDNA utilizando-se o *kit GoScript™ Reverse Transcription System* (#A5003, Promega Corporation, Madison, USA). As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando-se o reagente *GoTaq® qPCR Master Mix System* (#A6001, Promega Corporation, Madison, USA). Foram utilizados iniciadores específicos para os genes E6 e E7 de HPV16 e para as sequências humanas da IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-1R1, IL-1R2, IL-1RAcP, IL-1RA, IL-18R ( $\alpha$  e  $\beta$ ) e IL-18BP. A reação foi processada em equipamento *ABI Prism 7500* (*Applied Biosystems, USA*).

## 3.8. Ensaios funcionais

### 3.8.1. Ensaio de proliferação celular

A proliferação celular foi avaliada através de uma curva de crescimento, na qual 10 mil células por poço foram plaqueadas em uma placa de 24 wells, em triplicata, e contadas diariamente, durante 8 dias, utilizando-se uma câmara de *Neubauer*.

### 3.8.2. Ensaio clonogênico

A formação de colônias em baixa densidade foi analisada através do plaqueamento de 200 células, em seis replicatas experimentais, em uma placa de 6 wells, a qual foi incubada por 7 dias para a formação de colônias. Após isso, as células foram fixadas (3,7% Formaldeído) e coradas com cristal violeta por 20 minutos. As colônias formadas foram quantificadas através da fórmula:

$$\%CFE \text{ (colony-forming efficiency)} = \frac{\text{número de colônias}}{\text{número de células plaqueadas}} \times 100$$

### 3.8.3. Ensaio de fechamento de ferida (wound healing)

Para este ensaio, 500.000 células foram plaqueadas em sextuplicata em placas de 12 poços e cultivadas por até 24 horas até que fosse atingida a confluência de 90 a 100%. Antes da realização da ferida, as células foram tratadas com 2 $\mu$ M de mitomicina C (#M4287, Sigma Aldrich, Missouri, USA) por 2h. Após este período, a ferida foi realizada horizontalmente, de uma borda à outra de cada poço, com o auxílio de uma ponteira de 200 $\mu$ L. Os poços foram lavados com PBS, cobertos com meio de cultura e

as placas incubadas por 24h. As culturas foram visualizadas e fotografadas em microscópio Primo Vert (Zeiss, Jena, Alemanha) nos tempos 0h e 24h após a execução da ferida. A migração celular foi quantificada com base nas áreas inicial e final da ferida, com o auxílio do *software Image J*.

#### 3.8.4. Ensaio de invasão

O potencial de invasão das linhagens celulares foi analisado através da capacidade de invadir uma barreira de *Matrigel® Membrane* (#356234, Corning, NY, USA) a partir de esferóides. Para a formação dos esferóides, 50 µl de agarose 1% foram adicionados em cada poço de uma placa de 96 wells com fundo em “U”. Em seguida, 5 mil células por poço foram plaqueadas sobre a agarose, em quintuplicata, e a placa foi centrifugada por 5 minutos, a 1200rpm, com aceleração e desaceleração médias.

As placas foram incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> durante quatro dias para a formação dos esferóides. Após esse período, foram retirados, cuidadosamente, 100µL de sobrenadante de cada poço, e substituídos pelo mesmo volume de matrigel. A placa foi novamente incubada em estufa, nas mesmas condições acima mencionadas, para acompanhamento do potencial de invasão por 96 horas. A invasão foi mensurada calculando-se a área dos esferóides juntamente com as ramificações formadas a cada 24 horas, com auxílio do *software AxioVision Rel 4.8*.

#### 3.8.5. Ensaio de indução da angiogênese

Para o ensaio de indução de angiogênese, células HUVEC (*Human umbilical vein endothelial cell*) foram cultivadas sobre substrato de matriz de *Matrigel® Membrane* (#356234, Corning, NY, USA), na presença de sobrenadante das culturas de esferóides das linhagens SiHa ou HeLa, silenciadas ou não para IL-18 via CRISPR-Cas9. Após 6h de incubação a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, a formação de estruturas semelhantes a tubos foi avaliada.

As culturas foram visualizadas e fotografadas em microscópio Primo Vert (Zeiss, Jena, Alemanha) e analisadas com auxílio do *software ImageJ (Angiogenesis Analyzer for ImageJ)*. As análises comparativas levaram em consideração a quantificação de estruturas componentes da malha de tubos formada, a saber: segmentos; bifurcações; junções (pontos formados pela junção de 3 ou mais segmentos); ramos; tubos/área dos tubos.

### 3.9. Ensaio de viabilidade, citotoxicidade e apoptose

Para a avaliação da viabilidade, citotoxicidade e apoptose foi utilizado o *kit ApoTox-Glo™ Triplex Assay* (#G6320, Promega Corporation, Madison, USA). Para tal, 10.000 células/poço foram plaqueadas em placas de 96 poços. Após 24h, as células foram tratadas com cisplatina isoladamente ou juntamente com IL-18, conforme mencionado anteriormente. Em seguida foi dada sequência ao ensaio de acordo com as instruções do fabricante. A leitura das placas foi realizada em equipamento *GloMax® Discover Microplate Reader* (Promega Corporation, Madison, USA).

### 3.10. Análise estatística

#### 3.10.1. Imunohistoquímica

Para a descrição do perfil da amostra foram feitas tabelas de frequência das variáveis categóricas (tratamento, grau histológico, etc.), com valores de frequência absoluta (n) e percentual (%), e estatísticas descritivas das variáveis numéricas (idade, sobrevivida, etc.), com valores de média, desvio padrão, valores mínimo e máximo, mediana e quartis.

A comparação das variáveis categóricas entre grupos foi realizada utilizando-se os testes Qui-Quadrado ou exato de Fisher (para valores esperados menores que 5). Para comparação das variáveis numéricas foi utilizado o teste de Mann-Whitney (2 grupos) e o teste de Kruskal-Wallis (3 ou mais grupos), devido à ausência de distribuição normal das variáveis.

O ponto de corte para os escores de núcleo e citoplasma como preditor de óbito e recidiva foi obtido utilizando-se a análise da curva ROC. Para análise da curva de sobrevivida livre de doença e global foi utilizado o método de Kaplan-Meier, e para a comparação das curvas foi usado o teste log-rank. Para estudar os fatores associados à sobrevivida foi utilizada a análise de regressão de Cox, simples e múltipla. O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5%, ou seja,  $p < 0.05$ .

#### 3.10.2. Demais experimentos

Para a comparação entre os grupos nos demais experimentos, foi utilizada a análise de variância (ANOVA). O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5%, ou seja,  $p < 0.05$ .

## 4. Resultados

---

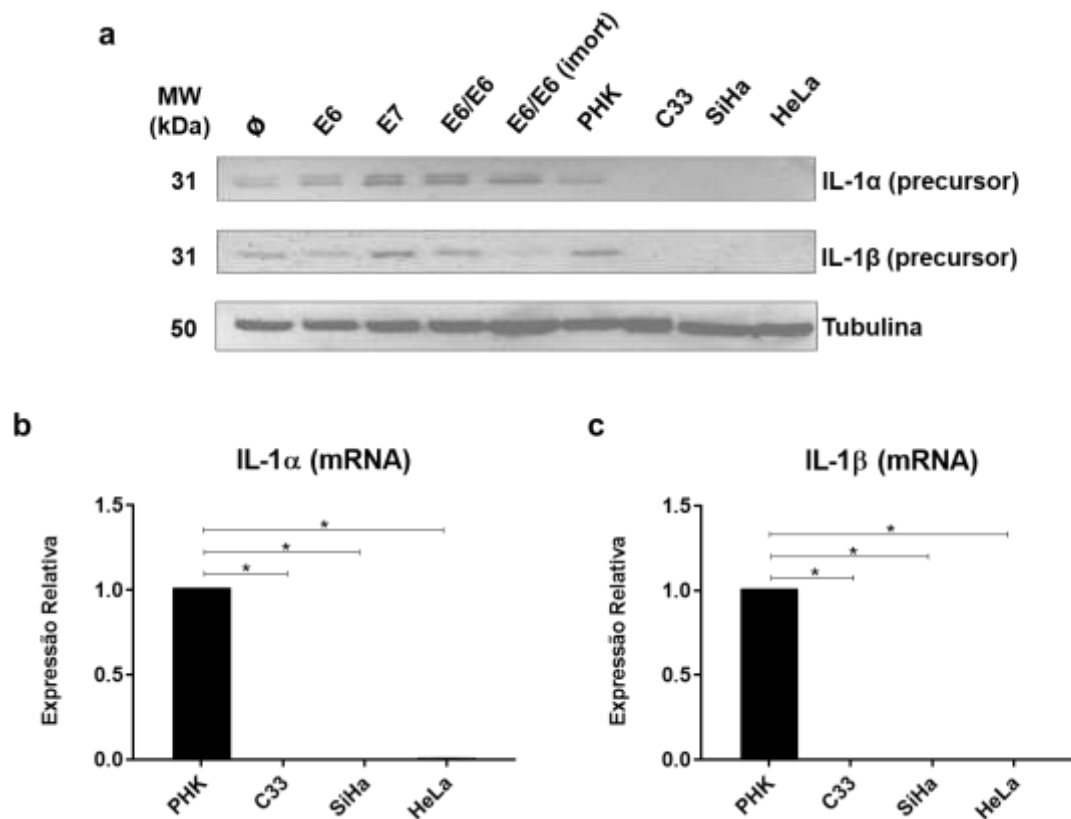
### 4.1. Avaliação dos componentes da via da IL-1 nas linhagens celulares: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1Ra, IL-1R1, IL-1RAcP e IL-1R2

A expressão das proteínas da via da IL-1 foi avaliada nos queratinócitos normais, transduzidos com os oncogenes E6 e/ou E7 de HPV16 e linhagens tumorais de origem cervical.

#### 4.1.1. Redução dos níveis de IL-1 $\alpha$ e IL-1 $\beta$ , transcrito e proteína

A avaliação da via da IL-1 iniciou-se pela mensuração dos níveis proteicos das citocinas IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , ambas agonistas dos receptores de IL-1 e indutoras da sinalização pró-inflamatória por eles mediada. Chama atenção a não detecção da expressão proteica nas linhagens tumorais, ao contrário do observado nos queratinócitos normais e transduzidos com os oncogenes do HPV (Figura 18a).

A seguir, visando verificar se a regulação negativa observada ocorreu ao nível transcricional ou pós-transcricional, foram avaliados os níveis de RNA mensageiro das citocinas acima mencionadas. Conforme apresentado na figura 18b e 18c, a expressão dos transcritos de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  é praticamente inexistente nas linhagens tumorais.

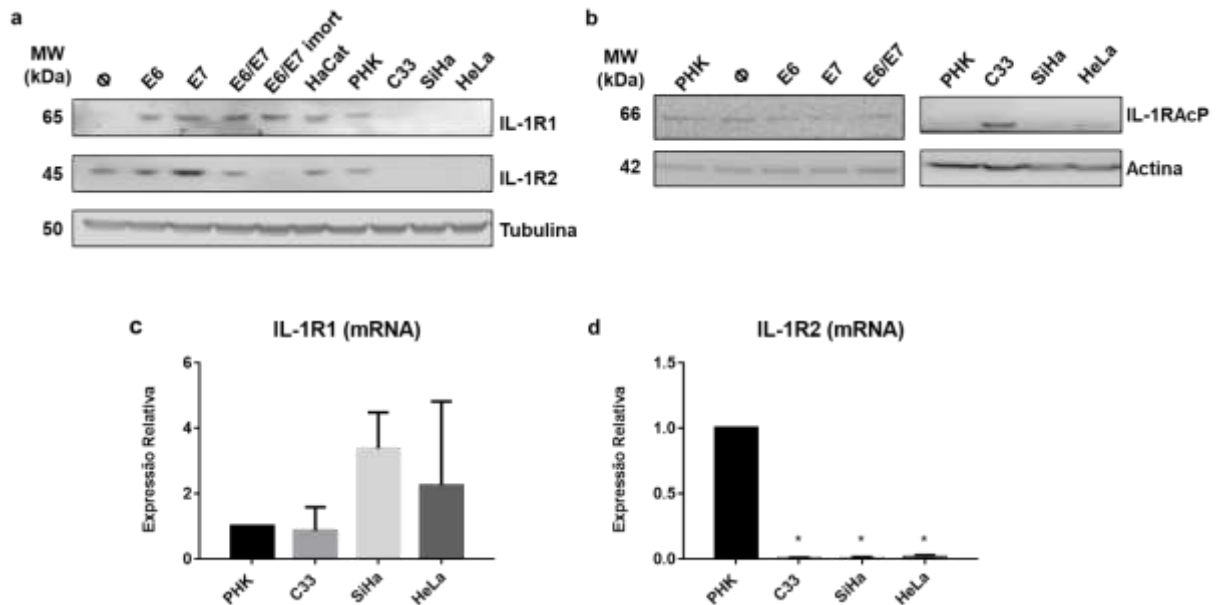


**Figura 18 - Expressão de IL-1α e IL-1β em queratinócitos normais, transduzidos com E6/E7 de HPV16 e linhagens tumorais. (a):** Níveis proteicos nos extratos celulares. Imagem representativa, *western blot*. **(b) e (c):** Níveis de mRNA, PCR em tempo real. **PHK:** queratinócitos normais; **Ø:** queratinócitos transduzidos com o vetor pLXSN vazio; **E6:** queratinócitos transduzidos com o oncogene E6 de HPV16; **E7:** queratinócitos transduzidos com o oncogene E7 de HPV16; **E6/E7:** queratinócitos transduzidos com os oncogenes E6 e E7 de HPV16 em passagem 5; **E6/E7 imort:** queratinócitos transduzidos com os oncogenes E6 e E7 de HPV16 imortalizados; **C33:** linhagem tumoral cervical HPV negativa; **SiHa:** linhagem tumoral cervical HPV16 positiva; **HeLa:** linhagem tumoral cervical HPV18 positiva. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Teste estatístico aplicado: ANOVA. (\*):  $p < 0,05$ .

#### 4.1.2. Redução dos níveis dos receptores IL-1R1, IL-1RAcP e IL-1R2, transcrito e proteína

A expressão dos receptores de IL-1α e IL-1β também foi avaliada. Os níveis proteicos do receptor IL-1R1, cuja ativação induz a sinalização da via, também estavam significativamente reduzidos nas linhagens tumorais em relação aos queratinócitos normais e transduzidos. De forma semelhante, IL-1R2, receptor cuja ativação não induz a via, apresentou expressão reduzida nos queratinócitos imortalizados com E6/E7 e praticamente inexistente (mRNA e proteína) nas linhagens tumorais. No que se refere ao transcrito de IL-1R1, verifica-se a produção de mRNA pelas linhagens tumorais, sugerindo a regulação pós-transcricional deste gene (Figura 19).

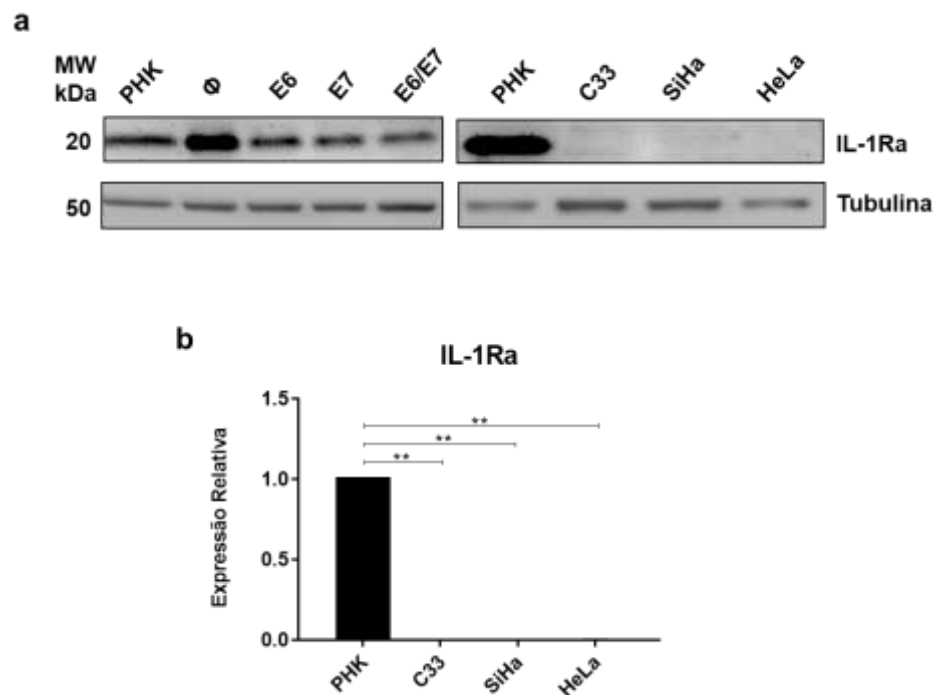
O receptor acessório IL-RAcP, também necessário à indução da sinalização, foi avaliado quanto à expressão proteica. Foi verificada a expressão ligeiramente menor deste receptor nos queratinócitos transduzidos com E6 e E7. Nas linhagens tumorais, apenas C33 (HPV-) apresentou níveis proteicos significativos (Figura 19b).



**Figura 19 - Expressão de IL-1R1, IL-1R2 e IL-1RAcP em queratinócitos normais, transduzidos com E6/E7 de HPV16 e linhagens tumorais.** (a) e (b): Níveis proteicos nos extratos celulares. Imagem representativa, *western blot*. (c) e (d): Níveis de mRNA, PCR em tempo real. **PHK:** queratinócitos normais; **Ø:** queratinócitos transduzidos com o vetor pLXSN vazio; **E6:** queratinócitos transduzidos com o oncogene E6 de HPV16; **E7:** queratinócitos transduzidos com o oncogene E7 de HPV16; **E6/E7:** queratinócitos transduzidos com os oncogenes E6 e E7 de HPV16 em passagem 5; **E6/E7 imort:** queratinócitos transduzidos com os oncogenes E6 e E7 de HPV16 imortalizados; **C33:** linhagem tumoral cervical HPV negativa; **SiHa:** linhagem tumoral cervical HPV16 positiva; **HeLa:** linhagem tumoral cervical HPV18 positiva. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Teste estatístico aplicado: ANOVA. (\*):  $p < 0,05$ .

#### 4.1.3. Redução dos níveis do antagonista IL-1Ra, transcrito e proteína

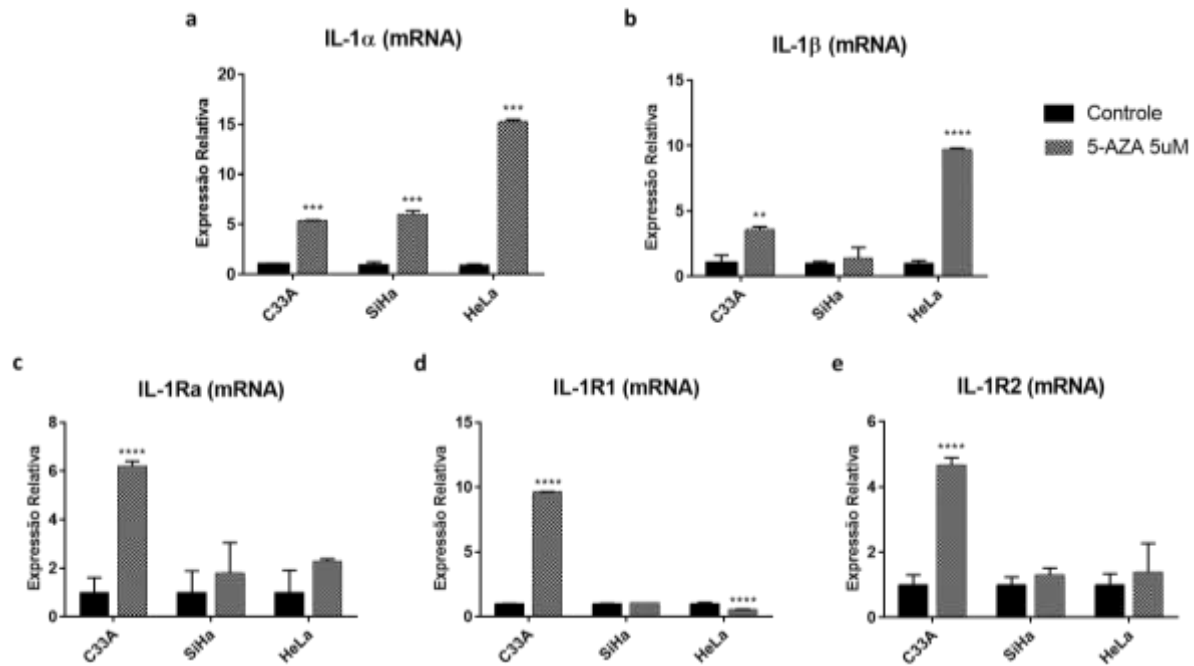
A ligação de IL-1Ra, antagonista natural da via da IL-1, aos respectivos receptores celulares, bloqueia a resposta pró-inflamatória iniciada por IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Conforme apresentado na figura 20, a presença dos oncogenes do HPV nos queratinócitos transduzidos foi responsável pela redução da expressão proteica de IL-1Ra em relação às células contendo o vetor vazio. Nas linhagens tumorais, a expressão tanto de mRNA quanto de proteína, foi significativamente reduzida.



**Figura 20 - Expressão de IL-1Ra em queratinócitos normais, transduzidos com E6/E7 de HPV16 e linhagens tumorais. (a):** Níveis proteicos nos extratos celulares. Imagem representativa, *western blot*. **(b):** Níveis de mRNA, PCR em tempo real. **PHK:** queratinócitos normais; **Ø:** queratinócitos transduzidos com o vetor pLXSN vazio; **E6:** queratinócitos transduzidos com o oncogene E6 de HPV16; **E7:** queratinócitos transduzidos com o oncogene E7 de HPV16; **E6/E7:** queratinócitos transduzidos com os oncogenes E6 e E7 de HPV16 em passagem 5; **C33:** linhagem tumoral cervical HPV negativa; **SiHa:** linhagem tumoral cervical HPV16 positiva; **HeLa:** linhagem tumoral cervical HPV18 positiva. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Teste estatístico aplicado: ANOVA. (\*\*):  $p < 0,01$ .

#### 4.1.4. Impacto do tratamento com 5-AZA na transcrição dos genes da via da IL-1

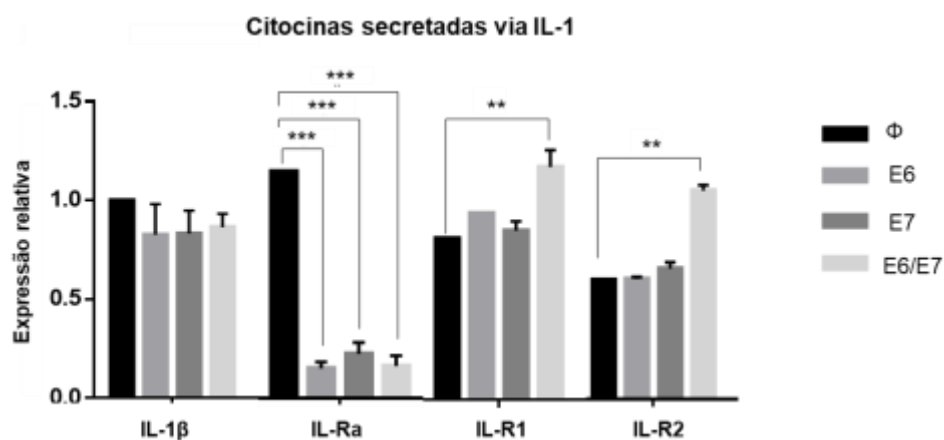
Visto que a expressão dos genes da via da IL-1 encontra-se, de forma geral, reduzida nas linhagens tumorais cervicais, buscou-se verificar qual a contribuição do processo de metilação gênica em tal redução. Os níveis de mRNA observados após o tratamento com o agente demetilante 5-aza-2'-deoxitidina (5-AZA) são apresentados na figura 21. Quanto maior o aumento da expressão de mRNA após tratamento, maior a importância da metilação no controle da expressão gênica.



**Figura 21 - Expressão de IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1R1, IL-1R2 e IL-1Ra nas linhagens tumorais cervicais após tratamento com 5uM de 5-AZA.** Níveis de mRNA, PCR em tempo real. **C33:** linhagem tumoral cervical HPV negativa; **SiHa:** linhagem tumoral cervical HPV16 positiva; **HeLa:** linhagem tumoral cervical HPV18 positiva. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Teste estatístico aplicado: ANOVA. (\*\*):  $p < 0,01$ ; (\*\*):  $p < 0,001$ ; (\*\*\*\*):  $p < 0,0001$ .

#### 4.1.5. Secreção de citocinas da via da IL-1 pelos queratinócitos transduzidos

Visto que os componentes da via da IL-1, mesmo os receptores, são também secretados, o sobrenadante de queratinócitos transduzidos com os oncogenes de HPV16 foram analisados por Luminex para a detecção de IL-1 $\beta$ , IL-1Ra, IL-1R1 e IL-1R2 (figura 22).

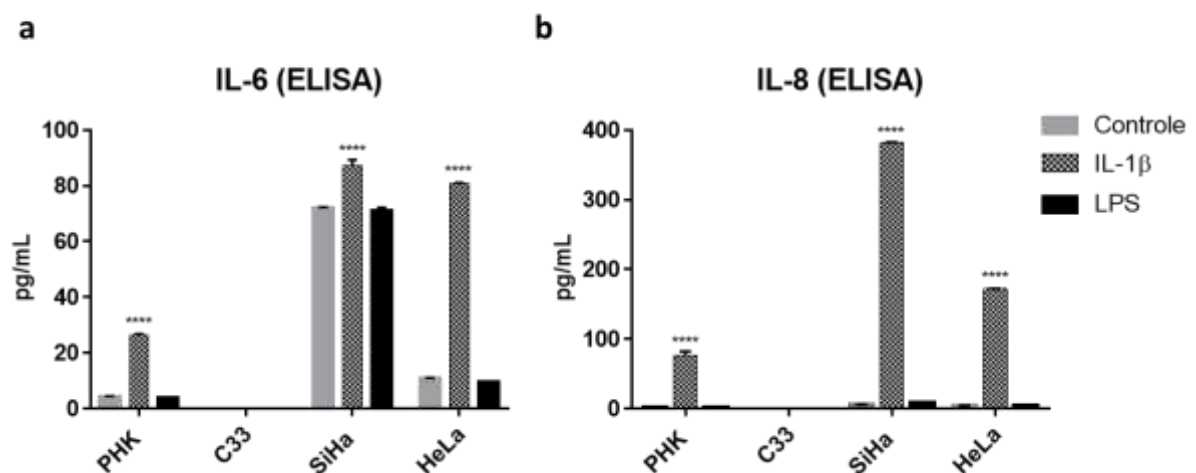


**Figura 22 - Expressão de citocinas secretadas nos queratinócitos transduzidos. Luminex.** Ø: queratinócitos transduzidos com o vetor pLXSN vazio; **E6:** queratinócitos transduzidos com o oncogene E6 de HPV16; **E7:** queratinócitos transduzidos com o oncogene E7 de HPV16; **E6/E7:** queratinócitos transduzidos com os oncogenes E6 e E7 de HPV16 em passagem 5. Teste estatístico aplicado: ANOVA. (\*\*):  $p < 0,01$ ; (\*\*):  $p < 0,001$ .



#### 4.1.6. Ativação da via da IL-1 nas linhagens tumorais HPV após indução

Com o objetivo de verificar se a síntese dos componentes da via da IL-1 poderia ser estimulada nas linhagens tumorais, as mesmas foram tratadas com IL-1 $\beta$  recombinante humana e LPS recombinante humano. Conforme apresentado a seguir, a síntese de IL-6 e IL-8, citocinas conhecidamente induzidas por IL-1 $\beta$ , foi significativamente maior quando PHK, SiHa (HPV16+) e HeLa (HPV18+) foram tratadas com IL-1 $\beta$  (Figura 23).



**Figura 23 - Expressão de IL-6 e IL-8 após estímulo das células com IL-1 $\beta$  (1ng/mL) e LPS (5ug/mL).** Níveis proteicos no sobrenadante das culturas, ELISA. **PHK:** queratinócitos normais; **C33:** linhagem tumoral cervical HPV negativa; **SiHa:** linhagem tumoral cervical HPV16 positiva; **HeLa:** linhagem tumoral cervical HPV18 positiva. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Teste estatístico aplicado: ANOVA. (\*\*\*\*):  $p < 0,0001$ .

#### 4.2. Avaliação dos componentes da via da IL-1 nas linhagens celulares: IL-18, IL-18BP, IL-18R $\alpha$ e IL-18R $\beta$

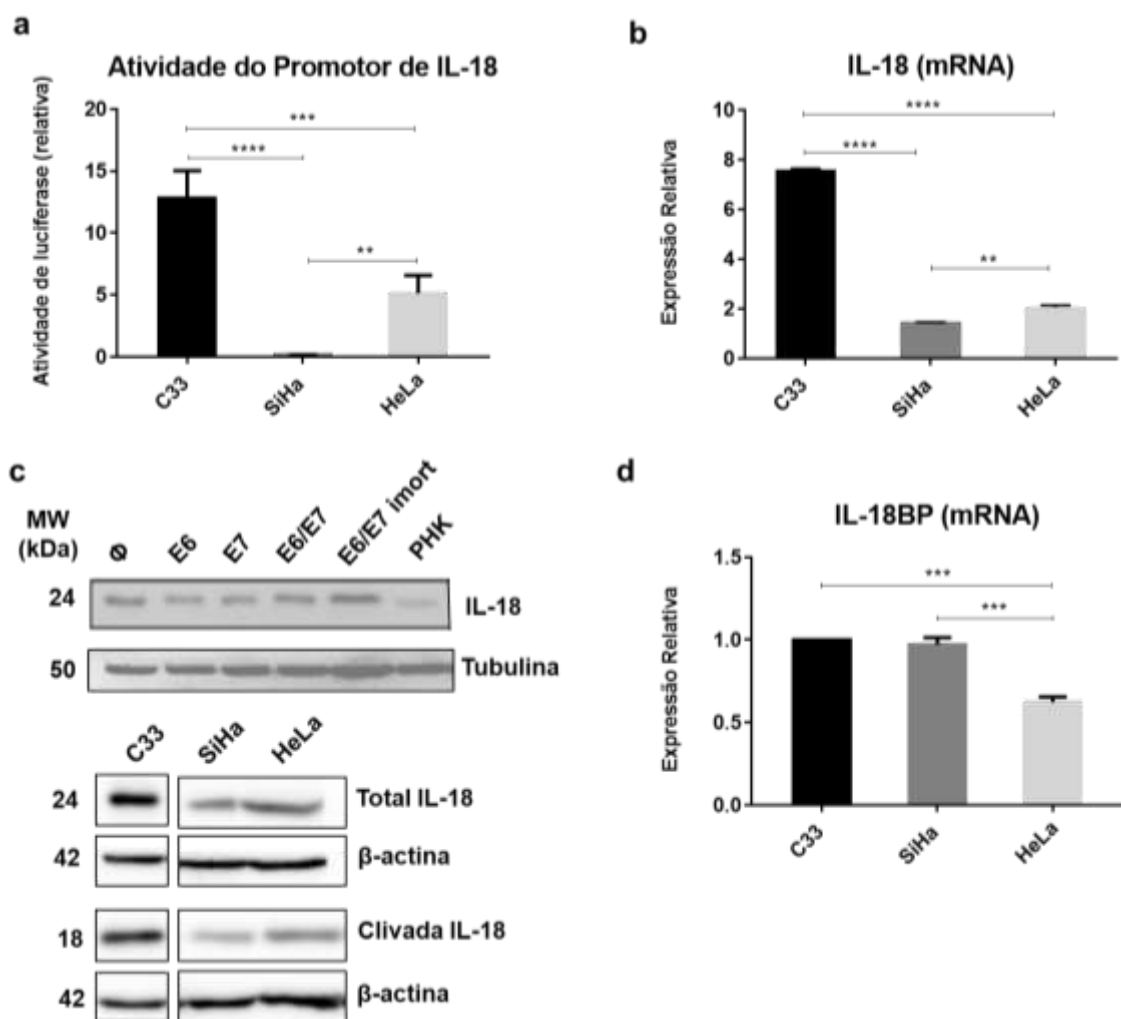
A expressão de IL-18, outra importante citocina pró-inflamatória da via da IL-1, também foi avaliada nos queratinócitos normais, transduzidos com os oncogenes E6 e/ou E7 de HPV16 e linhagens tumorais de origem cervical, conforme resultados a seguir.

##### 4.2.1. IL-18 e IL-18BP: atividade do promotor, níveis de transcrito e proteína

Ao contrário do observado para os demais componentes da via da IL-1, cuja expressão encontra-se significativamente reduzida nas linhagens tumorais cervicais em relação aos queratinócitos normais, a citocina pró-inflamatória IL-18 é produzida por C33

(HPV-), SiHa (HPV16+) e HeLa (HPV18+), mesmo quando não induzidas. Nota-se que a expressão em C33 (HPV-) é significativamente superior às demais linhagens. A atividade do promotor reflete o observado em termos de mRNA e proteína (Figura 24).

O efeito resultante de IL-18, no entanto, é dependente do balanço entre os níveis da citocina e de seu antagonista natural, IL-18BP. Em C33 (HPV-), ambos os transcritos são expressos de forma semelhante. No caso de SiHa (HPV16+), embora a expressão de IL-18 seja a menor entre as três linhagens, os níveis de IL-18BP são os maiores considerando-se as mesmas células. HeLa (HPV18+), no entanto, produz mais IL-18 e menos IL-18BP, quando comparada às demais linhagens tumorais (Figura 24).

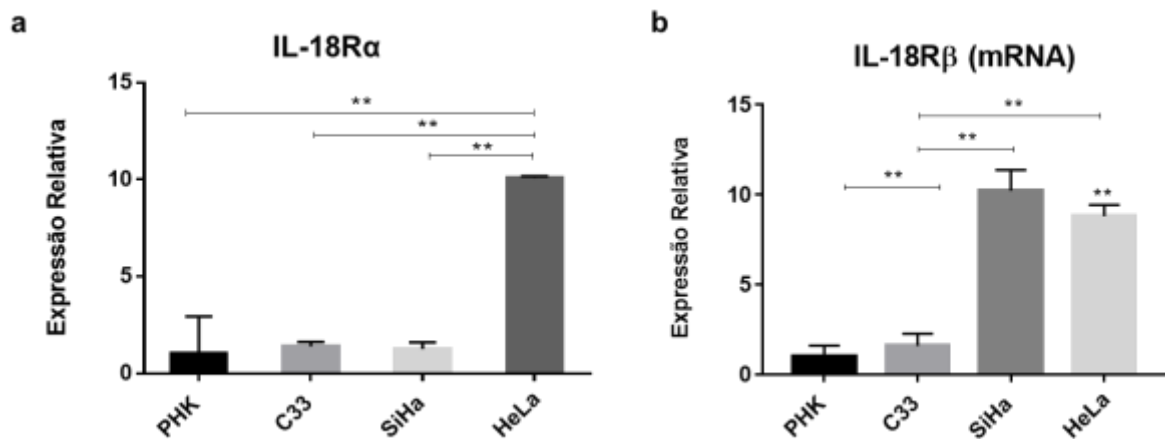


**Figura 24 - Expressão de IL-18 e IL-18BP nos queratinócitos e linhagens tumorais cervicais.** (a): Atividade do promotor de IL18, ensaio de luciferase. (b): Níveis de IL-18 (mRNA), PCR em tempo real. (c): Níveis proteicos de IL-18, *western blot*. (d): Níveis de IL-18BP (mRNA), PCR em tempo real. **PHK**: queratinócitos normais; **Ø**: queratinócitos transduzidos com o vetor pLXSN vazio; **E6**: queratinócitos transduzidos com o oncogene E6 de HPV16; **E7**: queratinócitos transduzidos com o oncogene E7 de HPV16; **E6/E7**: queratinócitos transduzidos com os oncogenes E6 e E7 de HPV16 em passagem 5; **E6/E7 imort**: queratinócitos transduzidos com os oncogenes E6 e E7 de HPV16 imortalizados; **C33**: linhagem tumoral cervical HPV negativa; **SiHa**: linhagem tumoral cervical HPV16

positiva; **HeLa**: linhagem tumoral cervical HPV18 positiva. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Teste estatístico aplicado: ANOVA. (\*\*):  $p < 0,01$ ; (\*\*):  $p < 0,001$ ; (\*\*\*\*):  $p < 0,0001$ .

#### 4.2.2. Receptores de IL-18

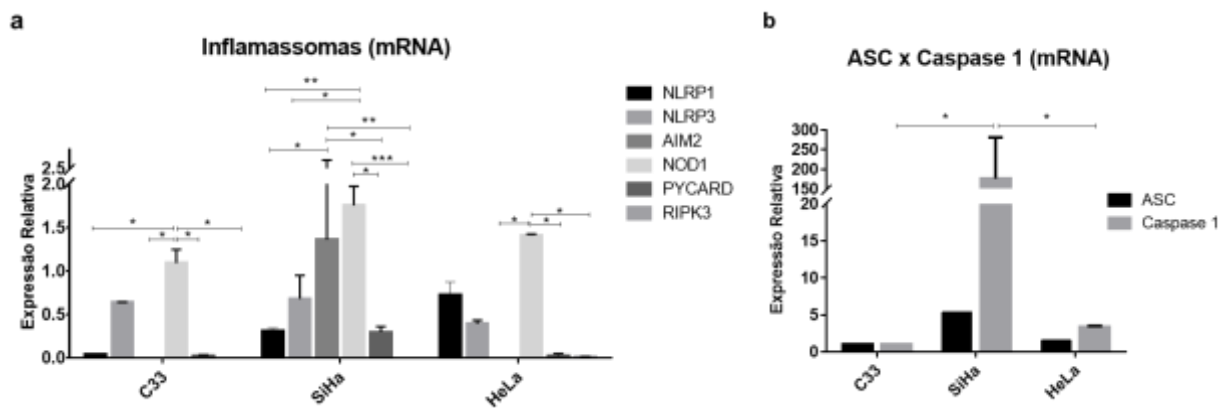
A figura 25 apresenta os níveis de expressão de transcritos dos receptores celulares necessários à sinalização induzida por IL-18. Tanto o receptor IL-18R $\alpha$  quanto o co-receptor IL-18R $\beta$  são expressos em PHK e nas linhagens tumorais, principalmente SiHa e HeLa.



**Figura 25 - Expressão dos receptores de IL-18 nas linhagens tumorais cervicais. (a):** Níveis de IL-18R $\alpha$  (mRNA), PCR em tempo real. **(b):** Níveis de IL-18R $\beta$  (mRNA), PCR em tempo real. **PHK:** queratinócitos normais; **C33:** linhagem tumoral cervical HPV negativa; **SiHa:** linhagem tumoral cervical HPV16 positiva; **HeLa:** linhagem tumoral cervical HPV18 positiva. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Teste estatístico aplicado: ANOVA. (\*\*):  $p < 0,01$ .

#### 4.3. Ativação do Inflamassoma

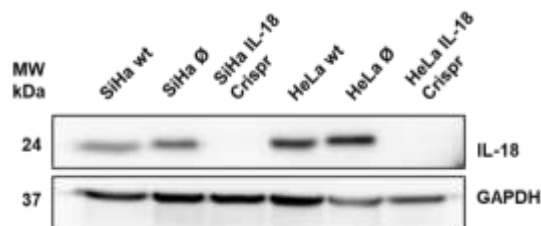
Tanto IL-1 $\beta$  quanto IL-18 são produzidas sob a forma de pró-citocinas, e precisam ser clivadas para a liberação da proteína madura, clivagem esta mediada pelo complexo do inflamassoma. A figura 26 apresenta os níveis de mRNA relativos aos componentes dos diferentes tipos de inflamassomas nas linhagens tumorais cervicais. Em C33 (HPV-), predomina a expressão de NOD1, seguido de NLRP3. Em SiHa (HPV16+) destacam-se NOD1, AIM2 e NLRP3, seguidos de NLRP1 e PYCARD em níveis mais baixos. Em HeLa (HPV18+), além de NOD1, é observada a expressão de NLRP1 e NLRP3.



**Figura 26 - Expressão dos componentes do complexo do inflamassoma nas linhagens tumorais cervicais. (a):** Inflamassomas, diferentes componentes (mRNA), PCR em tempo real. **(b):** Caspase-1 e proteína adaptadora (ASC) (mRNA), PCR em tempo real. **C33:** Linhagem tumoral cervical HPV negativa; **SiHa:** linhagem tumoral cervical HPV16 positiva; **HeLa:** linhagem tumoral cervical HPV18 positiva. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Teste estatístico aplicado: ANOVA. (\*):  $p < 0,05$ . (\*\*):  $p < 0,01$ . (\*\*\*) :  $p < 0,001$ .

#### 4.4. Edição gênica de IL-18 por CRISPR-Cas9

Visto que a IL-18 é constitutivamente expressa tanto nos queratinócitos normais quanto nos tumorais, decidiu-se por silenciar a citocina e avaliar os efeitos do silenciamento. Na figura 27 são apresentados os níveis proteicos de IL-18 no *pool* de células correspondente à cada uma das linhagens tumorais HPV positivas, transduzidas com o vetor vazio ( $\emptyset$ ) ou editadas geneticamente (Crispr).

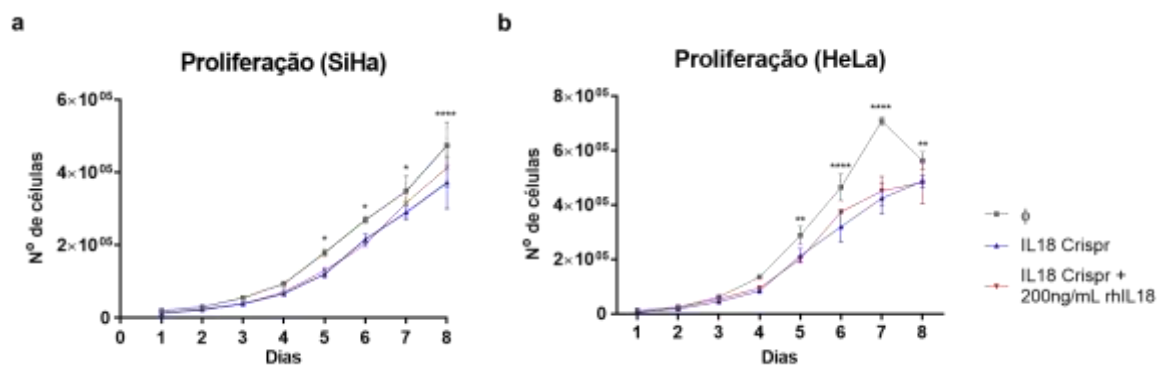


**Figura 27 - Expressão proteica de IL-18 nas linhagens tumorais cervicais após edição gênica. Western Blot. SiHa wt:** linhagem tumoral cervical HPV16+ selvagem; **SiHa  $\emptyset$ :** SiHa transduzida com o vetor vazio. **SiHa IL-18 Crispr:** SiHa silenciada para IL-18 via CRISPR-Cas9. **HeLa wt:** linhagem tumoral cervical HPV16+ selvagem; **HeLa  $\emptyset$ :** HeLa transduzida com o vetor vazio. **HeLa IL-18 Crispr:** HeLa silenciada para IL-18 via CRISPR-Cas9.

#### 4.4.1. Ensaio Funcionais

##### 4.4.1.1. *Ensaio de proliferação celular*

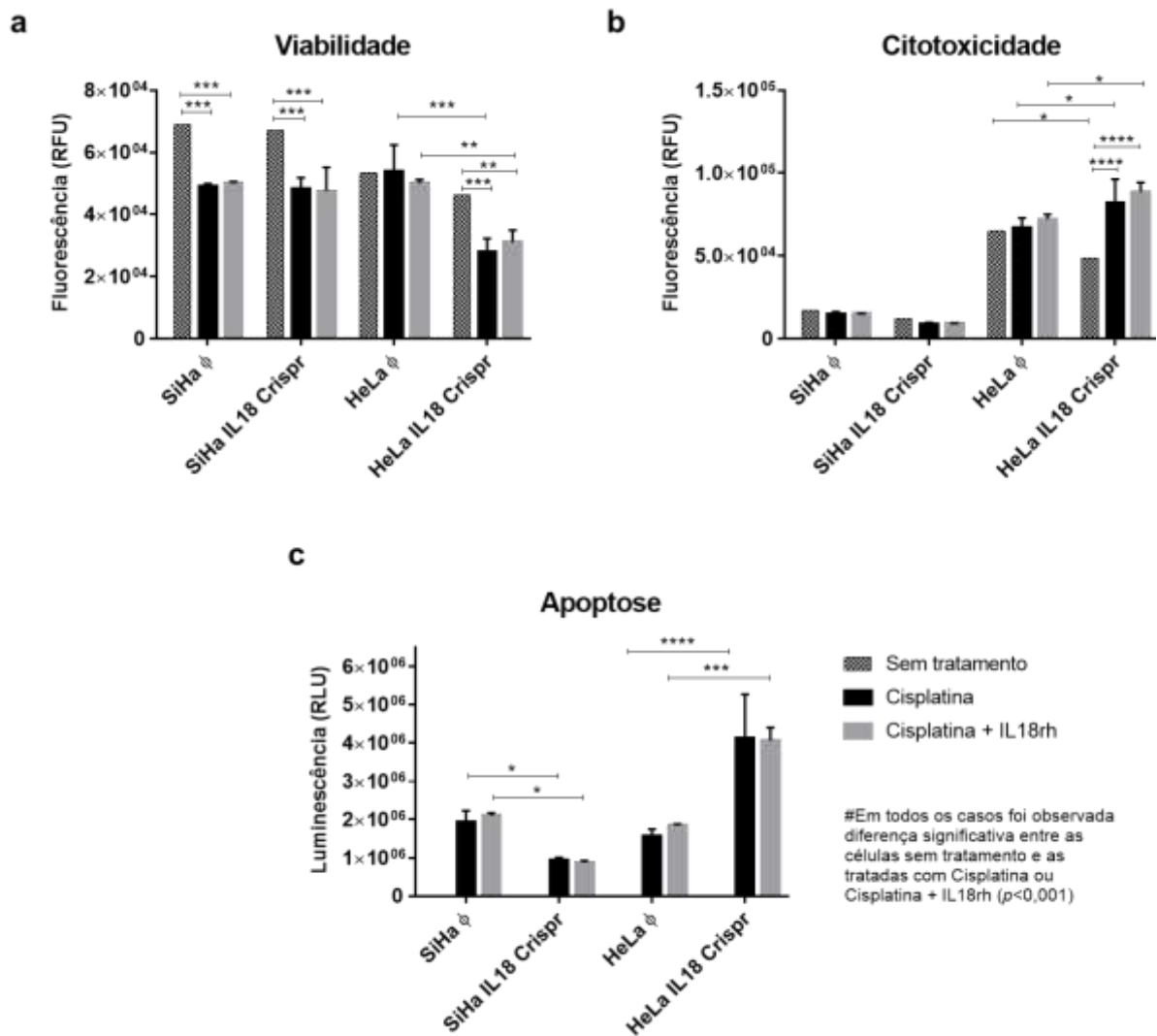
Os efeitos do silenciamento de IL-18 na proliferação celular são demonstrados na figura 28. Verifica-se que a ausência de IL-18 compromete a proliferação em ambas as linhagens tumorais avaliadas. A adição exógena da citocina recombinante não foi capaz de reverter o efeito do silenciamento.



**Figura 28 - Ensaio de proliferação celular. (a)** SiHa; células transduzidas com o vetor vazio, silenciadas para IL-18 e silenciadas para IL-18 tratadas com 200ng/mL de IL-18 recombinante humana. **(b)** HeLa; células transduzidas com o vetor vazio, silenciadas para IL-18 e silenciadas para IL-18 tratadas com 200ng/mL de IL-18 recombinante humana. Experimentos realizados em triplicata. Teste estatístico aplicado: ANOVA. (\*):  $p < 0,05$ . (\*\*):  $p < 0,01$ . (\*\*\*):  $p < 0,001$ .

##### 4.4.1.2. *Avaliação da viabilidade, citotoxicidade e apoptose*

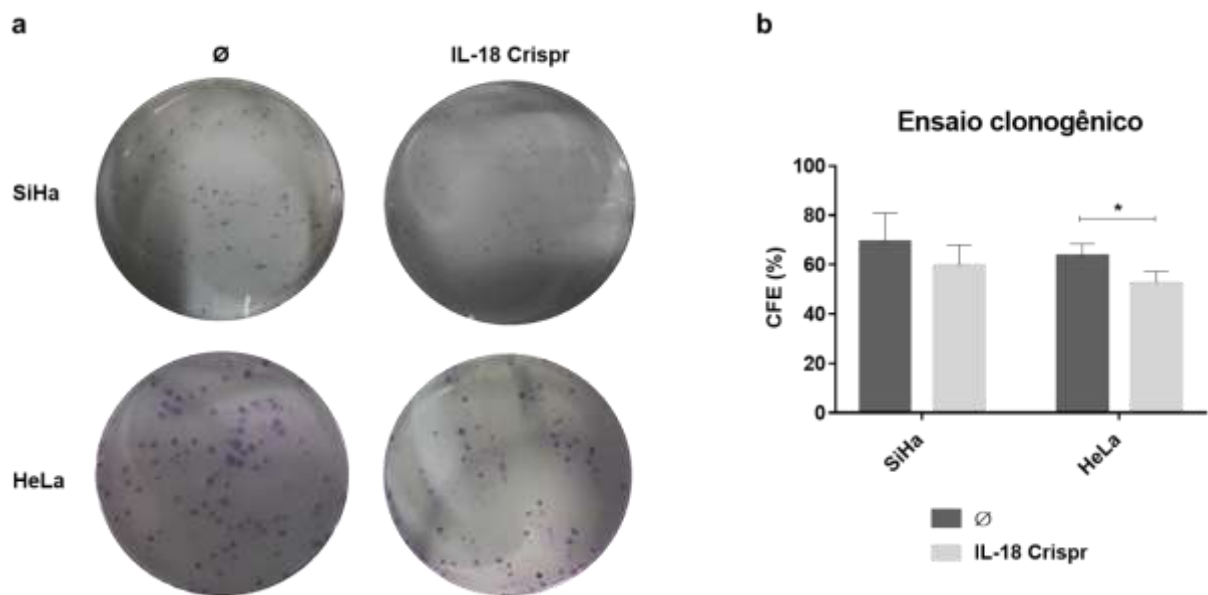
As linhagens tumorais silenciadas para IL-18 ou contendo o vetor vazio foram tratadas com cisplatina (4ug/mL) ou cisplatina e IL-18 recombinante humana (4ug/mL+100ng/mL) por 48h e analisadas quanto à viabilidade, citotoxicidade e apoptose (*kit ApotoxGlo Promega*). O objetivo foi avaliar o impacto do silenciamento nos parâmetros acima mencionados, bem como a resposta ao tratamento com cisplatina, que é uma das opções terapêuticas disponíveis para o câncer cervical (Figura 29).



**Figura 29 - Avaliação de viabilidade, citotoxicidade e apoptose nas linhagens silenciadas ou não para IL-18. *Kit ApotoxGlo Promega*. (a) viabilidade; (b) citotoxicidade; (c) apoptose. As células foram tratadas por 48h com cisplatina (4 $\mu$ g/mL) ou cisplatina + IL-18rh (4 $\mu$ g/mL + 200ng/mL). Experimentos realizados em triplicata experimental. Teste estatístico aplicado: ANOVA. (\*):  $p < 0,05$ . (\*\*):  $p < 0,01$ . (\*\*\*) :  $p < 0,001$ . (\*\*\*\*):  $p < 0,0001$ .**

#### 4.4.1.3. Ensaio clonogênico

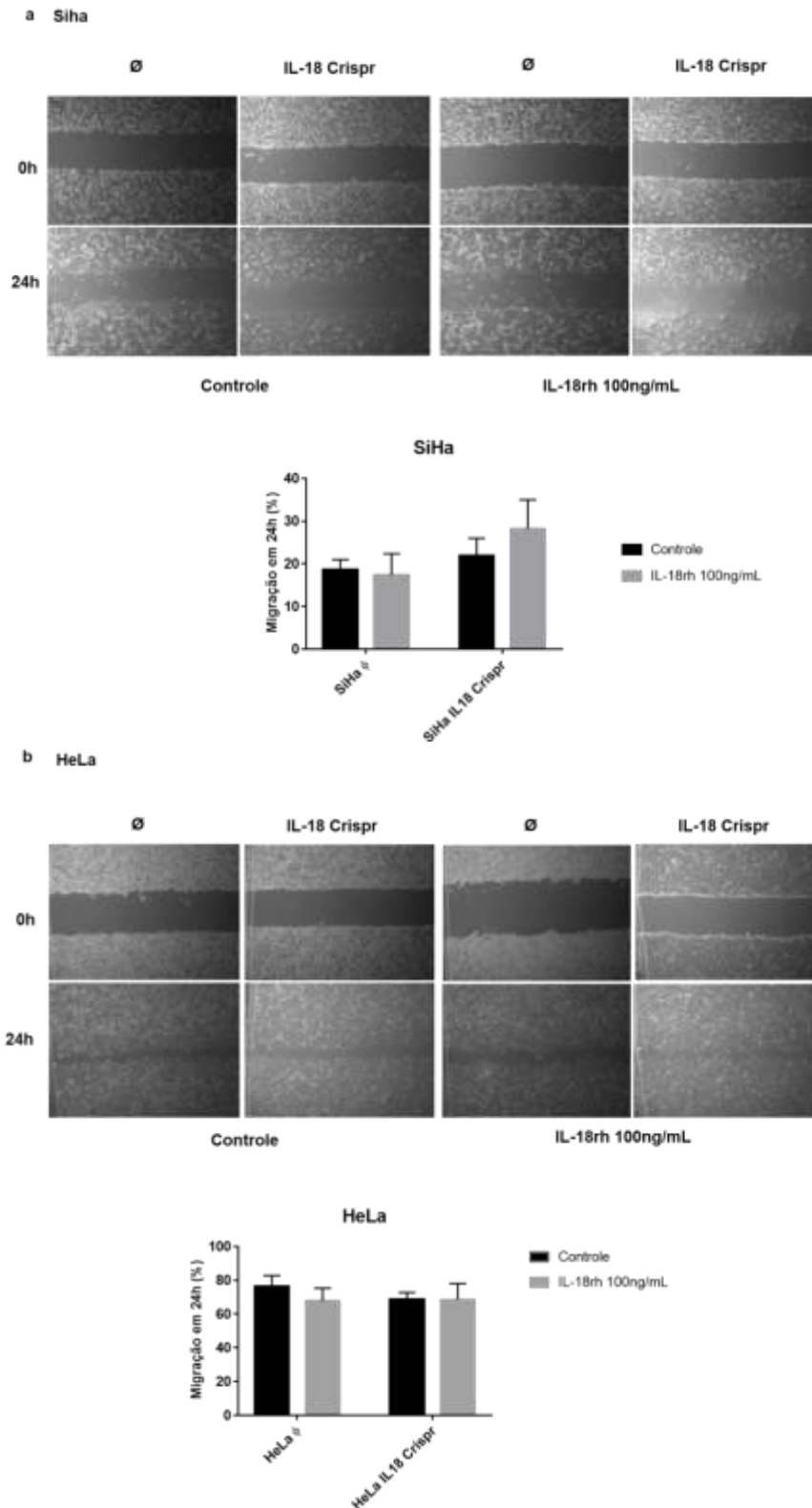
A formação de colônias a partir de células plaqueadas isoladamente também foi avaliada nas linhagens editadas geneticamente. Seguindo a tendência observada no experimento anterior, as células silenciadas mostraram menor capacidade de formar colônias (coradas em azul escuro com cristal violeta) em comparação àquelas contendo o vetor vazio, embora apenas HeLa tenha apresentado diferença significativa (Figura 30).



**Figura 30 - Ensaio clonogênico. (a)** Aspecto das colônias, observadas a olho nu, coradas com cristal violeta. **(b)** Quantificação do número de colônias. **SiHa ∅:** SiHa transduzida com o vetor vazio. **SiHa IL-18 Crispr:** SiHa silenciada para IL-18 via CRISPR-Cas9. **HeLa ∅:** HeLa transduzida com o vetor vazio. **HeLa IL-18 Crispr:** HeLa silenciada para IL-18 via CRISPR-Cas9. Representação gráfica de três experimentos distintos. Teste estatístico aplicado: ANOVA. (\*):  $p < 0,05$ .

#### 4.4.1.4. Ensaio de fechamento da ferida (wound healing assay)

O ensaio de fechamento da ferida permite inferir a capacidade de migração celular. De acordo com exposto na a seguir, não foi possível estabelecer evidência estatística capaz de diferenciar o comportamento das células nas diferentes condições. Foi observada tendência à maior migração em SiHa (HPV16+) silenciada em comparação à contendo o vetor vazio. Quando considerada apenas SiHa silenciada, houve uma tendência à maior migração nas linhagens tratadas com IL-18 recombinante humana. Nota-se a capacidade migratória bastante superior de Hela (HPV18+) em relação à SiHa (HPV16+) (Figura 31).



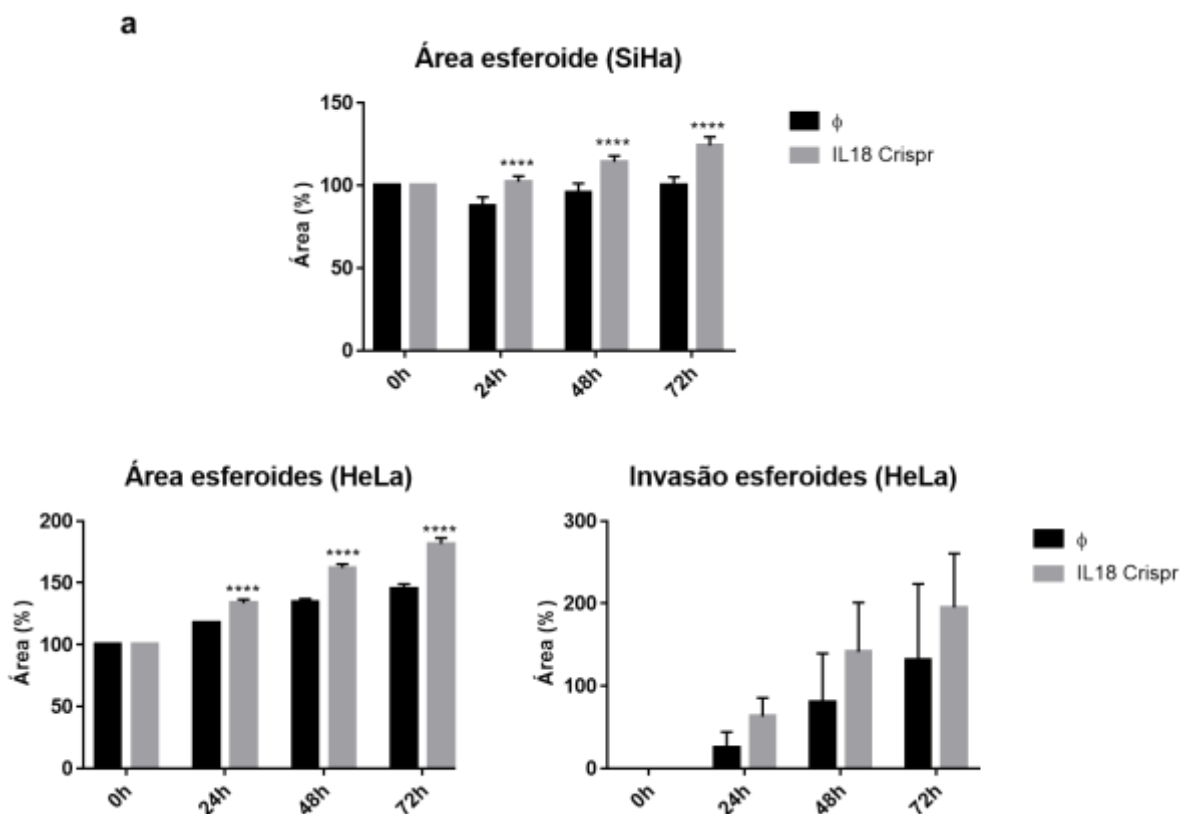
**Figura 31 - Ensaio de fechamento da ferida. (a)** SiHa; transduzida com o vetor vazio, silenciada para IL-18 e silenciada para IL-18 tratada com 100ng/mL de IL-18 recombinante humana. **(b)** HeLa; transduzida com o vetor vazio, silenciada para IL-18 e silenciada para IL-18 tratadas com 100ng/mL de IL-18 recombinante humana. **SiHa Ø:** SiHa transduzida com o vetor vazio. **SiHa IL-18 Crispr:** SiHa silenciada para IL-18 via CRISPR-Cas9. **HeLa Ø:** HeLa transduzida com o vetor vazio. **HeLa IL-18 Crispr:** HeLa silenciada para IL-18 via CRISPR-Cas9. Representação gráfica de três experimentos distintos. Teste estatístico aplicado: ANOVA.



#### 4.4.1.5. Ensaio de proliferação e invasão em matrigel a partir de esferoides

O potencial de invasão das linhagens celulares editadas geneticamente foi avaliado. Inicialmente foram produzidos esferoides, cuja estrutura representa de forma mais fidedigna o observado nos tumores sólidos. Em seguida, foram avaliados o aumento da área do esferoide e a habilidade de invasão da matriz de matrigel adjacente (através da medida das projeções celulares de invasão). Os resultados encontram-se na figura 32.

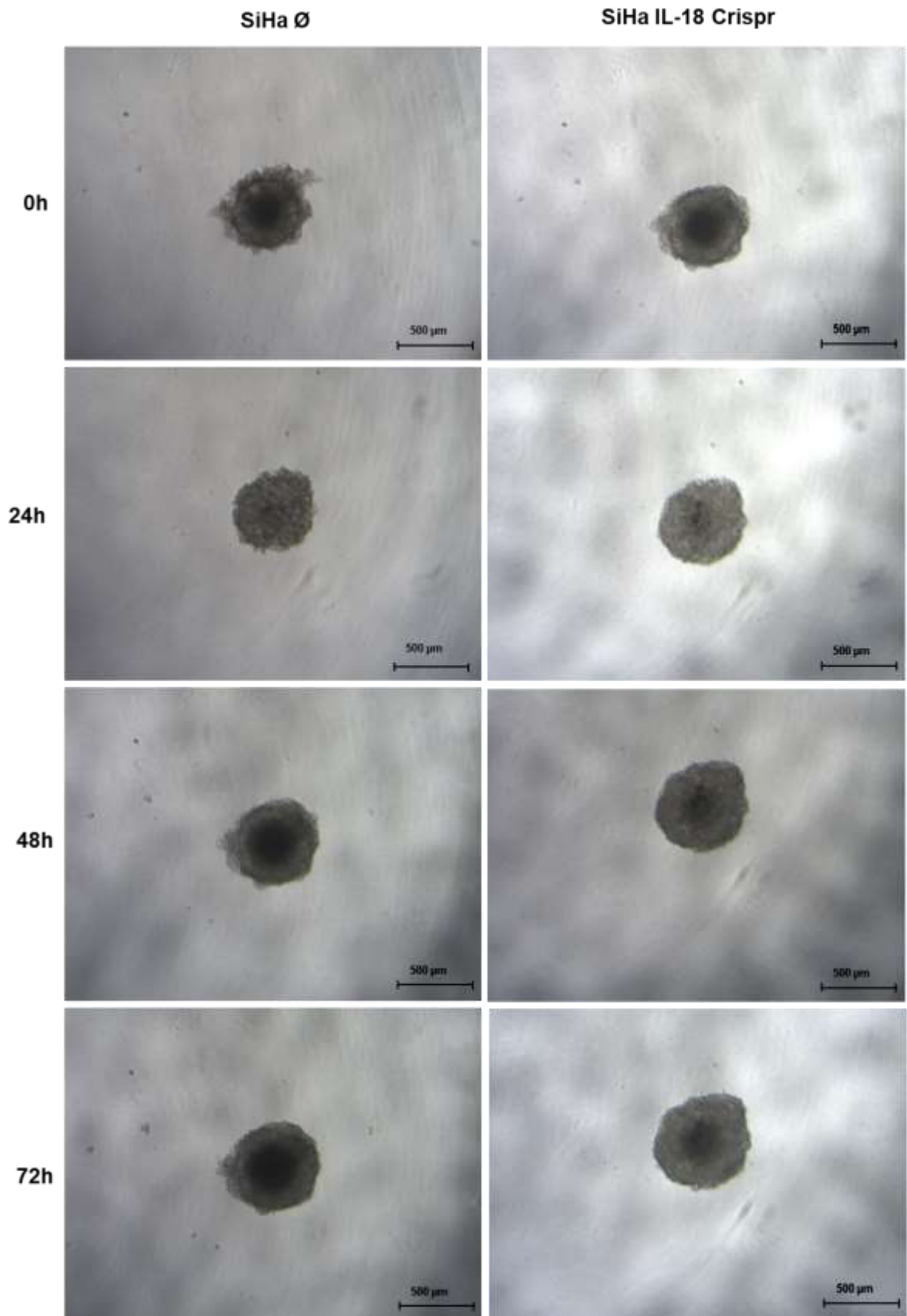
No caso de SiHa (HPV16+), apenas a área do esferoide foi avaliada, visto que tal linhagem não apresentou, no modelo utilizado, capacidade de invasão. Observou-se o aumento significativo da área dos esferoides formados pela linhagem silenciada em relação à contendo o vetor vazio. Em HeLa (HPV18+), da mesma forma, observou-se o aumento significativo da área dos esferoides formados pela linhagem silenciada em relação à contendo o vetor vazio, bem como uma tendência à maior capacidade de invasão.

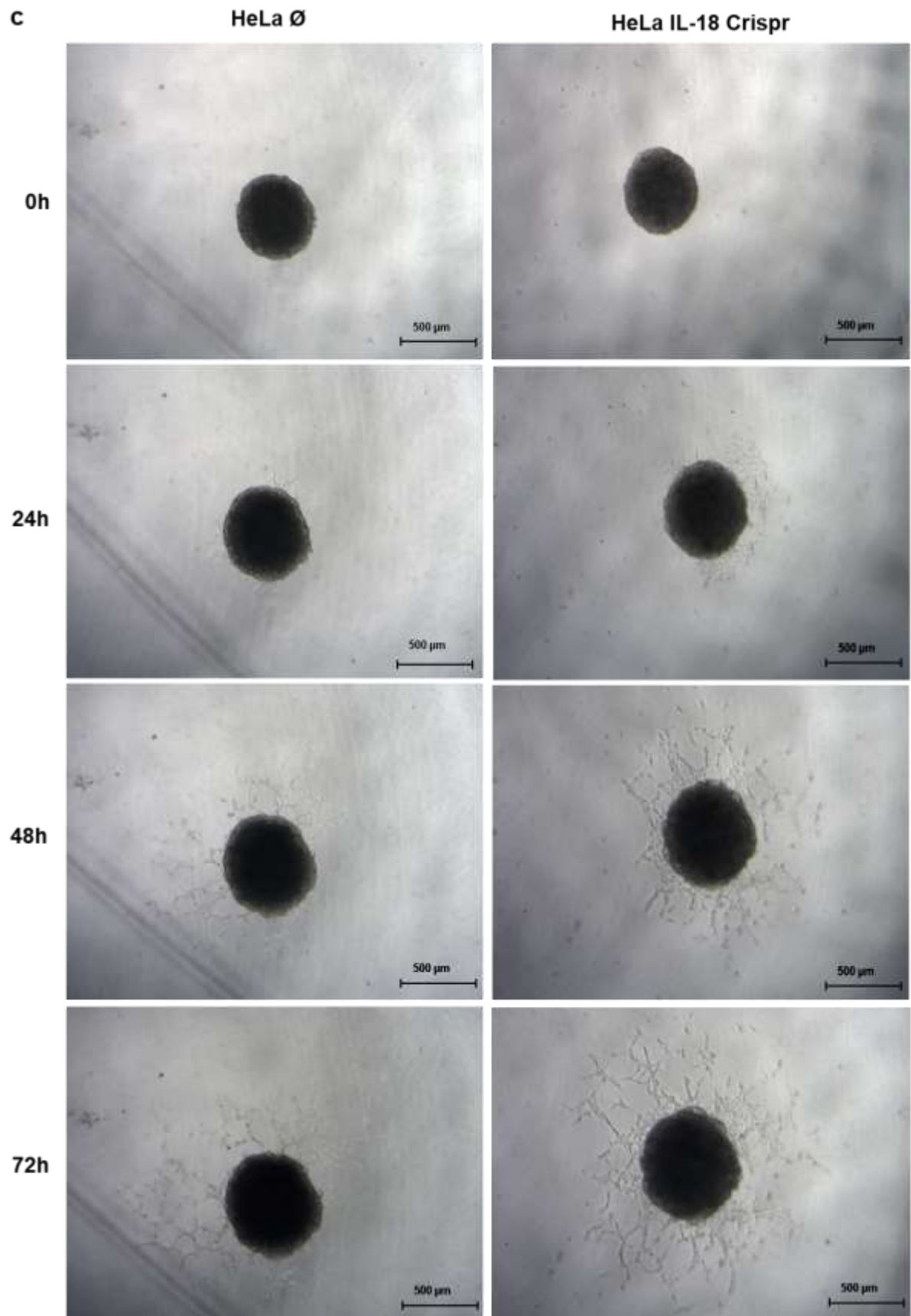


**Figura 32 - Ensaio de invasão. (a)** Gráficos representando a variação na área dos esferoides (SiHa e HeLa) e projeções de invasão (HeLa). **(b)** Aspecto dos esferoides de SiHa de acordo o tempo. **(c)** Aspecto dos esferoides de HeLa de acordo o tempo. Podem ser observadas projeções celulares associadas à invasão. **SiHa  $\emptyset$** : SiHa transduzida com o vetor vazio. **SiHa IL-18 Crispr**: SiHa silenciada para IL-18 via CRISPR-Cas9. **HeLa  $\emptyset$** : HeLa transduzida com o vetor vazio. **HeLa IL-18**

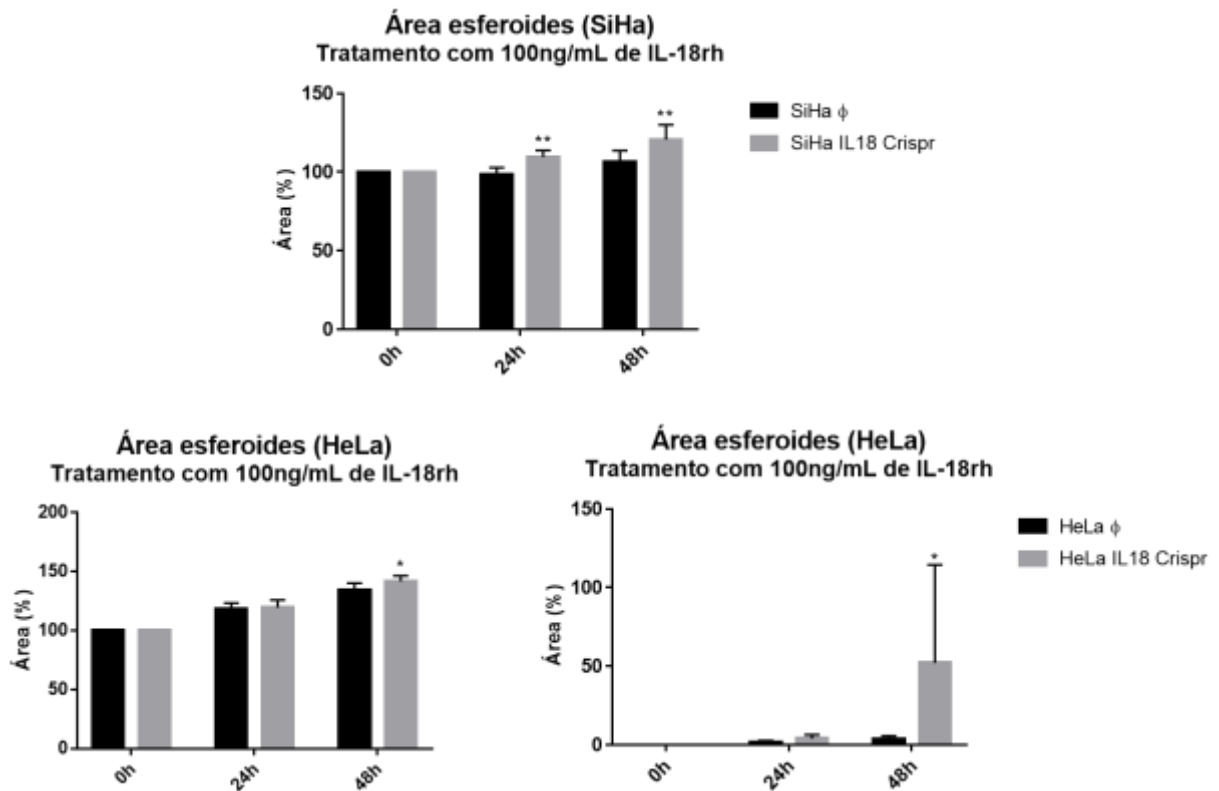
**Crispr:** HeLa silenciada para IL-18 via CRISPR-Cas9. Representação gráfica de três experimentos distintos. Teste estatístico aplicado: ANOVA. (\*\*\*) :  $p < 0,0001$ .

**b**





A área e as projeções de invasão dos esferoides formados pelas linhagens tumorais silenciadas ou contendo o vetor vazio também foram avaliadas na presença de 100ng/mL de IL-18 recombinante humana. Da mesma forma, SiHa (HPV16+) não apresentou capacidade de invasão importante, ao contrário de HeLa (HPV18+). Em ambas as linhagens tumorais o tratamento com a citocina exógena reduziu o crescimento dos esferoides e a capacidade invasora, nas células silenciadas ou não (Figura 33).

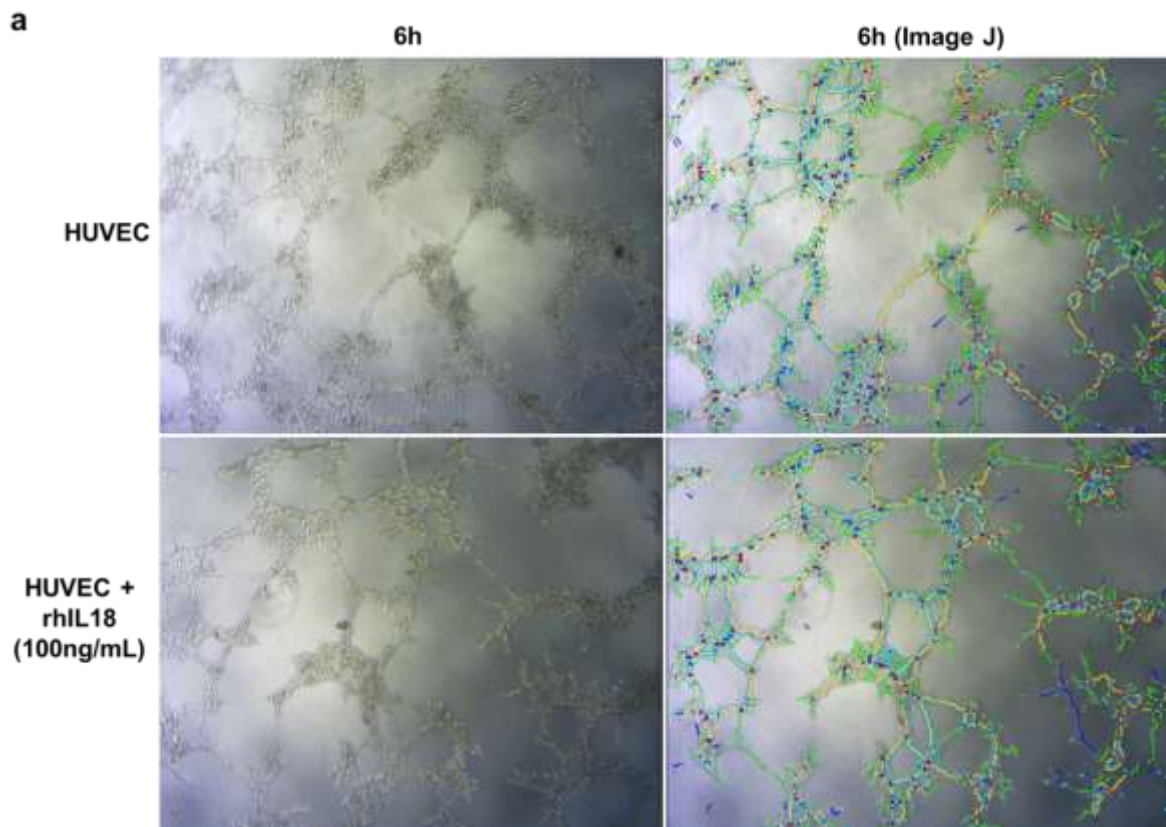


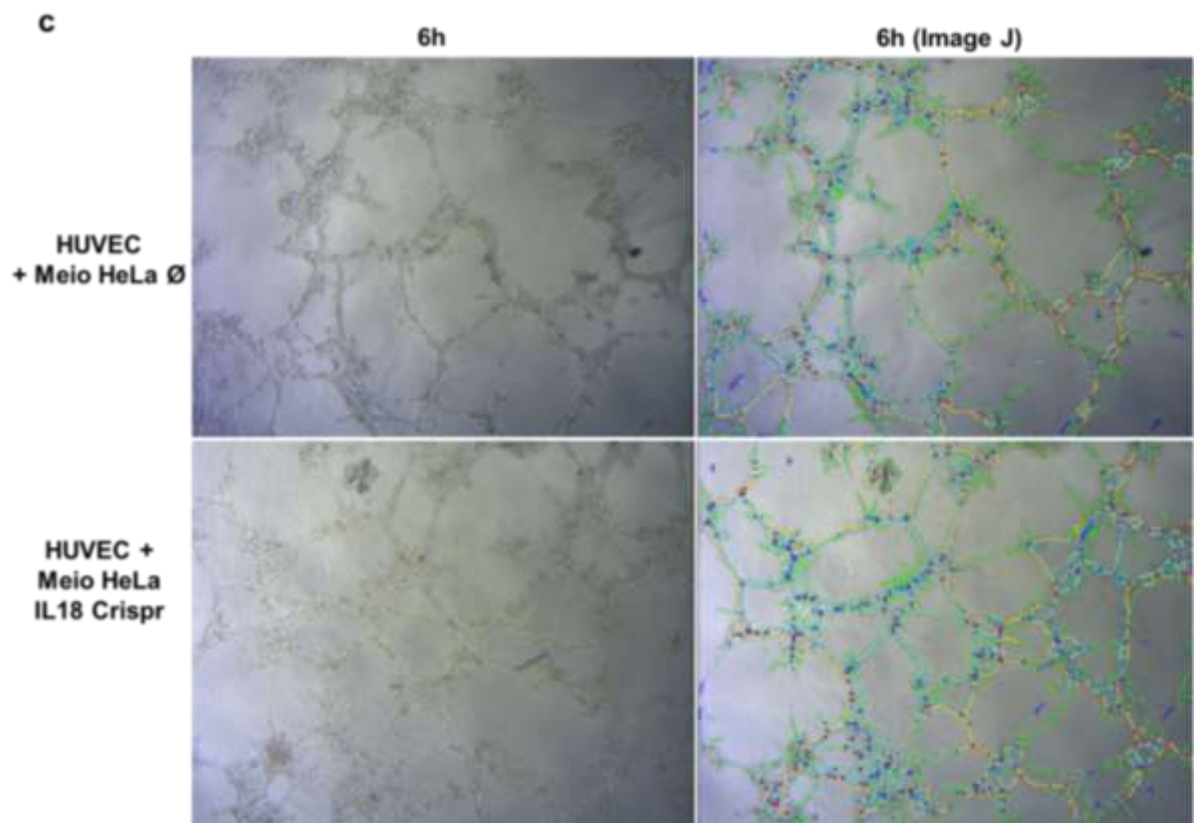
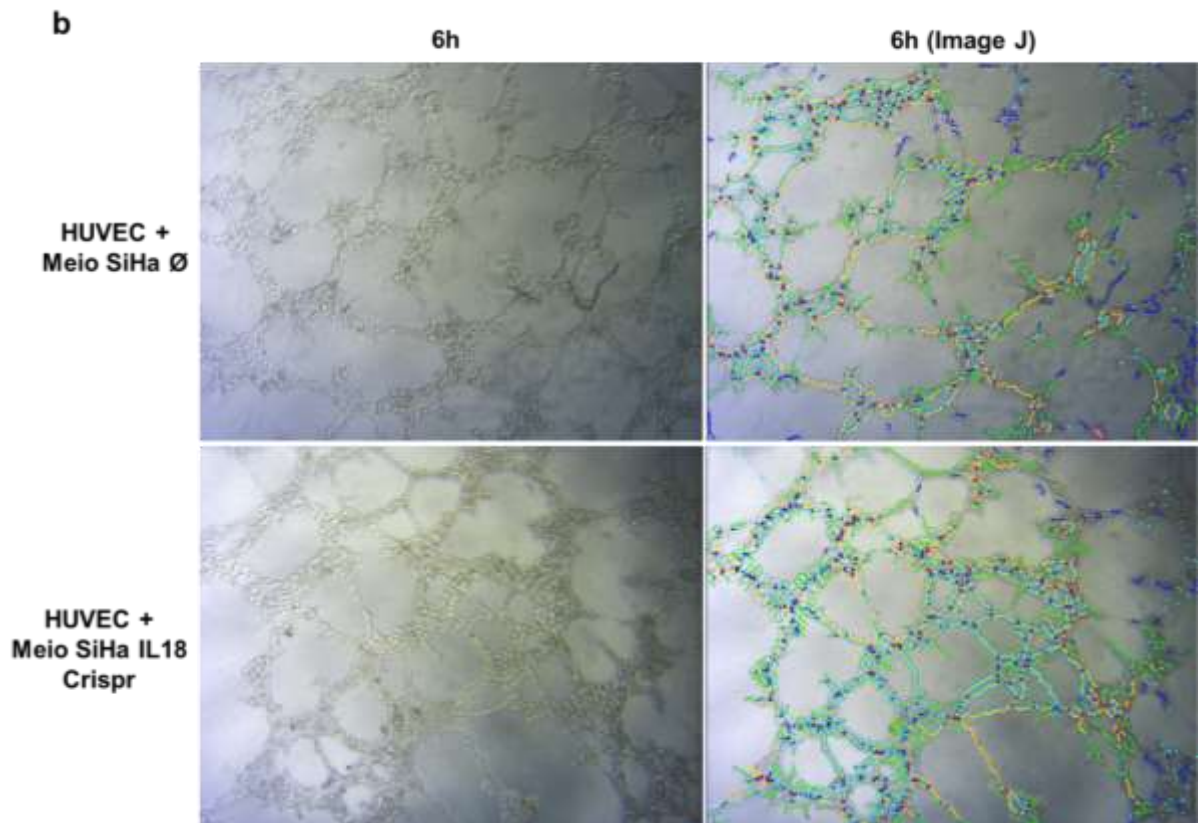
**Figura 33 - Ensaio de invasão com adição de 100ng/mL de IL-18 recombinante humana.** Gráficos representando a variação na área dos esferoides (SiHa e HeLa) e projeções de invasão (HeLa). **SiHa Ø**: SiHa transduzida com o vetor vazio. **SiHa IL-18 Crispr**: SiHa silenciada para IL-18 via CRISPR-Cas9. **HeLa Ø**: HeLa transduzida com o vetor vazio. **HeLa IL-18 Crispr**: HeLa silenciada para IL-18 via CRISPR-Cas9. Teste estatístico aplicado: ANOVA. (\*\*\*\*):  $p < 0,0001$ .

#### 4.4.1.6. Ensaio de angiogênese

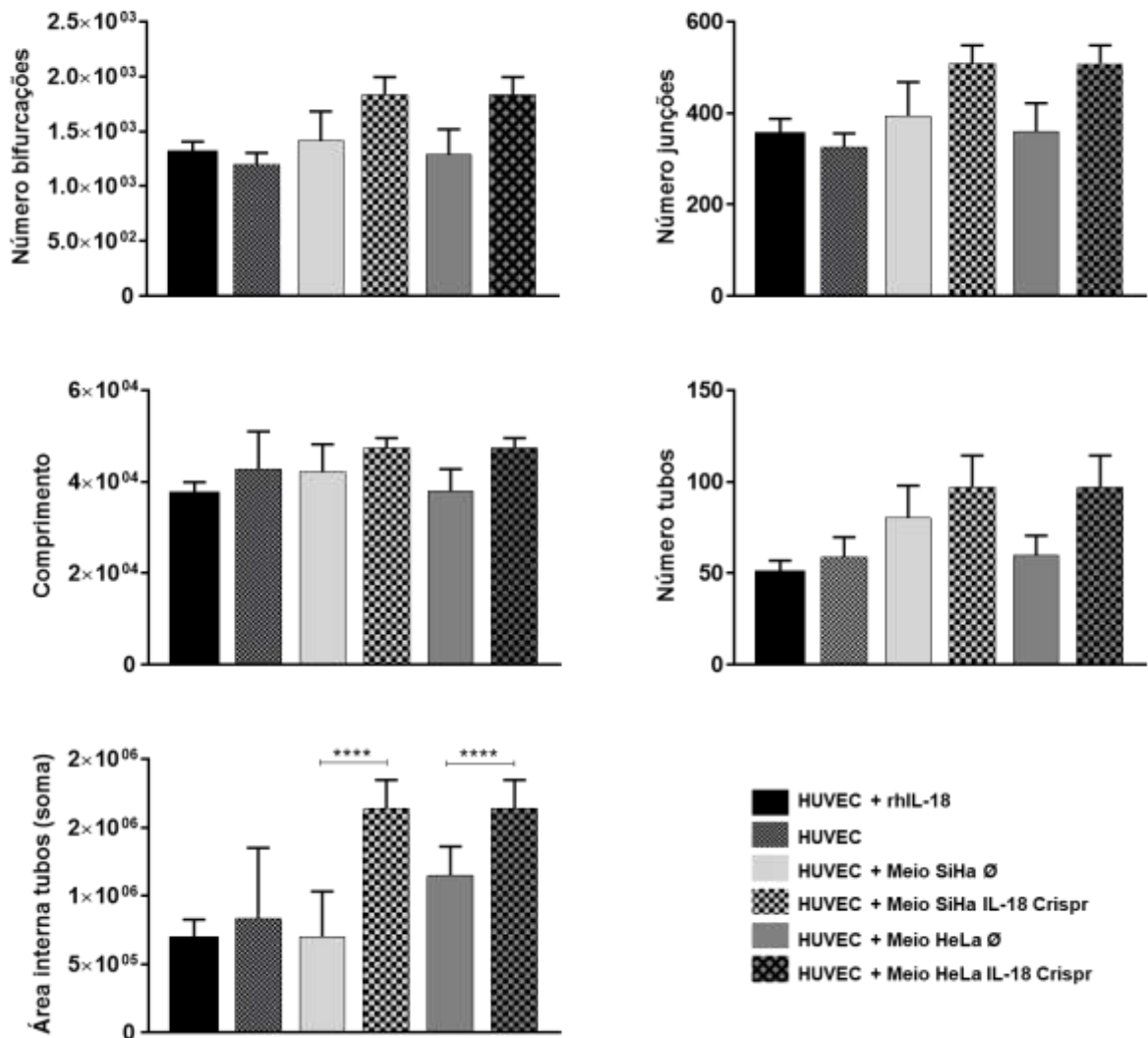
Com o objetivo de avaliar a importância de IL-18 na angiogênese, células HUVEC foram cultivadas em matriz de matrigel na presença de sobrenadante de culturas de HeLa e SiHa (ambas esferoides), silenciadas para a citocina em questão ou contendo o vetor vazio (Figura 34).

Verificou-se que, embora sem diferença estatística, a mensuração da maioria dos elementos associados à angiogênese apontou para uma tendência à maior formação de estruturas tubulares na presença dos sobrenadantes das linhagens silenciadas para IL-18. A análise da soma das áreas das circunferências delimitadas pelos tubos formados apresentou diferença significativa no mesmo sentido (Figura 34d).





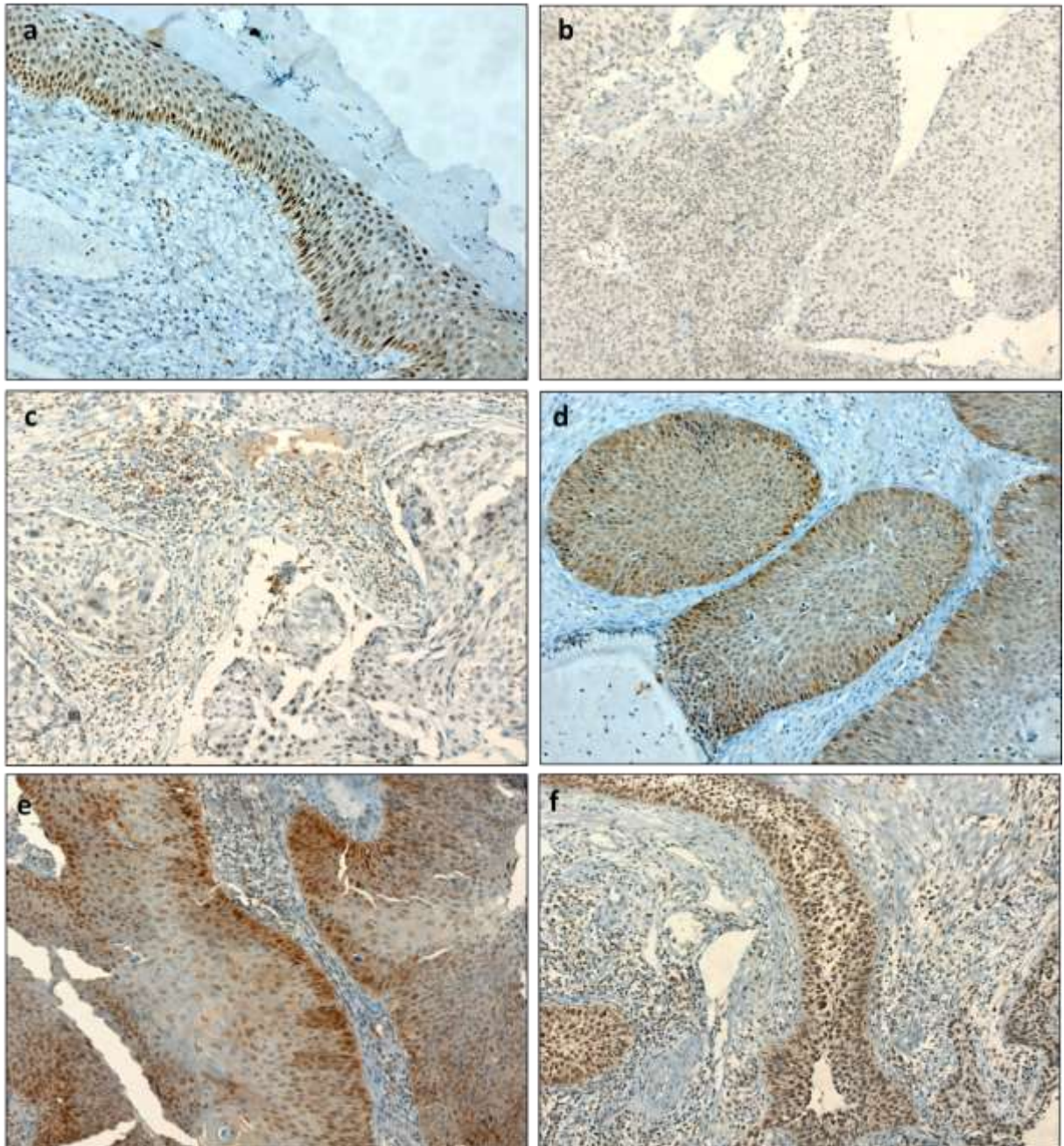
d



**Figura 34 - Ensaio de indução da angiogênese.** Estruturas semelhantes a tubos formadas por células HUVEC em matriz de matrigel após 6h em cultura. A imagem à esquerda corresponde à visualização em microscópio óptico (aumento 1000X). A imagem à direita corresponde à marcação gerada pelo *software* ImageJ para identificação das estruturas componentes dos tubos, a saber: **segmentos** (linhas em amarelo); **bifurcações** (pontos em vermelho); **junções** (pontos circulado em azul, formados pela junção de 3 ou mais segmentos); **ramos** (linhas em verde); **tubos/área dos tubos** (regiões circulares delimitadas por linhas azul ciano); **(a)** HUVECs cultivadas sem e com adição de 100ng/mL de IL-18 recombinante humana. **(b)** HUVECs cultivadas com sobrenadante de SiHaØ e SiHa IL-18 Crispr. **(c)** HUVECs cultivadas com sobrenadante de HeLaØ e HeLa IL-18 Crispr. **(c)** Quantificação dos elementos componentes das estruturas semelhantes a tubos (número de nós, junções, tubos, soma das áreas dos tubos e comprimento) quantificados pelo *software* ImageJ. **SiHa Ø:** SiHa transduzida com o vetor vazio. **SiHa IL-18 Crispr:** SiHa silenciada para IL-18 via CRISPR-Cas9. **HeLa Ø:** HeLa transduzida com o vetor vazio. **HeLa IL-18 Crispr:** HeLa silenciada para IL-18 via CRISPR-Cas9. Representação gráfica de três experimentos distintos. Teste estatístico aplicado: ANOVA. (\*\*\*):  $p < 0,0001$ .

#### 4.5. Avaliação histopatológica: IL-18 em amostras de câncer cervical

Amostras de 62 pacientes com câncer cervical avançado foram analisadas por imunohistoquímica quanto à expressão de IL-18 no tecido tumoral e infiltrado inflamatório.



**Figura 35 - Imunohistoquímica para a detecção de IL-18. (a)** Epitélio normal. Marcação citoplasmática e nuclear. **(b)** Câncer cervical, marcação de intensidade fraca, predominantemente nuclear. Presença de infiltrado inflamatório em pequena quantidade. **(c)** Câncer cervical, marcação de intensidade fraca. Infiltrado presente em grande quantidade, localização principalmente peritumoral. **(d)** Câncer cervical, marcação de intensidade forte, nuclear e citoplasmática. Infiltrado presente em pequena quantidade. **(e)** Câncer cervical, marcação de intensidade forte, predominante nas bordas do tumor, nuclear e citoplasmática. Infiltrado presente em grande quantidade, localização



principalmente peritumoral. **(f)** Câncer cervical, marcação de intensidade forte, predominantemente nuclear. Infiltrado presente em grande quantidade, localização principalmente peritumoral.

A seguir são apresentadas as tabelas referentes à análise estatística dos dados obtidos após avaliação das lâminas pelo patologista (Tabelas 8 a 17).

Foi observada diferença significativa quando comparada a sobrevida global dos pacientes em cujas amostras o infiltrado inflamatório era peritumoral (maior sobrevida global, media de 3,98 anos;  $p=0,047$ ) *versus* peritumoral e intratumoral (media de 2,96 anos) (Tabela 13).

Verificou-se, também, diferença significativa quando avaliada a intensidade da marcação para IL-18 na borda do tumor. Tumores negativos ou com marcação mais intensa nas bordas foram associados à resposta completa ao tratamento ( $p=0,027$ ). A ocorrência de recidiva linfática foi mais frequente nos tecidos negativos para IL-18, e a menor ocorrência foi associada a bordas mais intensamente marcadas ( $p=0,034$ ) (Tabela 11).

**Tabela 8** - Análise descritiva das variáveis categóricas (pacientes e amostras)

<b>Idade das pacientes</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
20-29	3	4.84
30-39	4	6.45
40-49	12	19.35
50-59	21	33.87
60-69	19	30.65
70-79	3	4.84
<b>Grau histológico tumor</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
1	4	6.5
2	46	75.41
3	10	16.39
DA	1	1.64
Não informado	1	
<b>Grupo tratamento</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
CRT	32	51.61
RT	30	48.39
<b>Resposta ao tratamento</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
RC	58	95.08
RP	3	4.92
Não informado	1	
<b>Recidiva</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Sim	36	59.2
Não	25	40.98
Não informado	1	
<b>Recidiva local</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Sim	11	18.03
Não	50	81.97
Não informado	1	
<b>Recidiva linfática</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Sim	13	21.31
Não	48	78.69
Não informado	1	
<b>Recidiva sistêmica</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Sim	16	26.23
Não	45	76.77
Não informado	1	
<b>Óbito por câncer</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Sim	25	40.32
Não (outras causas)	3	4.84
Pacientes vivas	34	54.84

\*DA: dado ausente

**Tabela 9.** Análise descritiva das variáveis categóricas (marcação das amostras com IL-18)

<b>Idade das pacientes (anos)</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
20-29	3	4.84
30-39	4	6.45
40-49	12	19.35
50-59	21	33.87
60-69	19	30.65
70-79	3	4.84
<b>Grau histológico tumor</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
1	4	6.5
2	46	75.41
3	10	16.39
DA	1	1.64
Não informado	1	
<b>Grupo tratamento</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
CRT	32	51.61
RT	30	48.39
<b>Resposta ao tratamento</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
RC	58	95.08
RP	3	4.92
Não informado	1	
<b>Recidiva</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Sim	36	59.2
Não	25	40.98
Não informado	1	
<b>Recidiva local</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Sim	11	18.03
Não	50	81.97
Não informado	1	
<b>Recidiva linfática</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Sim	13	21.31
Não	48	78.69
Não informado	1	
<b>Recidiva sistêmica</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Sim	16	26.23
Não	45	76.77
Não informado	1	
<b>Óbito por câncer</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Sim	25	40.32
Não (outras causas)	3	4.84
Pacientes vivas	34	54.84

\*DA: dado ausente

**Tabela 10** - Análise descritiva das variáveis numéricas

Variável	n	Média	D.P.	Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo
Idade (anos)	62	53.55	11.67	24.00	45.00	55.50	62.00	76.00
Tempo de tratamento (dias)	62	89.81	29.21	34.00	69.00	84.50	106.00	184.00
Escore (núcleo x extensão)	62	5.60	3.31	1.00	3.00	6.00	8.00	12.00
Escore (citoplasma x extensão)	62	5.35	3.36	1.00	3.00	6.00	6.00	12.00
Sobrevida livre de doença (anos)	61	3.23	2.21	0.13	1.39	2.97	5.19	7.40
Sobrevida global (anos)	62	3.46	2.07	0.20	1.53	3.26	5.19	7.40

Tabela 11 – Comparação das variáveis categóricas (marcação do tumor com IL-18)

		Marcação IL-18 tecido tumoral																		
		Intensidade da marcação nuclear (%)			Intensidade da marcação citoplasmática (%)			Extensão da marcação (%)			Distribuição da marcação (%)									
		n	Negativa	Fraca	Forte	p	Negativa	Fraca	Forte	p	Negativo	< 10%	10 a 50%	> 50%	p	Negativo	Uniforme	Mais intensa nas bordas do tumor	p	
<b>Grau histológico tumor</b>																				
1	4	12,90	3,06	8,33	0,00	9,68	10,00	0,00	10,00	10,34	0,00	0,00	10,53	3,25		0,00	10,53	3,25		
2	46	62,90	78,79	83,33	0,446 <sup>2</sup>	85,00	67,74	80,00	80,00	60,00	79,31	75,00	0,393 <sup>2</sup>	80,00	68,42	78,13	0,554 <sup>2</sup>			
3	10	18,75	18,18	8,33	10,00	22,58	10,00	10,00	30,00	10,34	25,00	10,00	21,50	15,63						
DA	1	6,25	0,00	0,00	5,00	0,00	0,00	0,00	10,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		10,00	0,00	0,00		
<b>Tratamento</b>																				
CRT	32	58,82	48,48	50,00	0,781 <sup>1</sup>	33,33	64,52	50,00	36,36	50,00	50,17	58,33	0,708 <sup>1</sup>	36,36	47,37	49,58	0,380 <sup>1</sup>			
RT	30	41,18	51,52	50,00	66,67	35,48	50,00	63,64	50,00	44,83	41,67	63,64	52,63	40,63						
<b>Resposta ao tratamento</b>																				
Completa	58	94,12	93,75	100,00	1,000 <sup>2</sup>	100,00	90,32	100,00	100,00	100,00	100,00	89,29	100,00	0,457 <sup>2</sup>	100,00	83,33	100,00	0,027 <sup>2</sup>		
Parcial	3	5,88	6,25	0,00	0,00	9,68	0,00	0,00	0,00	0,00	10,71	0,00	16,67	0,00						
<b>Recidiva sistêmica</b>																				
Sim	16	23,53	27,27	27,27	1,000 <sup>2</sup>	28,57	29,03	11,11	27,27	40,00	20,69	27,27	0,462 <sup>2</sup>	27,27	31,58	22,58	0,798 <sup>2</sup>			
Não	45	76,47	72,73	72,73	71,43	70,97	88,89	72,73	60,00	79,31	72,73	72,73	72,73	68,42	77,42					
<b>Recidiva linfática</b>																				
Sim	13	35,29	15,15	18,18	0,272 <sup>2</sup>	28,57	19,35	11,11	45,45	0,00	17,24	27,27	0,059 <sup>2</sup>	45,45	28,32	9,68	0,034 <sup>2</sup>			
Não	48	64,71	84,85	81,82	71,43	80,65	88,89	54,55	100,00	82,76	72,73	72,73	54,55	73,68	90,32					
<b>Recidiva local</b>																				
Sim	11	11,76	21,21	18,18	0,901 <sup>2</sup>	14,29	22,58	11,11	9,09	30,00	13,79	27,27	0,509 <sup>2</sup>	9,09	21,05	19,35	0,820 <sup>2</sup>			
Não	50	88,24	78,79	81,82	85,71	77,42	88,89	90,91	70,00	86,21	72,73	72,73	90,91	78,95	80,65					

Tabela 12 – Análise das variáveis categóricas (infiltrado inflamatório)

Infiltrado inflamatório								
	n	Intensidade da marcação para IL-18 (%)			p	Localização do infiltrado		p
		Negativa	Fraca	Forte		Peritumoral	Peritumoral + intratumoral	
<b>Grau histológico tumor</b>								
1	4	15.38	6.67	0.00	0.121 <sup>2</sup>	6.90	6.45	1.000 <sup>2</sup>
2	46	84.62	63.33	88.24		75.86	74.19	
3	10	0.00	26.67	11.76		17.24	16.13	
DA	1	0.00	3.33	0.00		0.00	3.23	
<b>Tratamento</b>								
CRT	32	53.85	61.29	35.29	0.225 <sup>1</sup>	53.33	51.61	0.083 <sup>1</sup>
RT	30	46.15	38.71	64.71		46.67	48.39	
<b>Resposta ao tratamento</b>								
Completa	58	91.67	96.77	94.12	0.769 <sup>2</sup>	100.00	90.32	0.238 <sup>2</sup>
Parcial	3	8.33	3.23	5.88		0.00	9.68	
<b>Recidiva sistêmica</b>								
Sim	16	46.15	19.35	25.00	0.187 <sup>2</sup>	20.00	33.33	0.243 <sup>1</sup>
Não	45	53.85	80.65	75.00		80.00	66.67	
<b>Recidiva linfática</b>								
Sim	13	23.08	16.13	31.25	0.461 <sup>2</sup>	20.00	23.33	0.754 <sup>1</sup>
Não	48	76.92	83.87	68.75		80.00	76.67	
<b>Recidiva local</b>								
Sim	11	23.08	9.68	31.25	0.176 <sup>2</sup>	20.00	16.67	0.739 <sup>1</sup>
Não	50	76.92	90.32	68.75		80.00	83.33	

\*DA: dado ausente

**Tabela 13** - Comparação das variáveis numéricas (localização do infiltrado)

Localização Infiltrado inflamatório	Variável	n	Média	D.P.	Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo	<i>p</i>
Peritumoral	Idade (anos)	30	56.37	11.46	27.00	50.00	58.00	63.00	76.00	<b>0.029</b>
	Tempo tratamento (meses)	30	94.83	29.65	61.00	71.00	86.50	107.00	184.00	0.104
	Escore núcleo	30	5.77	3.33	1.00	3.00	6.00	8.00	12.00	0.624
	Escore citoplasma	30	5.27	3.53	1.00	2.00	6.00	8.00	12.00	0.751
	Sobrevida livre de doença (anos)	30	3.63	2.21	0.17	1.80	3.66	5.60	7.40	0.117
	Sobrevida global (anos)	30	3.98	2.01	0.30	2.39	3.93	5.71	7.40	<b>0.047</b>
Peritumoral + Intratumoral	Idade (anos)	31	50.61	11.48	24.00	42.00	52.00	59.00	75.00	
	Tempo tratamento (meses)	31	85.00	30.33	34.00	64.00	75.00	99.00	177.00	
	Escore núcleo	31	5.48	3.38	1.00	3.00	6.00	6.00	12.00	
	Escore citoplasma	31	5.55	3.24	1.00	4.00	6.00	6.00	12.00	
	Sobrevida livre de doença (anos)	30	2.81	2.21	0.13	0.65	2.43	5.11	7.06	
	Sobrevida global (anos)	31	2.96	2.08	0.20	1.19	2.64	5.11	7.06	

\*Valor *p* referente ao teste de Mann-Whitney para comparação dos valores entre 2 grupos.

**Tabela 14** - Análise de regressão de Cox univariada para sobrevida livre de doença (n=61).

Variável	Categorias	Valor-P	H.R.*	IC 95% H.R.*
Idade	≥60 anos (ref.)	---	1.00	---
	50-59 anos	0.560	0.75	0.28 – 2.00
	<50 anos	0.381	1.51	0.60 – 3.82
Idade	Variável contínua (anos)	0.147	0.974	0.939 – 1.009
Tratamento/Grupo	CRT (ref.)	---	1.00	---
	RT	0.141	1.83	0.82 – 4.07
Grau histológico	1-2 (ref.)	---	1.00	---
	3-4	0.836	0.89	0.31 – 2.61
Resposta ao tratamento	RC (ref.)	---	1.00	---
	RP	0.005	10.31	2.01 – 52.89
Toxicidade aguda	Não (ref.)	---	1.00	---
	Sim	0.624	0.79	0.31 – 2.00
Toxicidade tardia	Não (ref.)	---	1.00	---
	Sim	0.192	0.55	0.23 – 1.35
Núcleo	Negativo (ref.)	---	1.00	---
	+1	0.749	0.86	0.35 – 2.14
	+2	0.601	0.72	0.21 – 2.46
Citoplasma	Negativo (ref.)	---	1.00	---
	+1	0.721	0.86	0.38 – 1.97
	+2	0.204	0.37	0.08 – 1.71
Extensão da marcação	Negativo (ref.)	---	1.00	---
	+1	0.662	0.77	0.23 – 2.53
	+2	0.126	0.45	0.16 – 1.25
	+3	0.468	0.64	0.20 – 2.12
Intensidade da marcação na borda do tumor	Negativo (ref.)	---	1.00	---
	Uniforme	0.459	0.67	0.23 – 1.93
	Intensa	0.157	0.49	0.18 – 1.32
Score núcleo/extensão	>1.5 (ref.)	---	1.00	---
	≤1.5	0.202	1.82	0.73 – 4.56
Score núcleo/extensão	Variável contínua	0.386	0.945	0.832 – 1.743
Score citoplasma/extensão	>5.0 (ref.)	---	1.00	---
	≤5.0	0.325	1.48	0.68 – 3.25
Variável	Categorias	Valor-P	H.R.*	IC 95% H.R.*
Score citoplasma/extensão	Variável contínua	0.247	0.927	0.816 – 1.054
Intensidade da marcação do infiltrado	Negativo (ref.)	---	1.00	---
	+1	0.353	0.62	0.23 – 1.70
	+2/+3	0.528	1.40	0.50 – 3.95
Localização do infiltrado	Peritumoral (ref.)	---	1.00	---
	Peri+Intratumoral	0.224	1.64	0.74 – 3.62

\*HR (*Hazard Ratio*) = Razão de risco para recidiva; (n=36 Censuras e n=25 Recidivas). IC 95% HR = Intervalo de 95% de confiança para a razão de risco. Ref.: nível de referência.

**Tabela 15** - Análise de regressão de Cox multivariada para sobrevida livre de doença (n=53).

Variáveis selecionadas	Categorias	Valor-P	H.R.*	IC 95% H.R.*
Resposta ao tratamento	RC (ref.)	---	1.00	---
	RP	0.009	8.98	1.75 – 46.06

\* HR (*Hazard Ratio*) = Razão de risco para recidiva; (n=32 Censuras e n=21 Recidivas). IC 95% HR = Intervalo de 95% de confiança para a razão de risco. Critério *Stepwise* de seleção de variáveis. Ref.: nível de referência.



**Tabela 16** – Análise de regressão de Cox univariada para sobrevida (n=62).

Variável	Categorias	Valor-P	H.R.*	IC 95% H.R.*
Idade	≥60 anos (ref.)	---	1.00	---
	50-59 anos	0.189	0.49	0.17 – 1.43
	<50 anos	0.293	1.60	0.67 – 3.87
Idade	Variável contínua (anos)	0.035	0.960	0.924 – 0.997
Tratamento/Grupo	CRT (ref.)	---	1.00	---
	RT	0.379	1.43	0.65 – 3.15
Grau histológico	1-2 (ref.)	---	1.00	---
	3-4	0.732	1.19	0.44 – 3.19
Resposta ao tratamento	RC (ref.)	---	1.00	---
	RP	<0.001	25.16	4.94 – 128.12
Toxicidade aguda	Não (ref.)	---	1.00	---
	Sim	0.266	0.57	0.21 – 1.54
Toxicidade tardia	Não (ref.)	---	1.00	---
	Sim	0.254	0.61	0.26 – 1.43
Núcleo	Negativo (ref.)	---	1.00	---
	+1	0.851	0.91	0.35 – 2.38
	+2	0.856	0.90	0.27 – 2.94
Citoplasma	Negativo (ref.)	---	1.00	---
	+1	0.971	0.98	0.42 – 2.31
	+2	0.420	0.58	0.16 – 2.16
Extensão da marcação	Negativo (ref.)	---	1.00	---
	+1	0.594	0.70	0.19 – 2.62
	+2	0.270	0.55	0.19 – 1.60
	+3	0.698	0.79	0.24 – 2.60
Intensidade da marcação na borda do tumor	Negativo (ref.)	---	1.00	---
	Uniforme	0.778	0.85	0.29 – 2.55
	Intensa	0.228	0.52	0.18 – 1.50
Score núcleo/extensão	<3.5 (ref.)	---	1.00	---
	≥3.5	0.837	0.91	0.36 – 2.28
Score núcleo/extensão	Variável contínua	0.753	0.980	0.865 – 1.110
Score citoplasma/extensão	>8.5 (ref.)	---	1.00	---
	≤8.5	0.391	1.70	0.51 – 5.68
Score citoplasma/extensão	Variável contínua	0.597	0.968	0.857 – 1.093
Intensidade da marcação do infiltrado	Negativo (ref.)	---	1.00	---
	+1	0.374	0.63	0.23 – 1.75
	+2/+3	0.593	1.33	0.47 – 3.77
Localização do infiltrado	Peritumoral (ref.)	---	1.00	---
	Peri+Intratumoral	0.211	1.66	0.75 – 3.67

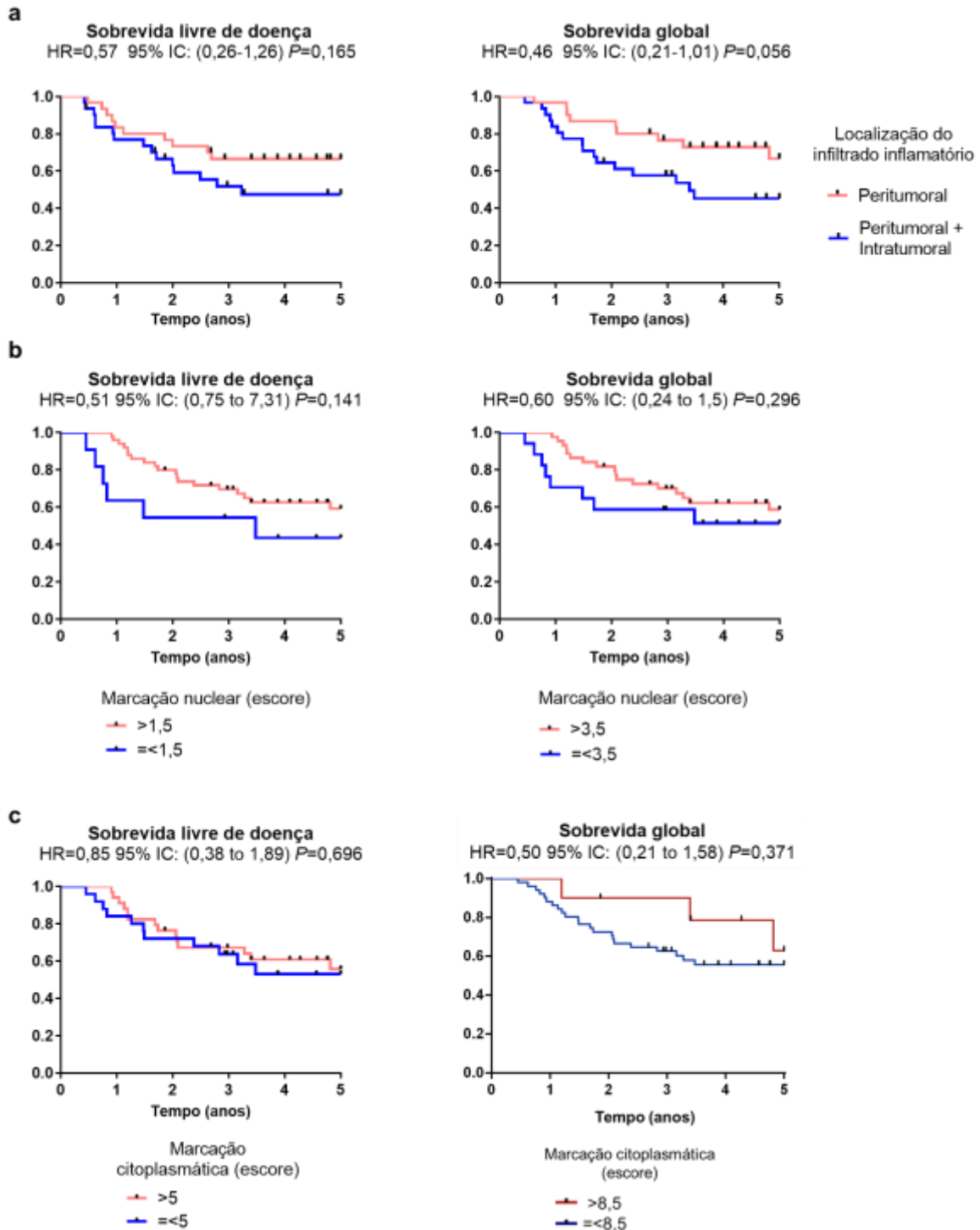
\* HR (*Hazard Ratio*) = Razão de risco para óbito; (n=37 Censuras e n=25 Óbitos). IC 95% HR = Intervalo de 95% de confiança para a razão de risco. Ref.: nível de referência.

**Tabela 17** - Análise de regressão de Cox multivariada para sobrevida (n=54).

Variáveis selecionadas	Categorias	Valor-P	H.R.*	IC 95% H.R.*
1. Resposta ao tratamento	RC (ref.)	---	1.00	---
	RP	<0.001	21.97	4.31 – 111.85

\*HR (*Hazard Ratio*) = Razão de risco para óbito; (n=33 Censuras e n=21 Óbitos). IC 95% HR = Intervalo de 95% de confiança para a razão de risco. Critério *Stepwise* de seleção de variáveis. Ref.: nível de referência.

As curvas de sobrevida global e sobrevida livre de doença em relação à localização do infiltrado inflamatório e escore de marcação para IL-18 nuclear e citoplasmática são apresentadas abaixo (Figura 36). Embora não tenha sido observada diferença significativa, verificou-se tendência a melhores resultados quando a localização do infiltrado era peritumoral ou quando os escores de marcação para IL-18 eram maiores.



**Figura 36 - Análise de sobrevida global e sobrevida livre de doença.** \*HR (Hazard Ratio)=Razão de risco. IC 95%= Intervalo de 95% de confiança. Kaplan-Meier.

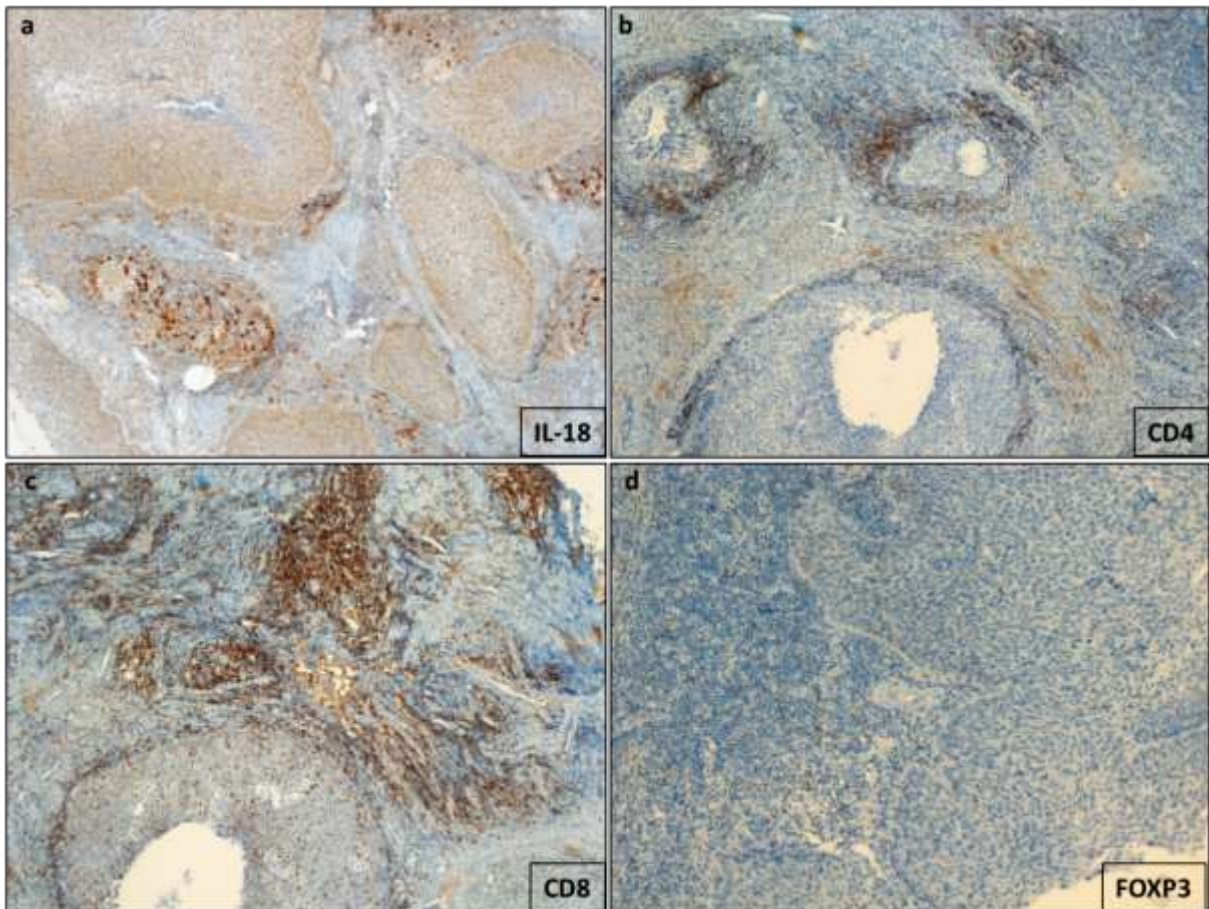
#### **4.6. Avaliação histopatológica: caracterização do infiltrado inflamatório**

Considerando-se a importância do microambiente tumoral e seus componentes imunes, bem como a participação da IL-18 como citocina mediadora das interações entre eles, decidiu-se por caracterizar o infiltrado inflamatório nas mesmas 62 amostras de câncer cervical avançado já avaliadas quanto à marcação por IL-18. A seguir são apresentados resultados preliminares, visto que a análise estatística ainda será realizada.

Apenas para fins descritivos, a figura 37 representa uma amostra proveniente de uma paciente de 64 anos, diagnosticada com carcinoma cervical de células escamosas estágio IIIB, grau histológico 3. A paciente foi submetida ao tratamento por radioterapia (exclusivamente), por 64 dias. Apresentou recidiva linfática e foi a óbito por câncer cervical.

Quanto à marcação para IL-18, apresentou escore nuclear e citoplasmático igual a 8, maior intensidade de marcação nas bordas do tumor, e infiltrado fortemente marcado para a mesma citocina, de localização principalmente peritumoral (Figura 37a).

Quanto à caracterização do infiltrado inflamatório, a leitura realizada pelo patologista apontou para importante marcação para CD4 nas margens de invasão do tumor e estroma (Figura 37b), marcação para CD8 de localização intratumoral (tumor inflamado), peritumoral e estroma (Figura 37c), coloração bastante rara para FOXP3 (marcador células T reguladoras; Figura 37d) e positiva para NCAM1 (CD56; marcador células NK) na margem de invasão e estroma (não mostrado).

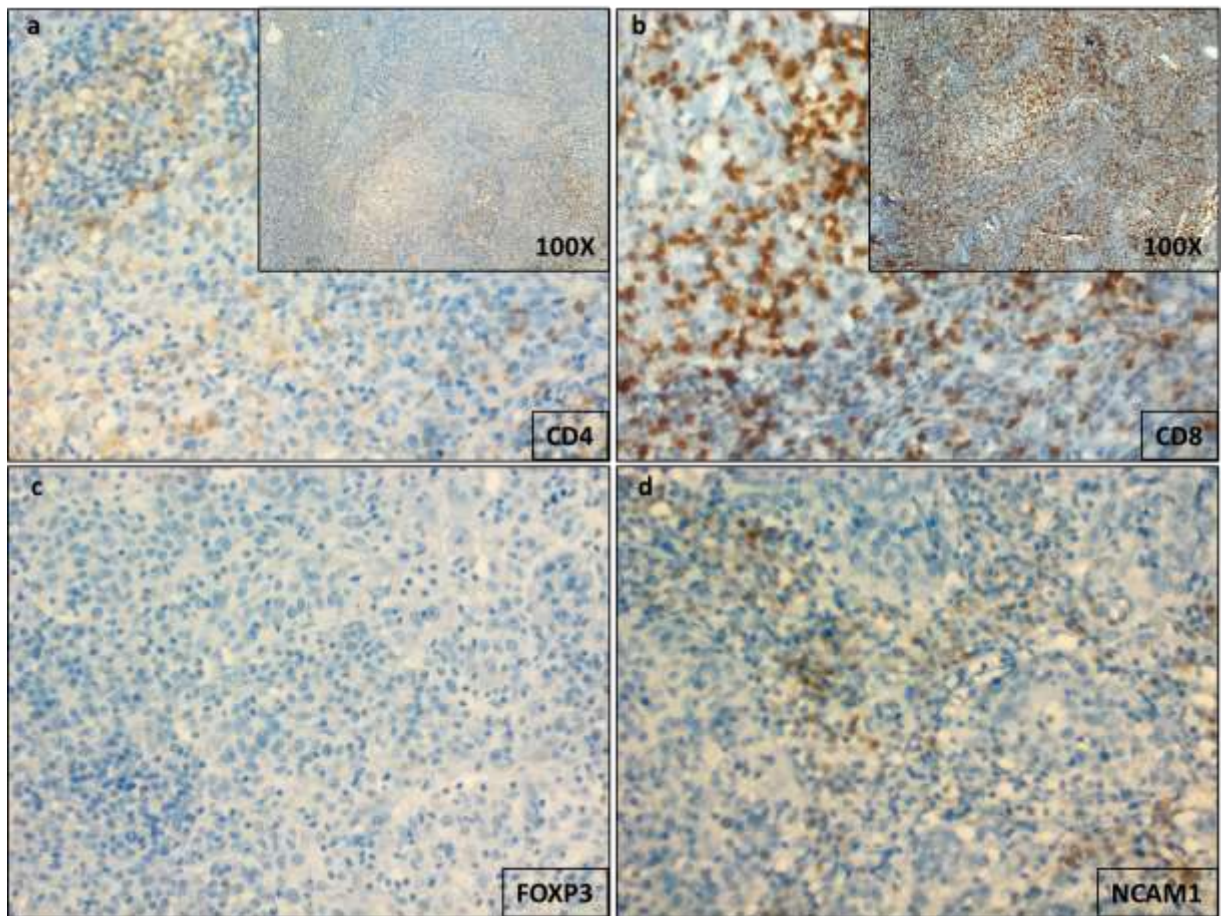


**Figura 37: Imunohistoquímica para a detecção de IL-18, CD4, CD8 e FOXP3.** Imagens obtidas em microscópio óptico, aumento de 100x.

Ainda para fins descritivos, a figura 38 representa uma amostra proveniente de uma paciente de 59 anos, diagnosticada com carcinoma cervical de células escamosas estágio IIIB, também de grau histológico 3. A paciente foi submetida ao tratamento por radioterapia e quimioterapia associadas, por 79 dias. Não apresentou recidiva e não foi a óbito.

Quanto à marcação para IL-18, apresentou escore nuclear e citoplasmático igual a 8, marcação mais intensa nas bordas do tumor, e infiltrado inflamatório fracamente marcado para a mesma citocina, de localização peritumoral e intratumoral (Figura não apresentada).

Quanto à caracterização do infiltrado inflamatório, a leitura realizada pelo patologista apontou marcação fraca para CD4 de localização intratumoral, peritumoral e estroma (Figura 38a), marcação intensa para CD8 de localização intratumoral (tumor inflamado) e fraca na região peritumoral e estroma (Figura 38b), coloração negativa para FOXP3 (marcador células T reguladoras; Figura 38c) e positiva para NCAM1 (CD56; marcador células NK) no estroma (Figura 38d).



**Figura 38: Imunohistoquímica para a detecção de CD4, CD8, FOXP3 e NCAM1.** Imagens obtidas em microscópio óptico, aumento de 200x. Em (a) e (b) são mostrados quadros em destaque com menor aumento (100x).

## 5. Discussão

---

A atuação do sistema imune no contexto tumoral é alvo de diversos estudos. Se por um lado a relação entre inflamação e câncer já foi bem estabelecida, principalmente no que se refere ao papel da inflamação crônica na promoção e progressão tumoral, em outro extremo, a utilização de componentes do sistema imune para o tratamento do câncer tem se mostrado uma alternativa promissora [90][91]. Este talvez seja um dos maiores desafios em se tratando de imunidade e câncer: muitas vezes, as mesmas células e até mesmo mediadores inflamatórios semelhantes, contribuem para um resultado anti ou pró-tumoral. Como contornar a habilidade das células tumorais de recrutar, a seu favor, instrumentos de defesa do organismo?

Hoje sabe-se que o câncer é uma doença heterogênea, e que sua progressão é resultado da interação dos diversos componentes do microambiente tumoral, incluindo células tumorais, potencialmente heterogêneas entre si, sistema imune, estroma, e as diversas proteínas relacionadas, refletindo sua complexidade de compreensão e tratamento. O aprofundamento em cada uma dessas áreas básicas tem possibilitado, como resultado de anos de estudos, a construção de conhecimentos sólidos que sustentam os avanços no diagnóstico e tratamento desta doença que tanto impacto causa na sociedade.

Quadros de inflamação crônica podem preceder o desenvolvimento tumoral, promovendo um microambiente instável que, juntamente com outros cofatores, favorece o surgimento de alguns tipos de câncer, comprovadamente associados à inflamação inicial. Em outras situações, a instabilidade genômica típica de tumores já estabelecidos favorece o desenvolvimento de um quadro inflamatório crônico, capaz de comprometer a resposta antitumoral e recrutar células imunossupressoras como células supressoras de origem mieloide, macrófagos M2 e linfócitos T regulatórios. Em ambos os casos, o resultado é pró-tumoral [92].

De forma geral, as citocinas são importantes mediadores da interação entre resposta imune e tumor. Muitas são produzidas não apenas pelas células imunológicas, mas também pelas tumorais e outras presentes no microambiente imune tumoral, como fibroblastos. No caso específico dos mediadores da inflamação, uma família de citocinas

merece destaque: a família da IL-1. Neste trabalho foram abordadas a IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-18, além de seus receptores e antagonistas. Tais proteínas têm sido alvo de muitos estudos que envolvem desde doenças inflamatórias, autoimunes e câncer, desempenhando, neste último caso, papel anti ou pró-tumoral, a depender do contexto, modelo experimental e tipo de tumor [92].

Algumas das questões iniciais deste estudo envolviam avaliar a função da IL-1 nos tumores cervicais, citocina já identificada como diferencialmente expressa em dados anteriores do grupo de pesquisa envolvido neste trabalho [93]. Conforme demonstrado na figura 18, tanto IL-1 $\alpha$  quanto IL-1 $\beta$  são expressas pelos queratinócitos normais, conforme já demonstrado na literatura [20], mas também pelos queratinócitos transduzidos com os oncogenes de HPV16. Nota-se que a expressão, principalmente de IL-1 $\beta$ , encontra-se reduzida na presença do oncogene E6, quando comparada com E7, ambos isoladamente, apresentando-se em nível intermediário quando transduzidos os dois oncogenes simultaneamente (Figura 18a).

Em estudo publicado por Ainouze e colaboradores (2018), foi demonstrado que a infecção por HPV16 induz a produção de IL-1 $\beta$  pelos queratinócitos. No entanto, a expressão dos genes precoces do vírus, em especial E6, leva à degradação de p53, inibição da transcrição de IRF6 e regulação negativa do promotor de IL-1 $\beta$ , consistindo em um mecanismo de evasão da resposta imune antiviral [81]. Niebler *et al.* (2013) já haviam demonstrado a regulação pós-traducional de IL-1 $\beta$  na presença de E6 de HPV16, por meio da degradação via proteassoma [68].

Nos queratinócitos imortalizados pelos oncogenes E6 e E7 de HPV16, mantidos em cultura por mais de 100 passagens (neste estudo), observa-se uma tendência à redução dos níveis das citocinas, de forma discreta para IL-1 $\alpha$  e drástica para IL-1 $\beta$ , tendência esta, mantida nas linhagens tumorais de origem cervical C33 (HPV negativa), SiHa e HeLa (contendo HPV16 e 18 respectivamente).

Além do acúmulo dos transcritos virais, acredita-se que o processo e transformação celular possa, também, estar envolvido. Cabe ressaltar que, neste caso, foram avaliados os níveis do precursor de IL-1 $\beta$  (31kD). A figura 18b mostra que a redução dos níveis de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  nas linhagens tumorais se dá ao nível transcricional, concordando com o apresentado pelo estudo supracitado, bem como por trabalhos desenvolvidos por outros autores [81][68].

Quando se trata dos receptores de IL-1, também é observada a redução da

expressão ao nível proteico, no caso de IL-1R1 e já ao nível transcricional no caso do receptor *decoy* IL-1R2, nas linhagens tumorais. O receptor acessório, IL-1RAcP, também se encontra menos expresso, com exceção de C33, apontando para um efeito potencialmente atribuído ao HPV (Figura 19).

Ainda no que tange aos receptores, é interessante notar que, nos queratinócitos imortalizados por E6/E7, nos quais foi notada a redução de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , pode ser observado o aumento de IL-1R1 (indutor da via) e a redução de IL-1R2 (inibidor da via), possivelmente um ajuste à menor disponibilidade dos agonistas nesse caso.

Finalmente, neste sentido, a proteína IL-1Ra, antagonista natural de IL-1, apresentou redução significativa nos queratinócitos transduzidos com E6 e E7 em relação ao vetor vazio, e foi praticamente indetectável nas linhagens tumorais (Figura 20).

Considerando-se os resultados obtidos neste estudo e o demonstrado pelos demais trabalhos encontrados na literatura, a regulação da expressão dos componentes da via da IL-1 se dá por mecanismos variados. Conforme apresentado na figura 21, o tratamento com o agente demetilante 5-AZA promoveu o aumento da transcrição, de forma variada a depender da célula e gene envolvido, sugerindo o papel de alterações epigenéticas, neste caso a metilação, na regulação da via de IL-1. Convém que tais dados sejam mais profundamente investigados, bem como a participação do HPV neste processo. Não se deve excluir a possibilidade de que a presença do 5-AZA, por si só, tenha sido reconhecida pelos receptores celulares de danos (DAMPs) levando ao estímulo as respectivas vias imunes.

Visto que, de forma geral, a expressão de IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , seus receptores e antagonistas naturais é praticamente inexistente, buscou-se avaliar a importância da IL-18, outro importante mediador pró-inflamatório, pertencente à mesma família de citocinas, e cujo papel no contexto tumoral ainda não está bem estabelecido.

Os resultados de diversos estudos convergem para o fato de que a IL-18 interfere, de forma relevante, no microambiente tumoral. No entanto, a depender do contexto, sua atuação pode induzir ou conter aspectos importantes dos tumores como proliferação, migração e invasão. A interação com o microambiente imune também pode variar, estimulando a resposta contra as células tumorais ou favorecendo o desenvolvimento de características imunossupressoras [92][94].



Conforme apresentado na figura 24, ao contrário do observado para IL-1, IL-18 permanece expressa nas linhagens tumorais cervicais, a nível de transcrito e proteína. Já foi descrito que, diferentemente de IL-1 $\beta$ , o precursor de IL-18 é constitutivamente pelos queratinócitos e por praticamente todas as células epiteliais [74]. A atividade de seu promotor é bem maior em C33 quando comparada a SiHa e HeLa, o que se reflete nos níveis da proteína precursora de 24kD. Os resultados mostram a produção da proteína madura (18kD) nas mesmas linhagens, bem como a expressão do antagonista natural da via, IL-18BP.

Em comparação à linhagem C33, os níveis de IL-18 nas linhagens SiHa e HeLa, são significativamente menores. Cabe lembrar que uma das atividades desta citocina é a indução da produção de IFN $\gamma$ , importante componente da imunidade antiviral [95]. Dessa forma, a redução da produção de IL-18 nas células tumorais HPV positivas pode representar, mais uma vez, um mecanismo de evasão do sistema imune por parte do vírus.

Quanto aos receptores de IL-18, verificou-se a expressão elevada de IL-18R $\beta$ , principalmente em SiHa e HeLa. IL-18R $\beta$ , o receptor acessório da citocina, é constitutivamente expresso, enquanto IL-18 $\alpha$  é o componente induzível [96]. A presença de ambos é necessária para a indução da sinalização. Considerando que neste caso as células não foram previamente induzidas, a baixa expressão de IL-18R $\alpha$  é justificável (Figura 25).

Conforme anteriormente mencionado, IL-1 $\beta$  e IL-18 são produzidos na forma de seus precursores, que precisam ser clivados em sua porção N-terminal para se tornarem ativos. O complexo do inflamassoma está classicamente envolvido neste processo, ativando a caspase-1, responsável pela clivagem propriamente dita dos precursores. Formas não canônicas de ativação das citocinas em questão foram descritas, e envolvem a ação de serino-proteases e metaloproteinases, além da caspase-8 [97][98].

Na figura 26 são apresentados os níveis de mRNA relativos aos genes envolvidos na síntese das proteínas componentes dos diferentes tipos de inflamassoma, bem como da caspase-1 e da proteína acessória ASC. Observam-se transcritos de NLRP3 nas três linhagens tumorais estudadas, bem como de NLRP1, este último principalmente em HeLa. Verificam-se níveis significantes de transcritos de AIM2 em SiHa, em acordo com dados da literatura que apontam para a ativação desse tipo de

inflamassoma pelo HPV16 [99]. Interessantemente, a expressão de NOD1 (mRNA) em C33, SiHa e HeLa foi bastante importante. Estudos prévios não incluem NOD1 entre os principais inflamassomas envolvidos na resposta antiviral, na qual destacam-se NLRP3, RIG-1 e AIM2 [100].

Considerando-se os resultados acima expostos, verificou-se que, embora presentes nos queratinócitos normais e transduzidos com os oncogenes de HPV16, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1RA e seus receptores são modulados negativamente de forma importante nas linhagens tumorais de origem cervical, talvez em consequência de um mecanismo de evasão imunológica viral, que acaba por favorecer o desenvolvimento tumoral. Ao contrário, IL-18, IL-18BP e seus receptores continuam sendo expressos nas mesmas células. Dessa forma, buscou-se avaliar sua importância no contexto do câncer do colo do útero.

Visando à avaliação da função de IL-18 no câncer cervical, umas das estratégias utilizadas foi o silenciamento desta citocina através da edição gênica pela técnica de CRISPR-Cas9. Uma vez comprovado o silenciamento, foram realizados ensaios funcionais para avaliar o impacto desta citocina na proliferação, capacidade de formação de colônias, migração, invasão e indução da angiogênese no modelo de estudo utilizado.

Com relação à proliferação celular, o silenciamento de IL-18 reduziu significativamente a capacidade proliferativa, tanto de SiHa quanto de HeLa. O tratamento das células com IL-18 recombinante humana não foi suficiente para reverter os efeitos do silenciamento (Figura 28). Da mesma forma, houve uma tendência à redução da capacidade de formação de colônias nas linhagens editadas, significativa em HeLa (Figura 30). O silenciamento de IL-18 não interferiu de forma relevante na migração celular (Figura 31).

Os ensaios envolvendo esferoides foram desenvolvidos com o objetivo de criar condições mais próximas às observadas nos tumores sólidos. Este modelo foi utilizado para a avaliação da invasão e indução da angiogênese. Tanto em HeLa quanto em SiHa, a área dos esferoides formados pelas células silenciadas foi maior, o que pode sugerir, mas não comprovar, maior proliferação celular em seu interior. Quanto à invasão, HeLa silenciada apresentou maior capacidade invasiva, embora sem significância do ponto de vista estatístico. Os esferoides de SiHa não foram avaliados pois não apresentaram projeções de invasão na matriz de matrigel (Figura 32). O

tratamento com IL-18 recombinante humana pareceu reduzir a capacidade de invasão (Figura 33).

Para a avaliação da angiogênese, foram consideradas diferentes variáveis que contribuem para a quantificação da malha formada pelas células endoteliais (HUVECs). Para todas as variáveis houve uma tendência à indução da angiogênese quando as células endoteliais foram cultivadas com o sobrenadante das linhagens tumorais silenciadas para IL-18. Foi observada diferença significativa quando avaliada a área total relativa à soma das áreas delimitadas por cada um dos tubos formados (Figura 34).

O papel da IL-18 na biologia tumoral é controverso e dependente do contexto e do microambiente [87]. A observação da elevada expressão desta citocina associada a piores prognósticos em determinados tipos de tumores, como carcinoma hepatocelular, câncer gástrico e pancreático, aponta para seu possível papel pró-tumoral [101][102][103].

Foi demonstrado, por exemplo, que IL-18 pode induzir a produção de fatores pró-angiogênicos, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que por sua vez, pode induzir a expressão e o processamento de IL-18 [104][105][106]. A migração celular também pode ser favorecida por esta citocina através do estímulo à polimerização de filamentos de actina, da promoção de alterações na expressão de moléculas de adesão e proteínas constituintes das *tight junctions* [105][107][108]. Da mesma forma, a associação entre IL-18 e o aumento da capacidade de migração e invasão foram previamente reportados, inclusive através do aumento da produção de metaloproteinases [113][114]. Neste sentido, estudos também demonstraram que a redução da expressão de IL-18 em um modelo de câncer de estômago resultou em menor crescimento tumoral, angiogênese e metástase *in vivo* [109].

Ao contrário, outros trabalhos indicam um papel protetor de IL-18. Nilkaeo & Bhuvanath (2006) mostraram que o tratamento de linhagens celulares de carcinoma oral com a citocina em questão implicou na redução da proliferação de forma dose-dependente [110]. No que tange à indução da angiogênese, a maioria dos trabalhos aponta para o papel indutor de IL-18. No entanto, alguns estudos indicam que esta citocina pode desempenhar função contrária, por exemplo, ao estimular a morte de células endoteliais.

Chandrasekar *et al.* (2005), demonstraram que o tratamento com IL-18 induz à morte por apoptose de células endoteliais cardíacas via ativação de PTEN dependente

de NF- $\kappa$ B [111]. Resultados semelhantes foram demonstrados em outros trabalhos, onde a apoptose foi acelerada pela indução do receptor 2 de leucotrieno. Renhai *et al.* (1999) também mostraram a ação antiproliferativa da citocina sobre células endoteliais *in vitro* e antiangiogênica *in vivo* [112].

Em um estudo utilizando células-tronco mesenquimais, a indução da produção de IL-18 levou à supressão da proliferação, migração e invasão de linhagens celulares de câncer de mama [115]. A associação entre IL-18 e IL-12 também foi relacionada à inibição da angiogênese e capacidade e invasão em modelo de carcinoma mamário murino [116].

Até este momento, foram discutidos os resultados dos ensaios considerando exclusivamente o efeito da IL-18 nas células tumorais. Para tal, decidiu-se pela utilização de duas estratégias: o silenciamento da citocina por edição gênica e a adição exógena de IL-18 recombinante humana. Acredita-se que esta seja uma abordagem válida para avaliar os impactos desta citocina no comportamento celular, inclusive por se tratar de um mediador com ação autócrina e parácrina. Dessa forma é esperado que, nas culturas de células silenciadas, a ausência da produção, maturação e liberação da citocina, com conseqüente ausência da ativação dos receptores de IL-18 nas células em cultura, implique nas alterações observadas e mencionadas nos resultados acima discutidos.

No entanto, não se pode descartar a possibilidade de que a IL-18 possa agir ao nível intracelular, interferindo em vias de sinalização, ou até mesmo atuando como fator de transcrição. Essa pode ser uma possibilidade, principalmente em se tratando de queratinócitos, células nas quais, conhecidamente, a citocina em questão é encontrada de forma constitutiva, e cujo silenciamento pode interferir na homeostase celular. Além deste estudo, outros dados da literatura mostram a marcação nuclear relativa à presença de IL-18, e esta hipótese merece ser melhor investigada [117].

Outra questão que merece ser discutida é o tipo de HPV envolvido em cada uma das situações avaliadas neste estudo, representada pela utilização de linhagens tumorais contendo e expressando genes de HPV16 (SiHa) e HPV18 (HeLa). Além das propriedades inerentes a cada tipo viral, as linhagens são derivadas de tumores de diferentes origens (SiHa é derivada de carcinoma de células escamosas e HeLa é originada de adenocarcinoma).

Neste estudo, observou-se a maior sensibilidade de HeLa (HPV18+) ao

silenciamento do gene *IL18*, inferida através dos resultados dos ensaios funcionais, nos quais tal linhagem apresentou maiores variações nos quesitos capacidade de formação de colônias, migração e invasão, além de viabilidade, citotoxicidade e apoptose após tratamento com cisplatina.

Cabe ressaltar, mais uma vez, a importância do microambiente. São as interações entre seus diversos componentes e o tumor as principais responsáveis pelo desfecho observado. Provavelmente, os efeitos mais importantes da IL-18 no contexto tumoral são os originados através de sua atuação como mediador entre células do sistema imune e células tumorais. Mais uma vez, a depender do contexto, do tipo de tumor e de características específicas dos pacientes, a citocina pode exercer atividade pró ou antitumoral.

IL-18 desempenha um papel importante na imunidade mediada por células. Além dos queratinócitos, células dendríticas e macrófagos são fontes importantes, as principais inclusive, desta citocina [118]. Sua ação promove a ativação e proliferação de células T e NK, potencializam sua atividade citotóxica e a produção de INF- $\gamma$  [118][119].

A administração de IL-18 recombinante foi capaz de induzir a resposta imune antitumoral através da ativação de células NK e TCD4+ em modelo de melanoma *in vivo*, reduzindo o crescimento tumoral e metástase [120]. A presença de números elevados de células NK intratumorais foi relacionada a melhores prognósticos. Ao contrário, pacientes com menor atividade destas células, apresentam maior risco de desenvolverem câncer [121][122][123].

Outra demonstração da importância da interação entre os diferentes componentes do microambiente tumoral, é a indução de células NK chamadas de *cytokine-induced memory-like NK cells*, resultado da incubação de células NK com IL-18, mas também com IL-12 e IL-15. A produção de INF- $\gamma$  é potencializada em tais células, bem como o efeito antitumoral, consistindo em uma estratégia terapêutica promissora [124][125][126]. De forma semelhante, a coadministração de IL-18 e IL-12 via adenovírus oncolíticos, promoveu o surgimento de uma importante área de necrose tumoral e a infiltração de células NK, CD4+ e CD8+ em modelo de melanoma murino (B16-F10) [127].

Considerando os dados da literatura e os resultados iniciais deste trabalho, buscou-se avaliar o papel da IL-18 em um modelo que contemplasse a interação entre IL-18, sistema imune, tumor e microambiente tumoral. Par tal, foram analisadas biópsias

de 62 pacientes diagnosticadas com carcinoma cervical epidermoide estágio IIIB, tratadas com cisplatina e radioterapia simultaneamente *versus* apenas radioterapia.

A análise descritiva das variáveis numéricas (Tabela 10), mostra que a idade média das pacientes incluídas no estudo foi de 53,55 anos, o tempo de tratamento médio foi de 89,81 dias e as médias de sobrevida livre de doença e sobrevida global foram de 3,23 e 3,46 anos, respectivamente.

Com relação à marcação para IL-18, 72,58% das amostras apresentou marcação nuclear e 63,13% apresentou marcação citoplasmática no tecido tumoral, de intensidade fraca ou forte. Com relação ao infiltrado inflamatório, em 78,69% das amostras foi detectada a expressão de IL-18 por células do sistema imune. Outros achados relevantes foram a maior intensidade da marcação na borda da maioria dos tumores positivos para IL-18, bem como a distribuição do infiltrado inflamatório, encontrado apenas na borda do tumor (48,18%) e no interior e borda do tumor (50,82%).

Não foi observada diferença estatística nas comparações entre intensidade da marcação nuclear ou citoplasmática e grau histológico do tumor, tipo de tratamento, resposta ao tratamento e recidiva (local, sistêmica ou linfática). Quando avaliadas extensão e distribuição da marcação, houve uma forte tendência à maior chance de recidiva linfática nos tumores negativos ( $p=0,059$  e  $0,034$ , respectivamente) (Tabela 11).

Quanto à relação entre distribuição da marcação por IL-18 e resposta ao tratamento, que apontou para maior chance de resposta completa nas amostras negativas ou em cuja marcação tenha se concentrado predominantemente nas bordas do tumor ( $p=0,027$ ), deve ser considerado que o baixo número de pacientes que apresentaram resposta parcial ( $n=3$ ) faz com que tal dado deva ser avaliado com cautela (Tabela 11).

No que tange à localização do infiltrado inflamatório, a avaliação das variáveis categóricas não permitiu estabelecer nenhuma relação significativa. Já a comparação com as variáveis numéricas apontou para uma maior sobrevida global para as pacientes em cujos tumores o infiltrado era predominantemente peritumoral ( $p=0,047$ ). Neste caso, seria interessante identificar o tipo de células imunes envolvidas. Tais ensaios já foram realizados e estão sendo analisados quanto à estatística.

Quanto à distribuição do infiltrado inflamatório no tecido tumoral, foram propostas

três classificações pela literatura [6]. A primeira engloba tumores nos quais se observa a exclusão de linfócitos T citotóxicos do *core* tumoral. Ao contrário, verifica-se sua presença ao longo das bordas da lesão, onde tais células podem estar em contato com macrófagos associados ao tumor, que podem, potencialmente, impedir sua migração para o interior do tumor. A hipótese é de que sejam tumores pouco imunogênicos [128].

A segunda classificação inclui tumores caracterizados pela infiltração de células citotóxicas e linfócitos no *core* tumoral. Há também elevada expressão de PD-1 pelas células imunes e PD-L1 por parte do tumor, o que implica em melhor resposta ao tratamento com inibidores de *checkpoints* imunes [6].

Há ainda uma terceira classe, enquadrada como uma subclasse da mencionada anteriormente, caracterizada pela presença de agregados linfoides, cuja composição celular é semelhante à dos linfonodos, incluindo linfócitos T *naïve* e ativados, linfócitos *Treg* e células dendríticas. Geralmente presentes nas margens de invasão do tumor e no estroma, atuam como sítios de recrutamento e ativação imune, geralmente, mas não sempre, associados a melhores prognósticos [6][129][130][131].

Considerando-se as curvas de sobrevida (Figura 36), verifica-se que a positividade para a marcação com IL-18 está associada a uma tendência à obtenção de melhores desfechos, embora sem que tenha sido obtida diferença significativa. O aumento da amostragem seria uma opção para a confirmação do dado, que é bastante interessante, e pode conferir à IL-18 utilidade como biomarcador.

A aplicação dos efeitos antitumorais da IL-18 tem sido observada em diversos estudos clínicos, que buscam comprovar seu potencial terapêutico, de forma isolada ou em conjunto com outras drogas. Estudos de fase I, envolvendo pacientes diagnosticados com tumores sólidos avançados e linfomas, evidenciaram que a IL-18 apresenta atividade imunomodulatória, além de toxicidade limitada [87].

No entanto, cabe sempre ressaltar a necessidade da avaliação do microambiente tumoral como um todo, composto por diversos componentes cuja interação é a principal responsável pelo desfecho obtido. Cada tumor constitui uma entidade particular, cuja abordagem depende de vários aspectos, o que justifica a necessidade de buscas e colaborações contínuas entre as diversas áreas de pesquisa em saúde.

A compreensão do funcionamento de cada um desses componentes de forma isolada e em conjunto fornece conhecimentos valiosos com enorme potencial

terapêutico e prognóstico, não somente para o câncer cervical. A junção de cada “peça” deste “quebra-cabeça”, possível apenas com estudos colaborativos, tem permitido alcançar avanços incríveis no tratamento do câncer, gerar esperança e reduzir o sofrimento de tantos pacientes.



## 6. Conclusões

---

De forma geral, observou-se modulação importante da via da IL-1, provavelmente associadas tanto à presença dos oncogenes do HPV e às estratégias virais de evasão da resposta imune, quanto ao processo de transformação celular.

- Verificou-se a expressão de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , importantes citocinas pró-inflamatórias, nos queratinócitos normais e transduzidos com os oncogenes de HPV16. Nas linhagens tumorais C33 (HPV-), SiHa (HPV16+) e HeLa (HPV18+), os níveis de tais citocinas é praticamente inexistente nas células não induzidas. Os resultados apontam para possível papel da metilação gênica neste caso. IL-18, no entanto, foi encontrada constitutivamente expressa em todas as linhagens avaliadas, inclusive as tumorais, embora em menores níveis nas células HPV positivas.
- A expressão do antagonista natural de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , IL-1Ra, seguiu os mesmos padrões dos agonistas da via. IL-18BP foi detectado em todas as linhagens tumorais avaliadas. O balanço entre IL-18 e IL-18BP sugere maior atividade de IL-18 em HeLa (HPV18+) do que em SiHa (HPV16+);
- A expressão dos receptores IL-1R1, IL-1RAcP e IL-1R2 foi, também, indetectável nas linhagens tumorais cervicais, apontando para a modulação negativa da via. Os receptores de IL-18 permaneceram expressos.
- O silenciamento de IL-18 nas linhagens tumorais implicou em: menor capacidade proliferativa e de formações de colônias; maior capacidade invasiva e tendência à maior indução da angiogênese. O tratamento com IL-18 recombinante humana não foi capaz de reverter os efeitos da edição gênica quanto à proliferação celular, mas reduziu de forma significativa a capacidade de invasão;
- A viabilidade de todas as linhagens foi reduzida após tratamento com cisplatina, principalmente em HeLa (HPV18+) silenciada para IL-18. Foi observada maior citotoxicidade após o tratamento com platina em HeLa, também de forma mais expressiva nas células editadas. A apoptose foi praticamente indetectável nas linhagens não tratadas, aumentando consideravelmente após adição de cisplatina. Em nenhum

dos casos o tratamento concomitante com IL-18 recombinante humana implicou na alteração dos resultados obtidos com o uso do fármaco isolado;

- Foi observada uma tendência à melhor prognóstico associado à expressão de IL-18 nos tumores cervicais analisados. A intensidade da marcação para a citocina nas bordas dos tumores e a localização do infiltrado inflamatório parecem ser aspectos importantes a serem avaliados.

## 7. Referências Bibliográficas

---

- [1] Dagogo-Jack I, Shaw AT. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2018; 15: 81–94.
- [2] Wainstein AJ, Calabrich A, Melo AC de. Diretrizes brasileiras de manejo de toxicidades imunomediadas associadas ao uso de bloqueadores de correceptores imunes. *Brazilian J Oncol* 2017; 13: 1–15.
- [3] Wang M, Zhao J, Zhang L, et al. Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *J Cancer* 2017; 8: 761–773.
- [4] Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer. *Science* 2011; 331: 1565–70.
- [5] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 2011; 144: 646–674.
- [6] Binnewies M, Roberts EW, Kersten K, et al. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat Med* 2018; 24: 541–550.
- [7] WHO. UN Joint Global Programme on Cervical Cancer Prevention and Control. 2016; 1–4.
- [8] Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I BF. Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 2018; 1–6.
- [9] Castellsagué X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2008; 110: 4–7.
- [10] Patel C, Brotherton JML, Pillsbury A, et al. The impact of 10 years of human papillomavirus (HPV) vaccination in Australia: What additional disease burden will a nonavalent vaccine prevent? *Eurosurveillance* 2018; 23: 30–40.
- [11] INCA. Tipos de câncer Câncer do colo do útero, <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-do-colo-do-utero> (2019, accessed 19 August 2019).
- [12] BRASIL. Programa Nacional de Imunização—Boletim Informativo Vacinação contra o HPV—2017. Brasília-DF; 2017. p. 18.
- [13] Mendes W, Gross F, Id D, et al. Low coverage of HPV vaccination in the national immunization programme in Brazil: Parental vaccine refusal or barriers in health- service based vaccine delivery ? 2018; 1–14.
- [14] Bruni L, Diaz M, Barrionuevo-Rosas L, et al. Global estimates of human papillomavirus vaccination coverage by region and income level: A pooled analysis. *Lancet Glob Heal* 2016; 4: e453–e463.

- [15] ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. ICTV Report (10th). Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses. Papillomaviridae., [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_online\\_report/dsdna-viruses/w/papillomaviridae](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/dsdna-viruses/w/papillomaviridae) (2019, accessed 20 August 2019).
- [16] Van Doorslaer K, Chen Z, Bernard HU, et al. ICTV virus taxonomy profile: Papillomaviridae. *J Gen Virol* 2018; 99: 989–990.
- [17] Doorbar J, Quint W, Banks L, et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine* 2012; 30: F55–F70.
- [18] de Sanjosé S, Brotons M, Pavón MA. The natural history of human papillomavirus infection. *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology* 2018; 47: 2–13.
- [19] Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: From basic studies to clinical application. *Nature Reviews Cancer* 2002; 2: 342–350.
- [20] Stanley MA. Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus. *Clinical Microbiology Reviews* 2012; 25: 215–222.
- [21] Woodman CBJ, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: Unresolved issues. *Nature Reviews Cancer* 2007; 7: 11–22.
- [22] Kahn JA. HPV vaccination for the prevention of cervical intraepithelial neoplasia. *N Engl J Med* 2009; 361: 271.
- [23] Münger K, Phelps WC, Bubb V, et al. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol* 1989; 63: 4417–21.
- [24] McBride AA, Warburton A. The role of integration in oncogenic progression of HPV-associated cancers. *PLoS Pathogens* 2017; 13: 1–7.
- [25] Mariewheeler C. Natural History of Human Papillomavirus Infections, Cytologic and Histologic Abnormalities, and Cancer. 2008; 35: 519–536.
- [26] O’Leary JJ, White C, Spillane C, et al. Cervical screening: A new way forward (tests of risk and tests of disease). *HRB Open Res* 2018; 1: 3.
- [27] Fabrizii M, Moinfar F, Jelinek HF, et al. Fractal analysis of cervical intraepithelial neoplasia. *PLoS One*; 9. Epub ahead of print 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0108457.
- [28] Rodríguez AC, Schiffman M, Herrero R, et al. Rapid Clearance of Human Papillomavirus and Implications for Clinical Focus on Persistent Infections. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100: 513–517.
- [29] Franceschi S, Herrero R, Clifford GM, et al. Variations in the age-specific curves of human papillomavirus prevalence in women worldwide. *Int J Cancer* 2006; 119: 2677–2684.
- [30] Schiffman M, Doorbar J, Wentzensen N, et al. Carcinogenic human

- papillomavirus infection. *Nat Rev Dis Prim*; 2. Epub ahead of print 2016. DOI: 10.1038/nrdp.2016.86.
- [31] Appleby P, Beral V, Berrington De González A, et al. Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: Collaborative reanalysis of individual data on 13,541 women with carcinoma of the cervix and 23,017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies. *Int J Cancer* 2006; 118: 1481–1495.
- [32] Collaboration I, Studies E, Cancer C. Cervical cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data for 16 573 women with cervical cancer and 35 509 women without cervical cancer from 24 epidemiological studies. *Lancet* 2007; 370: 1609–1621.
- [33] Rajkumar T, Cuzick J, Appleby P, et al. Cervical carcinoma and reproductive factors: Collaborative reanalysis of individual data on 16,563 women with cervical carcinoma and 33,542 women without cervical carcinoma from 25 epidemiological studies. *Int J Cancer* 2006; 119: 1108–1124.
- [34] Plummer M, de Martel C, Vignat J, et al. Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *Lancet Glob Heal* 2016; 4: e609–e616.
- [35] Plummer M, de Martel C, Vignat J, et al. Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *Lancet Glob Heal* 2016; 4: e609–e616.
- [36] Steinbach A, Riemer AB. Immune evasion mechanisms of human papillomavirus: An update. *Int J Cancer* 2018; 142: 224–229.
- [37] Stanley M. Immunobiology of HPV and HPV vaccines. *Gynecol Oncol* 2008; 109: 15–21.
- [38] Bashaw AA, Leggatt GR, Chandra J, et al. Modulation of antigen presenting cell functions during chronic HPV infection. *Papillomavirus Res* 2017; 4: 58–65.
- [39] Sasagawa T, Takagi H. Immune responses against human papillomavirus ( HPV ) infection and evasion of host defense in cervical cancer. *J Infect Chemother* 2012; 18: 807–815.
- [40] Fausch SC, Fahey LM, Da Silva DM, et al. Human Papillomavirus Can Escape Immune Recognition through Langerhans Cell Phosphoinositide 3-Kinase Activation. *J Immunol* 2005; 174: 7172–7178.
- [41] Leong CM, Doorbar J, Nindl I, et al. Deregulation of E-cadherin by human papillomavirus is not confined to high-risk, cancer-causing types. *Br J Dermatol* 2010; 163: 1253–1263.
- [42] Deligeoroglou E, Giannouli A, Athanasopoulos N, et al. HPV infection: Immunological aspects and their utility in future therapy. *Infect Dis Obstet Gynecol*; 2013. Epub ahead of print 2013. DOI: 10.1155/2013/540850.
- [43] Burgers WA, Blanchon L, Pradhan S, et al. Viral oncoproteins target the DNA methyltransferases. *Oncogene* 2007; 26: 1650–1655.

- [44] Cicchini L, Westrich JA, Xu T, et al. Suppression of antitumor immune responses by human papillomavirus through epigenetic downregulation of CXCL14. *MBio* 2016; 7: 1–13.
- [45] Laurson J, Khan S, Chung R, et al. Epigenetic repression of E-cadherin by human papillomavirus 16 E7 protein. *Carcinogenesis* 2010; 31: 918–926.
- [46] Rincon-Orozco B, Halec G, Rosenberger S, et al. Epigenetic silencing of interferon- $\kappa$  in human papillomavirus type 16-positive cells. *Cancer Res* 2009; 69: 8718–8725.
- [47] Pacini L, Savini C, Ghittoni R, et al. Downregulation of Toll-Like Receptor 9 Expression by Beta Human Papillomavirus 38 and Implications for Cell Cycle Control. *J Virol* 2015; 89: 11396–11405.
- [48] Hasan UA, Zannetti C, Parroche P, et al. The Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein induces a transcriptional repressor complex on the Toll-like receptor 9 promoter. *J Exp Med* 2013; 210: 1369–1387.
- [49] Park JS, Kim EJ, Kwon HJ, et al. Inactivation of interferon regulatory factor-1 tumor suppressor protein by HPV E7 oncoprotein. Implication for the E7-mediated immune evasion mechanism in cervical carcinogenesis. *J Biol Chem* 2000; 275: 6764–6769.
- [50] Li S, Labrecque S, Gauzzi MC, et al. The human papilloma virus (HPV)-18 E6 oncoprotein physically associates with Tyk2 and impairs Jak-STAT activation by interferon- $\alpha$ . *Oncogene* 1999; 18: 5727–5737.
- [51] Lau A, Gray EE, Brunette RL, et al. DNA tumor virus oncogenes antagonize the cGAS-STING DNA-sensing pathway. *Science (80- )* 2015; 350: 568–571.
- [52] Evans M, Borysiewicz LK, Evans AS, et al. Antigen Processing Defects in Cervical Carcinomas Limit the Presentation of a CTL Epitope from Human Papillomavirus 16 E6. *J Immunol* 2001; 167: 5420–5428.
- [53] Hasim A, Abudula M, Aimiduo R, et al. Post-Transcriptional and Epigenetic Regulation of Antigen Processing Machinery (APM) Components and HLA-I in Cervical Cancers from Uighur Women. *PLoS One*; 7. Epub ahead of print 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0044952.
- [54] Mehta AM, Jordanova ES, Kenter GG, et al. Association of antigen processing machinery and HLA class I defects with clinicopathological outcome in cervical carcinoma. *Cancer Immunol Immunother* 2008; 57: 197–206.
- [55] Steinbach A, Winter J, Reuschenbach M, et al. ERAP1 overexpression in HPV-induced malignancies: A possible novel immune evasion mechanism. *Oncoimmunology* 2017; 6: 1–9.
- [56] Fausch SC, Da Silva DM, Rudolf MP, et al. Human Papillomavirus Virus-Like Particles Do Not Activate Langerhans Cells: A Possible Immune Escape Mechanism Used by Human Papillomaviruses. *J Immunol* 2002; 169: 3242–3249.
- [57] Moerman-Herzog A, Nakagawa M. Early defensive mechanisms against

- human papillomavirus infection. *Clin Vaccine Immunol* 2015; 22: 850–857.
- [58] Mantovani A, Sica A, Allavena P, et al. Tumor-associated macrophages and the related myeloid-derived suppressor cells as a paradigm of the diversity of macrophage activation. *Hum Immunol* 2009; 70: 325–330.
- [59] Lepique AP, Daghestanli KRP, Cuccovia I, et al. HPV16 tumor associated macrophages suppress antitumor T cell responses. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 4391–4400.
- [60] Schetter AJ, Heegaard NHH, Harris CC. Inflammation and cancer: Interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways. *Carcinogenesis* 2009; 31: 37–49.
- [61] Greten FR, Grivennikov SI. Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. *Immunity* 2019; 51: 27–41.
- [62] Dinarello CA. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol Rev* 2018; 281: 8–27.
- [63] Dinarello C, Arend W, Sims J, et al. IL-1 family nomenclature. *Nature Immunology* 2010; 11: 973.
- [64] Weber A, Wasiliew P, Kracht M. Interleukin-1 (IL-1) pathway. *Science Signaling* 2010; 3: 1–7.
- [65] O’Neill LAJ, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 353–364.
- [66] Gabay C, Lamacchia C, Palmer G. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. *Nat Rev Rheumatol* 2010; 6: 232–241.
- [67] Dinarello CA. Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. *Annu Rev Immunol* 2009; 27: 519–550.
- [68] Niebler M, Qian X, Höfler D, et al. Post-Translational Control of IL-1 $\beta$  via the Human Papillomavirus Type 16 E6 Oncoprotein: A Novel Mechanism of Innate Immune Escape Mediated by the E3-Ubiquitin Ligase E6-AP and p53. *PLoS Pathog*; 9. Epub ahead of print 2013. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003536.
- [69] Iglesias M, Yen K, Gaiotti D, et al. Human papillomavirus type 16 E7 protein sensitizes cervical keratinocytes to apoptosis and release of interleukin-1 $\alpha$ . *Oncogene* 1998; 17: 1195–1205.
- [70] Hallegua DS, Weisman MH. Potential therapeutic uses of interleukin 1 receptor antagonists in human diseases. *Ann Rheum Dis* 2002; 61: 960–967.
- [71] Mantovani A, Barajon I, Garlanda C. IL-1 and IL-1 regulatory pathways in cancer progression and therapy. *Immunological Reviews* 2018; 281: 57–61.
- [72] Hong DS, Hui D, Bruera E, et al. MABp1, a first-in-class true human antibody targeting interleukin-1 $\alpha$  in refractory cancers: An open-label, phase 1 dose-escalation and expansion study. *Lancet Oncol*. Epub ahead of print 2014. DOI: 10.1016/S1470-2045(14)70155-X.

- [73] Ridker PM, MacFadyen JG, Thuren T, et al. Effect of interleukin-1 $\beta$  inhibition with canakinumab on incident lung cancer in patients with atherosclerosis: exploratory results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. Epub ahead of print 2017. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)32247-X.
- [74] Dinarello CA, Novick D, Kim S, et al. Interleukin-18 and IL-18 binding protein. *Front Immunol* 2013; 4: 1–10.
- [75] Esmailbeig M, Ghaderi A. Interleukin-18: a regulator of cancer and autoimmune diseases. *Eur Cytokine Netw* 2017; 28: 127–140.
- [76] Akamatsu S, Arai N, Hanaya T, et al. Antitumor activity of interleukin-18 against the murine T-cell leukemia/lymphoma EL-4 in syngeneic mice. *J Immunother* 2002; 25: 28–34.
- [77] Wigginton JM, Lee J-K, Wiltrot TA, et al. Synergistic Engagement of an Ineffective Endogenous Anti-Tumor Immune Response and Induction of IFN- $\gamma$  and Fas-Ligand-Dependent Tumor Eradication by Combined Administration of IL-18 and IL-2. *J Immunol* 2002; 169: 4467–4474.
- [78] Palma G, Barbieri A, Bimonte S, et al. Interleukin 18: Friend or foe in cancer. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* 2013; 1836: 296–303.
- [79] Boccardo E, Lepique AP, Villa LL. The role of inflammation in HPV carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2010; 31: 1905–1912.
- [80] Merrick DT, Winberg G, McDougall JK. Re-expression of interleukin 1 in human papillomavirus 18 immortalized keratinocytes inhibits their tumorigenicity in nude mice. *Cell Growth Differ* 1996; 7: 1661–1669.
- [81] Ainouze M, Rochefort P, Parroche P, et al. Human papillomavirus type 16 antagonizes IRF6 regulation of IL-1 $\beta$ . *PLoS Pathog* 2018; 14: 1–27.
- [82] Lee S-J, Cho Y-S, Cho M-C, et al. Both E6 and E7 Oncoproteins of Human Papillomavirus 16 Inhibit IL-18-Induced IFN- $\gamma$  Production in Human Peripheral Blood Mononuclear and NK Cells. *J Immunol* 2001; 167: 497–504.
- [83] Richards KH, Doble R, Wasson CW, et al. Human Papillomavirus E7 Oncoprotein Increases Production of the Anti-Inflammatory Interleukin-18 Binding Protein in Keratinocytes. *J Virol* 2014; 88: 4173–4179.
- [84] Matamoros JA, da Silva MIF, de Moura PMMF, et al. Reduced expression of IL-1 $\beta$  and IL-18 proinflammatory interleukins increases the risk of developing cervical cancer. *Asian Pacific J Cancer Prev* 2019; 20: 2715–2721.
- [85] Pontillo A, Bricher P, Leal V, et al. Role of Inflammasome Genetics in Susceptibility to HPV Infection and Cervical Cancer Development. *J Med Virol* 2016; 88: 1646–1651.
- [86] Litmanovich A, Khazim K, Cohen I. The Role of Interleukin-1 in the Pathogenesis of Cancer and its Potential as a Therapeutic Target in Clinical Practice. *Oncol Ther* 2018; 6: 109–127.
- [87] Fabbi M, Carbotti G, Ferrini S. Context-dependent role of IL-18 in cancer



- biology and counter-regulation by IL-18BP. *J Leukoc Biol* 2015; 97: 665–675.
- [88] Hoff P. *Manual de condutas em oncologia do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo*. 2013th ed. Ed Atheneu, 2013.
- [89] HALBERT CL, DEMERS GW, Galloway DA. The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. *J Virol* 1991; 65: 473–478.
- [90] Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 420: 860–867.
- [91] Majzner RG, Mackall CL. Clinical lessons learned from the first leg of the CAR T cell journey. *Nat Med* 2019; 25: 1341–1355.
- [92] Baker KJ, Houston A, Brint E. IL-1 family members in cancer; two sides to every story. *Front Immunol*; 10. Epub ahead of print 2019. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01197.
- [93] Termini L, Boccardo E, Esteves GH, et al. Characterization of global transcription profile of normal and HPV-immortalized keratinocytes and their response to TNF treatment. 2008; 17: 1–17.
- [94] Terme M, Ullrich E, Aymeric L, et al. Cancer-induced immunosuppression: IL-18-elicited immunoablative NK cells. *Cancer Res* 2012; 72: 2757–2767.
- [95] Pirhonen J. Regulation of IL-18 expression in virus infection. *Scand J Immunol* 2001; 53: 533–539.
- [96] Interleukin-18. *Methods* 1999; 19: 121–132.
- [97] van de Veerdonk FL, Netea MG, Dinarello CA, et al. Inflammasome activation and IL-1 $\beta$  and IL-18 processing during infection. *Trends Immunol* 2011; 32: 110–116.
- [98] Bossaller L, Chiang P-I, Schmidt-Lauber C, et al. Cutting Edge: FAS (CD95) Mediates Noncanonical IL-1 $\beta$  and IL-18 Maturation via Caspase-8 in an RIP3-Independent Manner. *J Immunol* 2012; 189: 5508–5512.
- [99] Reinholz M, Kawakami Y, Salzer S, et al. HPV16 activates the AIM2 inflammasome in keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 2013; 305: 723–732.
- [100] Kanneganti TD. Central roles of NLRs and inflammasomes in viral infection. *Nat Rev Immunol* 2010; 10: 688–698.
- [101] Tangkijvanich P, Thong-ngam D, Mhachai V, et al. Role of serum interleukin-18 as a prognostic factor in patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 4345–4349.
- [102] Kawabata T, Ichikura T, Majima T, et al. Preoperative serum interleukin-18 level as a postoperative prognostic marker in patients with gastric carcinoma. *Cancer* 2001; 92: 2050–2055.
- [103] Carbone A, Vizio B, Novarino A, et al. IL-18 paradox in pancreatic carcinoma: Elevated serum levels of free il-18 are correlated with poor survival. *J Immunother* 2009; 32: 920–931.

- [104] Kang JS, Bae SY, Kim HR, et al. Interleukin-18 increases metastasis and immune escape of stomach cancer via the downregulation of CD70 and maintenance of CD44. *Carcinogenesis* 2009; 30: 1987–1996.
- [105] Kim K-E, Song H, Hahm C, et al. Expression of ADAM33 Is a Novel Regulatory Mechanism in IL-18-Secreted Process in Gastric Cancer. *J Immunol* 2009; 182: 3548–3555.
- [106] Kim KE, Song H, Kim TS, et al. Interleukin-18 is a critical factor for vascular endothelial growth factor-enhanced migration in human gastric cancer cell lines. *Oncogene* 2007; 26: 1468–1476.
- [107] Carrascal MT, Mendoza L, Valcárcel M, et al. Interleukin-18 binding protein reduces B16 melanoma hepatic metastasis by neutralizing adhesiveness and growth factors of sinusoidal endothelium. *Cancer Res* 2003; 63: 491–497.
- [108] Valcárcel M, Carrascal T, Crende O, et al. IL-18 regulates melanoma VLA-4 integrin activation through a hierarchized sequence of inflammatory factors. *J Invest Dermatol* 2014; 134: 470–480.
- [109] Kang JS, Bae SY, Kim HR, et al. Interleukin-18 increases metastasis and immune escape of stomach cancer via the downregulation of CD70 and maintenance of CD44. *Carcinogenesis* 2009; 30: 1987–1996.
- [110] Nilkaeo A, Bhuvanath S. Role of interleukin-18 in modulation of oral carcinoma cell proliferation. *Mediators Inflamm* 2006; 2006: 1–6.
- [111] Chandrasekar B, Valente AJ, Freeman GL, et al. Interleukin-18 induces human cardiac endothelial cell death via a novel signaling pathway involving NF- $\kappa$ B-dependent PTEN activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 339: 956–963.
- [112] Cao R, Farnebo J, Kurimoto M, et al. Interleukin-18 acts as an angiogenesis and tumor suppressor. *FASEB J* 1999; 13: 2195–2202.
- [113] Zhang B, Wu KF, Cao ZY, et al. IL-18 increases invasiveness of HL-60 myeloid leukemia cells: Up-regulation of matrix metalloproteinases-9 (MMP-9) expression. *Leuk Res* 2004; 28: 91–95.
- [114] Jiang D, Ying W, Lu Y, et al. Identification of metastasis-associated proteins by proteomic analysis and functional exploration of interleukin-18 in metastasis. *Proteomics* 2003; 3: 724–737.
- [115] Liu X, Hu J, Sun S, et al. Mesenchymal stem cells expressing interleukin-18 suppress breast cancer cells in vitro. *Exp Ther Med* 2015; 9: 1192–1200.
- [116] Coughlin CM, Trinchieri G, Lee WM. induce murine tumor regression which involves inhibition of angiogenesis . Find the latest version : 1998; 101: 1441–1452.
- [117] Article O. Clinical Utility of Interleukin- 18 in Breast Cancer Patients: A Pilot Study. 2017; 3: 13–19.
- [118] Kamura HAO. Interferon- g -Inducing Factor , a Novel Cytokine , Enhances Fas

- Ligand- Mediated Cytotoxicity of Murine T Helper 1 Cells. 1996; 235: 230–235.
- [119] Tomura M, Zhou X, Maruo S, et al. A Critical Role for IL-18 in the Proliferation and Activation of NK1.1 + CD3 – Cells.
- [120] Osaki T, Péron J, Cai Q, et al. IFN-  $\gamma$  -Inducing Factor/IL-18 Administration Mediates IFN-  $\gamma$  - and IL-12-Independent Antitumor Effects.
- [121] Imai K, Matsuyama S, Miyake S, et al. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence : an 11-year follow-up study of a general population. 2000; 356: 1795–1799.
- [122] Coca S, Perez-piqueras J, Martinez D, et al. The Prognostic Significance of Intratumoral Natural Killer Cells in Patients with Colorectal Carcinoma. 1997; 2320–2328.
- [123] Villegas FR, Coca S, Villarrubia VG, et al. Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer. 2002; 35: 23–28.
- [124] Romee R, Rosario M, Berrien-elliott MM, et al. Cytokine-induced memory-like natural killer cells exhibit enhanced responses against myeloid leukemia. 8.
- [125] Uppendahl LD, Felices M, Bendzick L, et al. Gynecologic Oncology Cytokine-induced memory-like natural killer cells have enhanced function , proliferation , and in vivo expansion against ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol* 2019; 153: 149–157.
- [126] Ni J, Miller M, Stojanovic A, et al. Sustained effector function NK cells against established tumors. 2012; 209: 2351–2365.
- [127] Choi I, Lee J, Zhang S, et al. Oncolytic adenovirus co-expressing IL-12 and IL-18 improves tumor-specific immunity via differentiation of T cells expressing IL-12R b 2 or IL-18R a. *Gene Ther* 2011; 18: 898–909.
- [128] Spranger S. Mechanisms of tumor escape in the context of the T-cell-inflamed and the non-T-cell-inflamed tumor microenvironment. 2016; 28: 383–391.
- [129] Lee HJ, Park IA, Song IH, et al. Tertiary lymphoid structures : prognostic significance and relationship with tumour-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancer. 2016; 422–430.
- [130] Lawand M, Giraldo NA, Germain C, et al. Tertiary Lymphoid Structures in Cancers : Prognostic value , Regulation , and Manipulation for Therapeutic intervention. 2016; 7: 1–11.
- [131] Chang S-Y, Su P-F, Lee T-C. Ectopic expression of interleukin-1 receptor type II enhances cell migration through activation of the pre-interleukin 1a pathway. *Cytokine*; 45: 32–38.

## 8. Anexos

---

**Anexo A – Aprovação Comitê de Ética em Pesquisa da FMUSP****APROVAÇÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 08/03/2017, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 0026/17 intitulado: “**AValiação Funcional da Via da Interleucina 1 em Queratinócitos que Expressam os Oncogenes de HPV**” apresentado pelo Departamento de **RADIOLOGIA E ONCOLOGIA**

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 466/12, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: Lara Termini

Pesquisador (a) Executante: Rafaella Almeida Lima Nunes

CEP-FMUSP, 08 de Março de 2017.



**Prof. Dra. Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira**  
**Coordenador**  
**Comitê de Ética em Pesquisa**

## Anexo B – Aprovação Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** Identificação de biomarcadores associados à severidade das lesões das neoplasias do colo uterino.

**Pesquisador:** Luiz Carlos Zeferino

**Área Temática:**

**Versão:** 5

**CAAE:** 55014816.5.0000.5404

**Instituição Proponente:** Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti - CAISM

**Patrocinador Principal:** Universidade Federal de Goiás - UFG  
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.275.945

#### **Apresentação do Projeto:**

Solicitação de emenda ao projeto original.

#### **JUSTIFICATIVA:**

A cooperação entre os diversos componentes do microambiente tumoral, incluindo células tumorais, sistema imune, estresse oxidativo e mecanismos de reparo, é determinante para o prognóstico dos pacientes. Cada vez mais a análise das características particulares de cada tumor, em cada indivíduo, oferece possibilidades mais robustas de diagnóstico e tratamento. Para alguns tipos de câncer, como cólon e melanoma, a caracterização do infiltrado inflamatório no microambiente tumoral (Immunoscore) tem sido considerada tão importante quanto a classificação anatomopatológica dos tumores malignos TNM (International Union Against Cancer-UICC). A análise descritiva dos marcadores sugeridos em conjunto com os dados das amostras coletadas através do projeto inicial contribuirá para a melhor compreensão do microambiente inerente aos tumores de colo do útero, sua relação com a evolução dos pacientes, e de que forma a conduta terapêutica pode ser aprimorada. Considerando-se o potencial das amostras clínicas já coletadas durante o referido projeto, e a possibilidade de sua utilização visando melhor compreender o microambiente tumoral como fonte de novos biomarcadores e alvos terapêuticos, especialmente no que tange à resposta imune e estresse oxidativo, propõe-se incluir as análises dos seguintes



UNICAMP - CAMPUS  
CAMPINAS



Continuação do Parecer: 3.275.945

marcadores: IL1A, IL1B, IL18, IL1R1, IL1R2, IL1RAcP, IL1RA, IL18BP, IL18R, CD4, CD8, FOXP3, NCAM1, PD1, PDL1, HK7, PIRIN, RECK, TLR4, SARM, Vimentina, E-caderina e SET. Todas as proteínas sugeridas foram encontradas diferencialmente expressas, em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisas, quando comparados células e tecidos normais e HPV positivos. Quanto à metodologia empregada, a análise da expressão dos marcadores sugeridos será a mesma utilizada para as demais proteínas objetos deste estudo (imunohistoquímica).

Justifica na introdução:

A cooperação entre os diversos componentes do microambiente tumoral, incluindo células tumorais, sistema imune, estresse oxidativo e mecanismos de reparo é determinante para o prognóstico dos pacientes. A avaliação das características particulares de cada tumor, em cada indivíduo, oferece possibilidades mais robustas de diagnóstico e tratamento. Para 12 alguns tipos de tumores, como cólon e melanoma, a caracterização do infiltrado inflamatório presente no microambiente tumoral (immunoscore) tem sido considerada tão importante quanto a classificação anatomopatológica dos tumores malignos TNM (International Union Against Cancer -UICC) (SIDAWAY, 2018; GALON et al., 2017; PAGES et al., 2018; OGINO and GIANNAKIS, 2018; PARTLOVA et al., 2015; WARD et al, 2014; OGUEJIOFOR et al, 2017). Em conjunto, estes dados mostram que a lista de genes/proteínas propostas para análise foi gerada a partir de estudos moleculares robustos. A cooperação entre os diversos componentes do microambiente tumoral, incluindo células tumorais, sistema imune, estresse oxidativo e mecanismos de reparo é determinante para o prognóstico dos pacientes. A avaliação das características particulares de cada tumor, em cada indivíduo, oferece possibilidades mais robustas de diagnóstico e tratamento. Para 12 alguns tipos de tumores, como cólon e melanoma, a caracterização do infiltrado inflamatório presente no microambiente tumoral (immunoscore) tem sido considerada tão importante quanto a classificação anatomopatológica dos tumores malignos TNM (International Union Against Cancer -UICC) (SIDAWAY, 2018; GALON et al., 2017; PAGES et al., 2018; OGINO and GIANNAKIS, 2018; PARTLOVA et al., 2015; WARD et al, 2014; OGUEJIOFOR et al, 2017). Em conjunto, estes dados mostram que a lista de genes/proteínas propostas para análise foi gerada a partir de estudos moleculares robustos.

Acrescenta nova hipótese:

**HIPÓTESES** • A interação entre os diferentes componentes do microambiente imune tumoral, avaliada através da expressão dos respectivos marcadores, contribuirá com o prognóstico e



UNICAMP - CAMPUS  
CAMPINAS



Continuação do Parecer: 3.275.945

tratamento .

- Acrescenta referências bibliográficas.
- Apresenta cronograma para a emenda.

**Objetivo da Pesquisa:**

Não altera o objetivo de procurar por biomarcadores; insere novos biomarcadores como objetivos secundários:

"Também será avaliada a expressão de marcadores associados ao microambiente imune tumoral: IL1A, IL1B, IL18, IL1R1, IL1R2, IL1RAcP, IL1RA, IL18BP, IL18R, CD4, CD8, FOXP3, NCAM1, PD1, PDL1, HK7, PIRIN, RECK, TLR4, SARM, ~E, E-caderina e SET."

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Inalterados.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Cronograma da Emenda: início em maio de 2019 e término em 22/12/2020.

Solicita continuação do estudo para análise de outros marcadores considerando a A interação entre os diferentes componentes do microambiente imune tumoral, avaliada através da expressão dos respectivos marcadores.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

- PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_1315003\_E2.pdf 09/04/2019: com justificativa da emenda e cronograma.
- Projeto\_de\_biomarcadores\_Zeferino\_2017.pdf 09/04/2019: com destaque nas alterações de inclusão do biomarcador FUS e da data de início de busca de casos a ser iniciado em 2003.
- com destaque nas alterações que incluem as "Também será avaliada a expressão de marcadores associados ao microambiente imune tumoral: IL1A, IL1B, IL18, IL1R1, IL1R2, IL1RAcP, IL1RA, IL18BP, IL18R, CD4, CD8, FOXP3, NCAM1, PD1, PDL1, HK7, PIRIN, RECK, TLR4, SARM, Vimentina, E-caderina e SET." e

**Recomendações:**

Enviar relatório Parcial de acompanhamento de pesquisa.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Enviar relatório Parcial de acompanhamento de pesquisa como notificação ao CEP como solicitado no parecer de aprovação da emenda anterior (Relatórios parciais e final devem ser apresentados





UNICAMP - CAMPUS  
CAMPINAS



Continuação do Parecer: 3.275.945

ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.).

**CONCLUSÃO:** emenda aprovada .

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Atender a recomendação de envio de relatório parcial.

- O sujeito de pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.
- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.

- Relatórios parciais e final, em formulário próprio do CEP, devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1315003_E2.pdf	09/04/2019 23:55:59		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_biomarcadores_Zeferino_2017.pdf	09/04/2019 23:48:15	Luiz Carlos Zeferino	Aceito
Outros	Emenda_justificativa_declaracao2019.pdf	09/04/2019 23:32:22	Luiz Carlos Zeferino	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_biomarcadores_Zeferino_2019_Emenda.pdf	09/04/2019 23:20:55	Luiz Carlos Zeferino	Aceito
Outros	Carta_resposta_CEP_2017.pdf	01/12/2017 16:40:00	Luiz Carlos Zeferino	Aceito
Outros	parecer.pdf	28/06/2016 10:48:39	Luiz Carlos Zeferino	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Dispensa_do_TCLE.pdf	08/04/2016 10:04:54	Luiz Carlos Zeferino	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	08/04/2016 10:00:56	Luiz Carlos Zeferino	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 22 de Abril de 2019

Assinado por:

**Maria Fernanda Ribeiro Bittar**  
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

**ANEXO C – CARTA DE ACEITE DOUTORADO SANDUÍCHE IARC****International Agency for Research on Cancer****World Health  
Organization**

150 cours Albert Thomas  
69372 Lyon cedex 08, France

Infections and Cancer Biology Group  
Tel.: +33 4 72 73 81 91  
E-mail: [tommasino@iarc.fr](mailto:tommasino@iarc.fr)

<http://www.iarc.fr>

To the University of Sao Paulo Postgraduate  
Program

**Re.: Consent letter for Rafaella  
Almeida Lima Nunes**

09 May 2018

I declare my consent to receive **RAFAELLA ALMEIDA LIMA NUNES** to an internship at my laboratory in the International Agency for Research on Cancer – IARC, Lyon, France. Ms. Rafaella Almeida Lima Nunes is a Ph.D. student under the supervision of Dr. Lara Termini at the Postgraduate Program in Oncology at the University of Sao Paulo Medical School, Sao Paulo, Brazil. The internship will be held between June and September of 2018. I commit myself to offer all the scientific and laboratorial support to carry out the scheduled research activities during this period.

Yours Faithfully,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Massimo Tommasino'.

Massimo Tommasino  
Section and Group Head  
Infections and Cancer Biology Group  
International Agency for Research on Cancer

**ANEXO D – ARTIGOS PUBLICADOS (COAUTORIA)**

- 1 Prati B, da Silva Abjaude W, Termini L, Morale M, Herbster S, Longatto-Filho A, et al. Three Prime Repair Exonuclease 1 (TREX1) expression correlates with cervical cancer cells growth in vitro and disease progression in vivo. *Sci Rep.* 2019;9(1):1–14.
- 2 Rabelo-Santos SH, Termini L, Boccardo E, Derchain S, Longatto-Filho A, Andreoli MA, et al. Strong SOD2 expression and HPV-16/18 positivity are independent events in cervical cancer. *Oncotarget.* 2018;9(31):21630–40.
- 3 Silva GAF, Nunes RAL, Morale MG, Boccardo E, Aguayo F, Termini L. Oxidative stress: therapeutic approaches for cervical cancer treatment. *Clinics (Sao Paulo).* 2018;73:1–10.
- 4 Betiol JC, Sichero L, Costa HODO, De Matos LL, Andreoli MA, Ferreira S, et al. Prevalence of human papillomavirus types and variants and p16INK4a expression in head and neck squamous cells carcinomas in São Paulo, Brazil. *Infect Agent Cancer [Internet].* 2016;11(1):1–7.