

Simone Cardozo Stone

**IMUNOMODULAÇÃO POR TUMORES ASSOCIADOS AO
PAPILOMAVÍRUS HUMANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2013

Simone Cardozo Stone

**IMUNOMODULAÇÃO POR TUMORES ASSOCIADOS AO
PAPILOMAVÍRUS HUMANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Profa. Dra. Ana Paula Lepique

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Stone, Simone Cardozo.

Imunomodulação por tumores associados ao papilomavírus humano
/ Simone Cardozo Stone. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Ana Paula Lepique.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de
Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de
concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Imunomodulação
tumoral.

Versão do título para o inglês: Immunomodulation by human
papillomavirus associated tumors.

1. Câncer cervical 2. Papilomavírus humano 3. Células mielóides
4. Proliferação 5. Citocinas 6. Eletroforese 2D I. Lepique, Profa.
Dra. Ana Paula II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências
Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB012/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Simone Cardozo Stone.

Título da Dissertação: Imunomodulação por tumores associados ao papilomavírus humano.

Orientador(a): Profa. Dra. Ana Paula Lepique.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

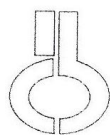
Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - e-mail: ccb@icb.usp.br

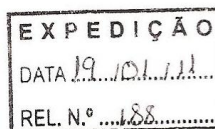
CERTIFICADO

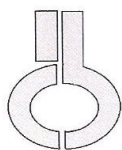
Certificamos que o protocolo registrado sob nº **151** nas fls. **95** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Ana Paula Lepique, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Regulação das vias de sinalização de células do sistema imune por células tumorais** do qual participam o(s) alunos **André Bento Soares**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **15.12.2010, com validade de 3 anos.**

São Paulo, 20 de dezembro de 2010.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA - ICB/USP





UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 471/11 referente ao projeto intitulado: “*Modulação do fenótipo de células mielóides por queratinócitos imortalizados ou linhagens celulares derivadas de tumores associados ao Papilomavírus humano*” sob a responsabilidade de **Simone Cardozo Stone**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP n°196 de 1996.

São Paulo, 17 de agosto de 2011.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora profa. Ana Paula Lepique, pela compreensão, dedicação, ensinamentos e amizade. Além de ter me dado a oportunidade de ser sua primeira aluna de pós-graduação da USP a defender.

À minha família, pelo apoio incondicional, amor e incentivo. E por conseguir fazer com que a distância entre nós se torne pequena e insignificante graças a sua constante presença em todos os momentos.

Às minhas companheiras de laboratório, Aleida, Carol, Karla, Renata e Sandra pelas discussões científicas, auxílios em experimentos e pela amizade dentro e fora do laboratório.

Aos meus amigos pelos necessários momentos de distração e apoio, especialmente a Joice por ser praticamente a minha família em São Paulo.

Ao pessoal que me auxiliou nos experimentos de eletroforese 2D, especialmente o Matheus, sem toda essa ajuda eu não conseguiria concluir este projeto.

Ao apoio financeiro da CAPES e da Fapesp, sem o qual este trabalho não seria possível.

A todas as pessoas que, apesar de não mencionadas, contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho e a todas que sempre acreditaram e torceram por mim.

Muito obrigada!

“Se eu vi mais longe, foi por estar de pé sobre ombros de gigantes.”

Isaac Newton
(1643-1727)

RESUMO

STONE, S. C. **Imunomodulação por tumores associados ao papilomavírus humano.** 2013. 95 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

O câncer do colo uterino é o segundo mais frequente em mulheres em países em desenvolvimento, sendo causado por infecção persistente por Papilomavírus Humano (HPV) de alto risco oncogênico. A maioria das mulheres responde aos antígenos virais, eliminando o vírus, mas uma pequena parte delas mantém a infecção persistente, o que pode levar ao desenvolvimento de tumores. Estes tumores tem história natural longa, onde a expressão de oncoproteínas virais é necessária para o fenótipo transformado das células, portanto é necessário que o vírus apresente mecanismos de evasão do sistema imune. O microambiente tumoral é complexo, e em tumores do colo uterino sabe-se que há infiltrado de diversos tipos de células inflamatórias, sendo que a frequência de macrófagos aumenta com a progressão da lesão, e eles parecem ter fenótipo supressor. Dados do nosso laboratório indicam que há também aumento de células mielóides com fenótipo supressor no baço de camundongos com tumor associado ao HPV. Pouco é sabido sobre a comunicação entre o infiltrado inflamatório e as células infectadas, e como as células tumorais modulam as respostas imunes do hospedeiro. Esse trabalho tem como objetivo observar os efeitos sistêmicos de tumores associados ao HPV sobre a proliferação e recrutamento de células do sistema imune, principalmente células mielóides, e buscar identificar fatores que tenham papel nesses mecanismos. Utilizando modelos de tumor *in vivo*, observou-se que tumores associados ao HPV recrutam maior número de células inflamatórias para o tumor e induzem maior proliferação de células mielóides na medula óssea e no baço e de linfócitos B em linfonodos dos animais portadores destes tumores. Como o aumento destas populações e a modulação do fenótipo das mesmas pode ser parte dos mecanismos de evasão disparados pelas células infectadas por HPV, estudamos o perfil de expressão de citocinas nas linhagens tumorais, e comparamos o perfil geral de expressão de proteínas através de ensaios de eletroforese 2D. Com isto, demonstramos que linhagens tumorais que expressam oncogenes de HPV apresentam maior expressão de IL-6, IL-8, CXCL1, sICAM e Serpina E1, moléculas que podem ter função no recrutamento, diferenciação e proliferação de células mielóides do hospedeiro.

Palavras-chave: Câncer cervical. Papilomavírus humano. Células mielóides. Proliferação. Citocinas. Quimiocinas. Eletroforese 2D.

ABSTRACT

STONE, S. C. **Immunomodulation by human papillomavirus associated tumors.** 2013. 95 p. Masters thesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Cervical cancer is the second most common type of cancer in women in developing countries. Its main etiologic factor is persistent infection with high risk human papillomavirus (HPV). Most women spontaneously eliminate the virus and precursor lesions. However, a percentage of the infected women develop persistent infection, which can lead to tumor development. These tumors have long natural history, where the expression of viral oncoproteins is necessary for the maintenance of the transformed phenotype. Therefore, we observe that these viruses display a series of immune evasion mechanisms. The tumor microenvironment is complex, containing different types of cells, including inflammatory infiltrating cells. Data from the literature shows that there is an increase in the frequency of macrophages within cervical intraepithelial lesions as they progress towards cancer and that these are suppressor or regulatory macrophages. Data from our laboratory also shows an increase of myeloid cells with suppressor phenotype in the spleen of HPV16+ tumor bearing. Communication between tumor and inflammatory cells is poorly understood, therefore this work aims to observe the systemic effects of HPV associated tumors on the proliferation and recruitment of immune cells, particularly myeloid cells, and seek to identify factors that have a role in these mechanisms. Using *in vivo* tumor models, we found that HPV positive tumors recruit a higher percentage of cells than HPV negative tumor, and induce proliferation of myeloid and B cell populations in lymphoid organs. Increase in numbers of myeloid cells and B cells may be an evasion mechanism triggered by these tumors. In order to identify molecules that may promote the phenomena described above, we studied cytokines expression profiles of tumor cell lines *in vitro* and *ex vivo*, and we also performed proteomic assays with tumor cells transduced with HPV oncogenes. Our data shows that HPV associated tumor cells lines display higher expression of IL-6, IL-8, CXCL1, sICAM and Serpin E1, molecules that may have a role in the recruitment function, differentiation and proliferation of myeloid cells of the host.

Keywords: Cervical cancer. Human papillomavirus. Myeloid cells. Proliferation. Cytokines. Chemokines. 2D electrophoresis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Ilustração do genoma do HPV 16.....	17
Figura 2 -	Eletroforese unidimensional das linhagens C33, C33pLX e C33E6/E7.....	33
Figura 3 -	Caracterização do infiltrado inflamatório em tumores SiHa, HeLa e C33 em camundongos imunodeficientes Nude e RAG1-/-.....	38
Figura 4 -	Celularidade dos baços de animais RAG1-/- naive e com tumores SiHa, HeLa e C33.....	40
Figura 5 -	Cortes histológicos de baços de animais RAG1-/- naive e com tumores SiHa, HeLa e C33.....	41
Figura 6 -	Frequência de células mielóides em animais imunodeficientes (RAG1-/- e Nude) com tumores de HeLa, SiHa e C33.....	43
Figura 7 -	Frequência de células em proliferação em baços de camundongos Nude (A) e RAG1-/- (B) com tumores SiHa, HeLa e C33.....	45
Figura 8 -	Frequência de proliferação de células mielóides em medula óssea de camundongos Nude (A) e RAG1-/- (B) com tumores gerados por injeção com cada uma das linhagens celulares indicadas.....	46
Figura 9 -	Frequência de proliferação de linfócitos B em linfonodos de camundongos Nude com tumores SiHa, HeLa e C33.....	47
Figura 10 -	Perfil de expressão de citocinas e moléculas inflamatórias das células SiHa, HeLa e C33.....	49
Figura 11 -	Perfil de expressão de fatores de crescimento nas linhagens SiHa, HeLa e C33.....	50
Figura 12 -	Perfil de expressão de fatores de crescimento nas linhagens SiHa, HeLa e C33.....	51
Figura 13 -	Perfil de expressão de fatores pró-inflamatórios nas linhagens SiHa, HeLa e C33.....	53
Figura 14 -	Perfil de expressão de citocinas nas linhagens SiHa, HeLa e C33.....	54

Figura 15 -	Eletroforese bidimensional das linhagens C33, C33pLX e C33E6/E7..	56
Figura 16 -	Representação esquemática das bandas diferencialmente expressos nas linhagens C33, C33 pLX e C33 E6/E7.....	57
Figura 17 -	Análise fatorial das bandas dos géis das linhagens C33, C33 pLX e C33 E6/E7.....	57
Figura 18 -	Possíveis mecanismos de interferência disparados por tumores para levar ao acúmulo de células mielóides no hospedeiro.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D	Bidimensional
Bak	<i>Bcl-2 homologous antagonist/killer</i>
BrdU	Bromodeoxiuridina
BSA	Albumina de Soro Bovino
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CHAPS	<i>3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
E	<i>Early</i>
ECL	<i>Electrochemiluminescence Chemiluminescence</i>
G-CSF	Fator de Crescimento de Colônias de Granulócitos
GM-CSF	Fator de Crescimento de Colônias de Granulócitos e Macrófagos
HCl	Ácido Clorídrico
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
HPV	Papilomavírus Humano
hTERT	<i>human Telomerase Reverse Transcriptase</i>
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IL-1ra	Antagonista do Receptor de IL-1
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
IRF	Fator Regulador de Interferon
L	<i>Late</i>
LCR	<i>Long Control Region</i>
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
NK	<i>Natural Killer</i>
PBS	Tampão Fosfato-salino
pRB	Proteína do Retinoblastoma

RNA_t	Ácido Ribonucleíco transportador
Rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SFB	Soro Fetal Bovino
sICAM-1	Molécula de Adesão Intercelular-1 solúvel
sTREM	<i>Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1</i>
TAP	Transportador associado ao processamento de antígenos
TCA	Ácido Tricloroacético
Th1	Linfócitos T <i>helper</i> 1
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Câncer cervical	16
1.2 Papilomavírus Humano	16
1.3 Papilomavírus humano e sistema imune	20
1.4 Microambiente tumoral	23
1.5 Efeitos do câncer no hematopoiese	25
2 OBJETIVOS	27
2.1 Geral	27
2.2 Específicos	27
3 MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1 Linhagens celulares	28
3.2 Animais	28
3.3 Cultivo celular	28
3.4 Modelo de tumor ectópico	29
3.5 Incorporação de bromodeoxiuridina	29
3.6 Histoquímica	29
3.7 Suspensões celulares	30
3.8 Avaliação da proliferação de células de órgãos linfoides	30
3.9 Perfil de citocinas	31
3.10 Eletroforese 2D	32
<i>3.10.1 Extração de proteínas</i>	32
<i>3.10.2 Quantificação das proteínas</i>	32
<i>3.10.3 Eletroforese 2D</i>	33
<i>3.10.4 Detecção de proteínas</i>	34
<i>3.10.5 Obtenção e análise das imagens</i>	35
3.11 Análise estatística	35
4 RESULTADOS	36

4.1 Infiltrado inflamatório	36
4.2 Avaliação do efeito dos tumores sobre populações de células do sistema imune	39
4.3 Fatores inflamatórios, de crescimento e imunomoduladores em células tumorais e tumor ...	48
4.4 Eletroforese 2D	55
5 DISCUSSÃO	58
5.1 Infiltrado inflamatório e proliferação celular	58
5.2 Fatores produzidos em células tumorais e tumor	60
5.3 Eletroforese 2D	64
6 CONCLUSÕES	65
REFERÊNCIAS	66
APÊNDICE - Manuscrito	74

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer cervical

O câncer cervical é uma importante enfermidade que acomete milhares de mulheres anualmente. Segundo as últimas estimativas mundiais, este tipo de câncer é o terceiro mais comum entre as mulheres no mundo todo, sendo o segundo mais comum nos países em desenvolvimento. A taxa de mortalidade deste câncer é de 52%, tendo sido responsável pelo óbito de cerca de 275.000 mulheres no ano de 2008 (GLOBOCAN, 2008). No Brasil estima-se que houve 17.540 novos casos em 2012 (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2012).

O principal fator etiológico associado ao câncer cervical é a infecção por Papilomavírus Humano (HPV) de alto risco oncogênico. Deste modo, o HPV é associado virtualmente a todas as ocorrências de câncer cervical, sendo detectado em 99,7% dos casos (WALBOOMERS et al., 1999). Dentre os tipos de HPV associados ao câncer cervical, os mais frequentes são o HPV16 (responsável por 55% dos casos) e o 18 (responsável por 15% dos casos) (SMITH et al., 2007).

Apesar da forte associação da infecção por HPV com o câncer cervical, nem todas as mulheres infectadas pelo vírus desenvolvem câncer, de fato a maioria das infecções regride espontaneamente. Além da infecção persistente por HPV, outros fatores intrínsecos e extrínsecos estão associados à progressão cancerígena, tais como imunossupressão, tabagismo e uso prolongado de anticoncepcionais orais (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2011).

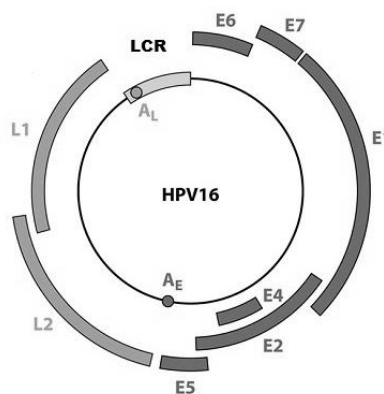
1.2 Papilomavírus Humano

Os papilomavírus são pequenos vírus de DNA circular dupla-fita com 8.000 pares de base envolvidos em um capsídio icosaédrico. São espécie-específicos, infectando diversos mamíferos, aves e répteis. Em humanos, são subdivididos em 120 tipos distribuídos em cinco gêneros: *Alphapapillomavirus*, *Betapapillomavirus*, *Gammapapillomavirus*, *Mupapillomavirus* e *Nupapillomavirus* (BERNARD et al., 2010). Os cerca de 40 tipos pertencentes ao gênero *Alphapapillomavirus* são principalmente associados a infecções do trato anogenital e orofaríngeo e são ainda subdivididos em tipos de baixo e alto risco de acordo com seu potencial oncogênico. Os de baixo risco (como HPV6 e 11, por exemplo) são responsáveis por lesões benignas, como verrugas genitais, enquanto os de alto risco (como

HPV16, 18 e 31, por exemplo) são associados a lesões malignas, ocasionando câncer em diferentes locais (DOORBAR, 2005; de VILLIERS et al., 2004).

Todos os genes de HPV são codificados em uma única cópia do genoma viral, de forma que há apenas uma fita molde para a transcrição dos genes virais. O genoma do HPV é composto por três regiões (Figura 1): uma região controladora, denominada LCR (*long control region*), contendo elementos que regulam replicação e transcrição do genoma viral, uma região de genes que codificam proteínas precoces (*early* - E1 a E7), envolvidas nas funções virais, e uma região de genes que codificam proteínas do capsídeo, consideradas tardias de acordo com o ciclo viral (*late* - L1 e L2) (MUÑOZ et al., 2006).

Figura 1 - Ilustração do genoma do HPV 16.



O genoma contém uma região precoce, composta pelos genes E1, E2, E4, E5, E6 e E7, que codificam proteínas envolvidas nas funções virais; e uma região tardia, composta pelos genes L1 e L2, que codificam proteínas virais estruturais, onde L1 é a proteína principal do capsídeo e L2 a proteína secundária do capsídeo. O controle da transcrição e replicação dos genes precoces é conferido pela região LCR (*long control region*).

Fonte: Modificado de Stanley, 2012.

As proteínas E6 e E7 de HPV de alto risco atuam conjuntamente na imortalização das células infectadas (MÜNGER et al., 1989). O mesmo já foi observado apenas com a expressão de E7, no entanto com baixa eficiência, enquanto E6 sozinha não possui esta capacidade (HAWLEY-NELSON; VOUSDEN, 1989).

A proteína E6 encontra-se principalmente no núcleo, porém em alguns casos pode ser encontrada no citoplasma celular (MASSON, 2003). Seu papel mais bem conhecido é a inativação de p53 através da ligação à E6AP, uma subunidade E3 do sistema proteassoma, que recruta e leva à degradação de p53 (SCHEFFNER et al., 1990). E6 também induz transcrição de hTERT, subunidade da telomerase com atividade catalítica que atua na manutenção dos telômeros durante a replicação do genoma celular (KLINGELHUTZ;

FOSTER; MCDUGALL, 1996). Esta atividade é importante para imortalização da célula infectada, juntamente com a inativação de pRB por E7 (KIYONO et al., 1998), também pela via de proteasoma. A proteína E6 também pode se associar a proteínas pró-apoptóticas, como Bak, causando sua degradação (THOMAS; BANKS, 1998).

A função mais conhecida da proteína E7 é a sua interação com a proteína do retinoblastoma (pRB), e as outras proteínas da família de proteínas “pocket”, o que resulta em sua inativação afetando o controle da transição G1/S do ciclo celular (DYSON et al., 1989). Além da inibição de pRB, E7 e E6 também promovem anomalias centroméricas, ocasionando defeitos na divisão celular e instabilidade genômica (DUENSING et al., 2000).

A proteína E5 é uma proteína de membrana, também encontrada no complexo de Golgi e no retículo endoplasmático da célula infectada (CONRAD; BUBB; SCHLEGEL, 1993; HU; CERESA, 2009). E5 interage com o EGF-R (receptor do fator de crescimento epidérmico) retardando sua degradação e internalização, assim, mantendo uma concentração maior destes receptores na superfície celular. Deste modo, torna a célula mais sensível aos sinais pró-mitóticos da respectiva família de fatores de crescimento (STRAIGHT et al., 1993). Essa atividade está associada a maior eficiência de imortalização por E6 e E7 de HPV de alto risco (STÖPPLER et al., 1996).

As proteínas E1 e E2 estão principalmente envolvidas na replicação viral e na regulação da transcrição gênica (E2) (FRATTINI; LAIMINS, 1994; GOODWIN et al., 1998). Por fim, a proteína E4 apesar de ser classificada como proteína precoce, age na fase tardia do ciclo viral, interagindo com o citoesqueleto e auxiliando na montagem e liberação de vírions (DOORBAR et al., 1991).

O HPV infecta células epiteliais e seu ciclo de vida está intimamente associado à diferenciação destas. Através de lesões no epitélio (mucosa ou pele) ou por junções entre o epitélio estratificado e o glandular, o vírus entra em contato com queratinócitos da camada basal, infectando-os (WHITESIDE; SIEGEL; UNGER, 2008). Normalmente as células basais, ao atingirem as camadas suprabasais, cessam a proliferação e se destinam à diferenciação terminal. No entanto, a infecção por HPV de baixo e de alto risco, faz com que estas células permaneçam no ciclo celular e retardem o processo de diferenciação celular. Isto ocorre graças aos mecanismos mediados pelas proteínas E6 e E7, que irão ocasionar aumento da proliferação celular. Neste momento, as demais proteínas precoces (E1, E2, E5 e E4) também são expressas permitindo que o vírus permaneça episossomal e mantenha seu genoma em baixo número de cópias por célula (DOORBAR, 2005). Após esta fase de proliferação

celular, as células infectadas progridem na diferenciação celular, alcançando camadas mais externas do epitélio, e saem do ciclo celular. Nesta fase ocorre um grande aumento da expressão de proteínas e da amplificação do DNA viral, amplificando cerca de 10 vezes o número de cópias virais por célula (STANLEY, 2012). Finalizada a amplificação viral, as células infectas atingem a camada externa do epitélio e as proteínas da fase tardia (L1 e L2) são expressas a fim de montar e liberar a partícula viral (OZBUN; MEYERS, 1998).

Células infectadas com HPV de baixo risco permanecem com o genoma viral episomal. Contrário do que ocorre com as infectadas com tipos de alto risco onde, com a persistência da infecção, algumas células passam a ter o genoma viral integrado. Este processo ocorre ao acaso, sem preferência por um sítio específico do DNA nem do vírus, nem do hospedeiro, embora alguns locais sejam sugeridos na literatura (revisado por BOCCARDO, 2010). A integração do genoma viral pode conferir vantagem adaptativa às células infectadas, quando a quebra do DNA viral acontece na região de E2. Este é um fator de transcrição que mantém a atividade da LCR baixa, e quando sua expressão é perdida ou inibida, a expressão de E6 e E7, controlada pela LCR, aumenta. Nestes casos, as células infectadas com DNA viral integrado apresentam maior chance de imortalização e proliferação descontrolada (JEON; LAMBERT, 1995; ROMANCZUK; HOWLEY, 1992). Além de E2, genes adjacentes também deixam de ser expressos no momento da integração: E4, E5 e parte de L2 (zur HAUSEN, 2002).

O câncer cervical é uma doença crônica precedida por alterações intraepiteliais, denominadas de Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC). As lesões de baixo grau (NIC1) surgem pela infecção tanto de HPV de baixo como de alto risco, e são caracterizadas pela baixa proliferação celular e manutenção do genoma viral episomal. Já as lesões de alto grau (NIC2 e NIC3) são quase exclusivamente associadas ao HPV de alto risco, apresentam alta taxa proliferativa e, em muitos casos, genoma viral integrado (DOORBAR, 2005; STANLEY, 2010). A progressão para o câncer cervical geralmente é associada à integração do genoma viral, ocorrendo na maioria dos casos de infecção por HPV de alto risco (CULLEN et al., 1991). Importante salientar que o HPV por si só, não possui capacidade de transformação celular apenas de imortalização. A partir da imortalização, as células vão acumulando danos genômicos que podem resultar em sua malignização (FEHRMANN; LAIMINS, 2003).

1.3 Papilomavírus humano e sistema imune

O HPV é considerado um vírus pouco imunogênico, que causa uma infecção silenciosa, uma vez que não apresenta fase lítica, viremia e nem se espalha para outros órgãos além do infectado originalmente (GARCIA-CHACON et al., 2009). Este vírus utiliza códons raros em mamíferos, logo há baixa concentração de RNAt para a tradução das proteínas virais na célula hospedeira, de forma que a concentração de proteínas virais permanece baixa. Este é um importante mecanismo de escape do sistema imunológico, por resultar em menos antígenos virais apresentados pela via de MHC-I (CID-ARREGUI et al., 2003). No entanto, apesar destas características apresentadas pelo HPV, na maioria dos casos, o sistema imune consegue identificá-lo e combatê-lo, restando apenas uma pequena parte da população com infecção persistente (GARCIA-CHACON et al., 2009), o que nos leva a questionar a ideia deste ser um vírus pouco imunogênico.

O principal mecanismo envolvido na resposta imune contra o HPV parece ser a resposta adaptativa celular. Estudos observaram uma importante correlação entre o aumento do infiltrado de linfócitos T CD8 e macrófagos e a regressão espontânea de verrugas genitais. Este infiltrado teria um importante papel no combate à infecção por secretar citocinas pró-inflamatórias (tipo Th1) e induzir a expressão de moléculas de adesão (COLEMAN et al., 1994). Por outro lado, pessoas imunossuprimidas (com baixa contagem de linfócitos T CD4) apresentam maior risco de infecção por HPV e de progressão das lesões do colo uterino (PALEFSKY et al., 1999; PETRY et al., 1994).

Mulheres infectadas por HPV, porém assintomáticas, desenvolvem resposta celular T CD4 Th1 contra antígenos virais. Estimulados *in vitro*, linfócitos periféricos destas mulheres proliferam e secretam IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-5 e IL-10. Por outro lado, linfócitos de pacientes com câncer do colo uterino não proliferam e secretam apenas IL-10 em resposta a antígenos virais (WELTERS et al., 2006). Dados do grupo de pesquisa que estuda respostas imunes contra HPV em Leiden (Holanda) tem demonstrado que a ausência de resposta de linfócitos T em pacientes com câncer cervical é devida à presença de células T reguladoras, que inibem a resposta anti-tumoral (de JONG et al., 2004; STEELE et al., 2005; van der BURG et al., 2007; VISSER et al., 2007). Além disso, em pacientes com tumores do colo uterino grandes, mas ainda livres de metástase, a razão entre células CD8 e T reguladoras no tumor é indicativa de risco de metástase. Nas mulheres, em que os tumores apresentavam alta

razão CD8/T reguladora tiveram menor risco de desenvolvimento de metástase linfonodal (PIERSMA et al., 2007).

Apesar de menos importante no controle das lesões, a resposta humoral também ocorre na infecção por HPV sendo principalmente contra a proteína do capsídeo L1. A produção de anticorpos não ocorre em todas as pacientes infectadas; estima-se que 50-70% das mulheres infectadas com HPV efetuem a soroconversão (CARTER et al., 2000). No entanto, os anticorpos persistem por até 10 anos e mesmo em baixo nível são capazes de conferir proteção contra novas infecções pelo mesmo tipo viral (STANLEY, 2010a). Atualmente há duas vacinas profiláticas no mercado, a Cervarix™ que confere proteção contra os HPV16 e 18, e a Gardasil® que além de conferir proteção a estes tipos também atua contra HPV6 e 11, os principais envolvidos em verrugas. Ambas utilizam partículas semelhantes a vírus (*virus-like particles* - VLPs) contendo a proteína do capsídeo L1 e as duas promovem a soroconversão com produção de IgGs neutralizantes em praticamente 100% dos casos (EINSTEIN et al., 2009).

Em 10% dos casos de infecção por HPV, o vírus não é eliminado e a infecção é persistente, evento necessário para o desenvolvimento de tumores malignos (MOSCICKI et al., 2006). A manutenção de um vírus de forma persistente no organismo implica necessariamente em mecanismos de evasão da resposta imune disparados pelo vírus (BOCCARDO; LEPIQUE; VILLA, 2010; TINDLE, 2002). Diversos mecanismos de evasão são mediados pelas proteínas virais E6, E7 e E5, conforme descrito a seguir.

A proteína E7 interage com IRF-1 (*Interferon Regulatory Factor-1*) e inibe sua atividade, assim diminuindo a expressão de Interferon beta, IFN- β , e outros alvos transcricionais deste fator (PEREA; MASSIMI; BANKS, 2000; UM et al., 2002). Aliado a isto, a proteína E6 inibe a atividade transcricional de IRF-3 o que também promove a inibição de IFN- β (RONCO et al., 1998). Além da inibição do IFN- β por E6 e E7, a última também está envolvida na inibição de IFN- α através da ligação a IRF-9 (ANTONSSON et al., 2006). Além de IFN, outra importante citocina que tem sua atividade regulada por HPV é a IL-18. A proteína E6 de HPV16 atua inibindo sua expressão em células infectadas (CHO et al., 2001) e ainda, as duas proteínas, E6 e E7, são capazes de modular a resposta do hospedeiro, inibindo a produção desta citocina em células mononucleares (LEE et al., 2001). A proteína E5 de HPV 16 está associada à diminuição da expressão de MHC de classe I, pela retenção dessa molécula no Complexo de Golgi (ASHRAFI et al., 2005), além da inibição da expressão de MHC de classe II induzida por IFN- γ em queratinócitos (ZHANG et al., 2003). A proteína

E7 também está envolvida neste processo, por inibir a expressão de TAP-1, proteína envolvida no transporte de peptídeos, também de LMP2 e LMP7, subunidades do sistema proteossoma que aumentam sua atividade, promovendo maior eficiência na apresentação de antígenos intracelulares (UM et al., 2002; W et al. 2010). Além disso, E6 e E7 de HPV16 são capazes de diminuir a transcrição de TLR9, assim prejudicando a resposta imune inata do hospedeiro (HASAN et al., 2007). Além destes mecanismos bastante específicos em relação a seus alvos, o fato do ciclo viral ser intimamente associado ao processo de diferenciação de queratinócitos, de forma que as proteínas do capsídeo, as mais imunogênicas, sejam expressas apenas nas camadas mais externas do epitélio, e a ausência de lise das células infectadas também ajuda o vírus a passar pelo organismo sem que o sistema imune o perceba.

As células dendríticas (DC) são um importante elo entre a imunidade inata e a adaptativa, por sua capacidade de apresentação de antígenos aos linfócitos T naive. Em lesões associadas ao HPV, observou-se redução das células de Langerhans (DC residentes do epitélio) devida à redução da expressão de E-caderina em queratinócitos infectados (MATTHEWS et al., 2003). Ainda demonstrou-se que estas são incapazes de gerar uma resposta de célula T eficiente, além de contribuírem para um ambiente supressor por favorecerem a indução de células T reguladoras através da expressão da enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), uma importante indutora deste fenótipo (KOBAYASHI et al., 2008).

Outra população presente nas lesões do colo uterino são macrófagos, que apresentam características supressoras e tem papel no microambiente tumoral, conforme descrito a seguir.

1.4 Microambiente tumoral

Tumores são estruturas complexas formadas por vários tipos celulares que contribuem diferentemente para a tumorigênese. Esta combinação de células tumorais, endoteliais, fibroblastos, pericitos e células imunes forma o microambiente tumoral (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Apesar das células tumorais apresentarem diversas características que permitem sua proliferação indefinida, elas necessitam de outros fatores para sua manutenção e progressão. Deste modo, há muito tempo é reconhecido que o câncer pode se estabelecer em regiões de inflamação crônica, e nestas promover o condicionamento das células inflamatórias, e todas as outras presentes no microambiente tumoral, para promover um ambiente favorável à sua progressão (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Os tumores apresentam diversos mecanismos de escape do sistema imune, que além de inibir a resposta das células imunes, ainda são capazes de subvertê-las a seu favor (ZITVOGEL; TESNIERE; KROEMER, 2006). Assim, a inflamação contribui com o microambiente tumoral através da produção de fatores de crescimento, de sobrevivência e fatores pró-angiogênicos, além de promover a ativação da matriz extracelular. Adicionalmente, as células inflamatórias podem liberar substâncias químicas, como espécies reativas de oxigênio, que potencialmente promovem mutação gênica (HANAHAN; WEINBERG, 2011). As células tumorais secretam diversas citocinas e quimiocinas que atraem células inflamatórias, as quais compreendem as células da imunidade inata (macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, eosinófilos e mastócitos) e as da imunidade adquirida (linfócitos T CD4 e CD8 e linfócitos B) (COUSSENS; WERB, 2002). Em contrapartida, estas células produzem diversas citocinas e quimiocinas que amplificam o processo inflamatório, além de fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fatores pró-invasivos, como MMP-9 (Metalopeptidase de Matriz 9) (HANAHAN; WEINBERG, 2011), que também são importantes para a angiogênese.

Em alguns tumores, os macrófagos são as principais células do infiltrado inflamatório tumoral e são assim denominados, macrófagos associados ao tumor (TAM) (LORUSSO; RÜEGG, 2008). Em qualquer ambiente, inclusive no tumoral, os macrófagos podem se diferenciar em dois subtipos, M1 e M2. Nos estágios iniciais da tumorigênese, macrófagos M1 podem infiltrar o tumor numa tentativa de combatê-lo, secretando citocinas pró-

inflamatórias (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12 ou IL-23), espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, potencialmente tóxicas, e atraindo células antitumorais. Em contraste, em tumores mais desenvolvidos ou em regiões de hipóxia do tumor, os macrófagos tendem a polarizar para M2, também chamados macrófagos “alternativamente” ativados, e são imunossupressores. Especificamente na infecção por HPV, o aumento no número de macrófagos infiltrantes está associado à progressão das lesões cervicais após infecção (HAMMES et al., 2007; KOBAYASHI et al., 2000). Estas células da imunidade inata são recrutadas para o tumor e lá se diferenciam em macrófagos de fenótipo regulador (PIERSMA, 2011). Nosso laboratório demonstrou, em modelo animal de tumor associado ao HPV16, que a principal população de células do infiltrado tumoral é a de macrófagos supressores. Estes promovem o crescimento tumoral e inibem a resposta de células T antitumorais, favorecendo a expansão de células T reguladoras (LEPIQUE et al., 2009). O mecanismo pelo qual estes macrófagos exercem estas atividades está associado à produção de IL-10 (BOLPETTI et al., 2010).

Outras importantes células da imunidade inata presentes no infiltrado tumoral, são as células dendríticas, que frequentemente apresentam fenótipo imaturo e são más apresentadoras de antígeno (BALKWILL; MANTOVANI, 2001), as células mieloderivadas supressoras, compostas de uma população heterogênea de células mielóides, com características de células imaturas e morfologia e marcadores de superfície variáveis, inclusive entre humanos e camundongos. Sua função foi descrita inicialmente como supressoras de resposta anti-tumoral (MOVAHEDI et al., 2008), porém tem se observado a expansão destas células em quadros inflamatórios graves, como em pacientes que sofreram queimaduras extensas. Finalmente, granulócitos, principalmente neutrófilos, também são encontrados em tumores, e, como os macrófagos, também podem ser subdivididos em tipos convencionais (N1) e alternativos (N2), os quais estariam envolvidos na supressão da resposta antitumoral (FRIDLENDER et al., 2009).

Linfócitos T também estão presentes em tumores, sendo denominados nestes casos, linfócitos infiltrantes de tumor (TIL). Muitos destes linfócitos são específicos aos antígenos tumorais, no entanto eles são amplamente ineficientes na resposta antitumoral (WHITESIDE, 2008), entre outros motivos, por produzirem principalmente citocinas do tipo Th2 (BALKWILL; MANTOVANI, 2001). Uma importante população de linfócitos associadas ao tumor é a de linfócitos T reguladores, que se encontra aumentada tanto no infiltrado tumoral quanto na circulação de pacientes com tumor. Esta célula tem um importante papel na inibição da resposta de células T e estudos demonstram que ao neutralizar sua atividade, a

resposta imune antitumoral é fortemente ativada (ZOU, 2005). Além dos linfócitos T reguladores, os linfócitos B também podem desempenhar importantes papéis pró-tumorais por regularem a resposta antitumoral (TADMOR et al., 2011).

1.5 Efeitos do câncer na hematopoiese

A progressão tumoral está associada a efeitos sistêmicos no hospedeiro, marcadamente pelo aumento da hematopoiese, especialmente de células mielóides, e o acúmulo celular em diferentes sítios anatômicos. Com isto, o tumor pode atuar na medula óssea, promovendo a expansão de populações mielóides e recrutando células, em diferentes estágios de maturação, para o infiltrado tumoral e para os órgãos linfoides secundários, além de ocasionar aumento de leucócitos no sangue (leucocitose) (CHIODA et al., 2011; WILCOX, 2010).

Em animais, o principal órgão linfoide secundário afetado é o baço, onde ocorre uma grande expansão do mesmo (esplenomegalia), associado principalmente ao acúmulo de células mielóides (MELANI et al., 2003), inclusive observado em tumor associado ao HPV (LEPIQUE et al., 2009). Em alguns modelos de estudo, observou-se que estas células são recrutadas para o tumor onde se diferenciam em macrófagos do tipo M2 e, conseqüentemente exercem funções pró-tumorais (van GINDERACHTER et al., 2006).

Esta expansão de células mielóides nos órgãos linfoides secundários parece não ser somente fruto do recrutamento de células para estes locais, mas também da proliferação local (YOUNOS et al., 2012). Isto se correlaciona ao fato de certas populações mielóides, como macrófagos, proliferarem localmente em resposta a inflamação e a fatores de crescimento (secretados em diversos tipos de câncer) (ISBEL et al., 2001; JENKINS et al., 2011)

Geralmente o aumento no número de leucócitos em pacientes com diferentes tipos de câncer está associado ao mau prognóstico (revisado por WILCOX, 2010). De fato, em câncer cervical, quando este fenômeno é observado, as pacientes estão em uma fase mais adiantada da doença, tem maior propensão à falha do tratamento e apresentam menor sobrevida livre de doença (GARCIA-ARIAS et al., 2007; MABUCHI et al., 2011).

Sendo assim, observa-se que o câncer é uma doença sistêmica, não somente atuando na modulação do sistema imune ao seu favor, como alterando a hematopoiese para suprir a sua demanda por células. No câncer cervical, o aumento de leucócitos é um fator de mau prognóstico. Entretanto, pouco é entendido sobre os mecanismos pelos quais as células de câncer cervical desencadeiam este processo e tampouco se esta modulação ocorre em

qualquer tipo de câncer cervical ou se a infecção por HPV é um importante fator promotor. Por esse motivo, este trabalho propõe o estudo deste fenômeno, observando a proliferação local de células mielóides e os possíveis fatores que desencadeiam a mesma.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar efeitos locais e sistêmicos de células tumorais infectadas com o Papilomavírus Humano sobre recrutamento e proliferação de células mielóides e linfóides de camundongos imunodeficientes.

2.2 Específicos

- Caracterizar o infiltrado inflamatório dos tumores associados ou não ao HPV em modelos murinos;
- Investigar se há diferença de proliferação de células nos órgãos linfóides de camundongos imunodeficientes com tumores;
- Avaliar o perfil de citocinas expressas pelas linhagens de células tumorais com e sem HPV;
- Realizar eletroforese bidimensional para detectar proteínas diferencialmente expressas por células tumorais com HPV.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Linhagens celulares

Para a realização deste trabalho foram utilizadas linhagens celulares de câncer cervical adquiridas da ATCC (*American Type Culture Collection*, Manassas, EUA) ou doadas pelo laboratório da Dra. Luisa Villa, Instituto do Câncer do Estado de São Paulo e Santa Casa de Misericórdia de São Paulo.

As linhagens utilizadas foram as seguintes: HeLa, positiva para HPV18, SiHa, positiva para HPV16, e C33, negativa para HPV. Todas essas linhagens são derivadas de tumores de pacientes, portanto humanas. Além da parental, também foi utilizada a linhagem C33 transduzida com os dois principais oncogenes de HPV16, E6 e E7. As linhagens C33 pLX e C33 E6/E7 foram geradas pela transdução do vetor retroviral pLXSN vazio ou com os oncogenes E6 e E7 de HPV16 clonados, respectivamente. Essas células foram geradas pela Dra. Lara Termini, INCT-HPV, Santa Casa de Misericórdia de São Paulo.

3.2 Animais

Camundongos fêmeas imunodeficientes das linhagens RAG1^{-/-} (B6.129S7-Rag1^{tm1Mom}/J, The Jackson Laboratory, Maine, EUA), os quais não possuem linfócitos T e B e Nude/C57Black/6 (B6.Cg-Foxn1nu/J, CEMIB, UNICAMP, Campinas, SP, Brasil), os quais possuem apenas linfócitos B, foram mantidos no Biotério de Camundongos Isogênicos do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, em condições *spf* (*specific pathogen free*) com água e ração autoclavadas e consumo *ad libitum*, ciclos de claro e escuro de 12 horas. Os procedimentos efetuados foram aprovados pela Comissão de Experimentação e Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas, USP.

O uso de camundongos imunodeficientes fez-se necessário para que pudessemos estudar o crescimento e efeito das células eleitas para este estudo *in vivo*.

3.3 Cultivo celular

As células foram cultivadas em garrafas de cultura com RPMI-1640 (Life Technologies, Grand Island, NY, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB)

(Cultilab, Campinas, S.P., Brasil), 5 µg/mL de gentamicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e com 1% de glutamina (Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) quando necessário. Estas foram mantidas em incubadora umidificada a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂. Ao atingirem confluência desejada, as células foram subcultivadas. Para isto, foram lavadas com PBS com 0,05 mM EDTA e tratadas com solução de 0,25% tripsina/EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Número de células em uma dada cultura foi determinado por contagem de uma alíquota da suspensão das células de interesse em câmara de Neubauer, avaliando-se a viabilidade pela exclusão do corante vital, azul de tripan.

3.4 Modelo de tumor ectópico

As células das linhagens HeLa, SiHa ou C33 foram tripsinizadas, contadas e lavadas duas vezes com PBS⁺⁺ (1 mM CaCl₂, 0,5 mM MgCl₂), a fim de remover qualquer soro restante. Apenas preparações de células com viabilidade acima de 95% foram utilizadas para inoculação nos animais. Um total de 5.10⁶ células/100 µL de PBS⁺⁺ foi inoculado subcutaneamente no flanco dorsal direito de cada camundongo. Os animais foram observados até que os tumores atingissem de 6 a 8 mm de diâmetro para coleta dos tecidos de interesse após eutanásia.

3.5 Incorporação de bromodeoxiuridina

Quando os animais inoculados com as células tumorais apresentaram tumores com aproximadamente 6 a 8 mm de diâmetro cada um deles foi injetado com 1 mg de Bromodeoxiuridina em 100 µl de PBS, por via intraperitoneal. Após uma hora, os animais foram sacrificados e tiveram baço, linfonodo (apenas no caso dos animais Nude), fêmur, tíbia e crista íliaca e tumor coletados.

3.6 Histoquímica

Porções de baço dos animais RAG1^{-/-} com e sem tumor foram congelados em Tissue Freezing Medium (Triangle Biomedical Sciences, Durham N.C.) para posterior secção em criostato. Cortes de 5 µm de espessura foram dispostos em lâminas Superfrost Plus (Fisherbrand – Fisher Scientific, EUA), fixados por 5 min em solução de acetona e metanol,

na proporção de 2:1. Em seguida, os tecidos foram secos ao ar, rehidratados em PBS e corados com hematoxilina Gill's (Vector, CA, EUA). Os tecidos corados foram incubados brevemente em PBS, em seguida desidratados em gradiente alcólico, seguido de duas incubações em xilol. A montagem foi feita com Permount (Fisher chemical - Fisher scientific, NJ, EUA). Micrografias foram adquiridas em microscópio BX61 (Olympus, Japão), com o sistema de aquisição fornecido pelo fabricante.

3.7 Suspensões celulares

Todas as suspensões celulares foram preparadas em tampão *Mouse Tonic Hanks*, MTH (Hanks 1 X com 15mmol/L de HEPES pH 7.4, 0.5 U/mL DNase e 5% SFB). Assim, o baço e os linfonodos foram dissociados mecanicamente, e para obtenção da medula óssea, fêmures, tíbias e cristas ilíacas foram removidos da pata inferior do animal e macerados com MTH com auxílio de um cadinho e pistilo. Já o tumor foi digerido com 1 mg/ml Colagenase I/IV (Worthington Biochemical Corporation, NJ, EUA) em MTH por cerca de 40 minutos a 37 °C, sob agitação de 1300 rpm utilizando o equipamento *Thermomixer* (Eppendorf, Alemanha). Todas as suspensões foram filtradas e lavadas, além disso, as suspensões de baço e medula óssea passaram pelo processo de lise de hemácias utilizando-se tampão hipotônico (0,15 M de NH₄Cl, 10 mM de KHCO₃ e 0,1 mM de EDTA). Em seguida, todas as suspensões foram contadas com auxílio da câmara de Neubauer.

3.8 Avaliação da proliferação de células de órgãos linfoides

Após a obtenção das suspensões celulares dos animais tratados conforme descrito em 2.5, foram aliqüotadas 5.10⁶ células para verificação da proliferação celular, inferida a partir da entrada das células na fase S, onde as mesmas incorporam BrdU metabolicamente. Para isto, primeiramente as células foram coradas com anticorpos específicos para marcadores de superfície: anti-CD45 APC (clone 30F11), anti-Gr1 PE (clone RB6-8C5), anti-CD19 647 (clone 1D3) (BD Biosciences San Diego, CA, EUA); anti-CD11b FITC (M1/70) (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA); anti-F4/80 PECy5 (clone BM8), MHC II biotilado (clone MS/114.15.2) (eBiosciences, San Diego, CA, EUA). Após, utilizando-se o kit Flow Cytometry BrdU kit (BD Biosciences, Carlsbad, CA, EUA), as células foram fixadas,

refixadas e permeabilizadas, digeridas com 300 µg/mL de DNase e incubadas com anticorpo anti-BrDU, conforme instruções do fabricante. Os tumores foram diretamente analisados com anticorpos específicos para marcadores de superfície. Em seguida, as células foram avaliadas por citometria de fluxo, utilizando-se o equipamento FACSCalibur (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA). Os resultados obtidos na citometria de fluxo, foram analisadas pelo programa FlowJo, versão 7.6.5 (Treestar Inc, EUA).

3.9 Perfil de citocinas

Para a detecção de citocinas, quimiocinas e proteínas de fase aguda, utilizou-se o *Human Cytokine Array Kit* (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA). Este método utiliza membranas de nitrocelulose com anticorpos previamente imobilizados, específicos para os fatores a serem analisados. Sobre as membranas foram incubados os lisados celulares, em seguida, um novo mix de anticorpos foi utilizado para detecção das proteínas imobilizadas, como um sanduíche. Esse mix de anticorpos é conjugado à peroxidase que é utilizada para detecção pelo sistema ECL do próprio kit. Cerca de $9 \cdot 10^5$ células HeLa, SiHa e C33 foram semeadas em garrafas de 25 cm² com meio de cultura suplementado com 10% de SBF e incubadas por 48 h. Estas células, em estágio de crescimento exponencial, foram removidas das garrafas por tripsinização, lavadas com PBS e lisadas de acordo com instruções do fabricante. As mesmas células tumorais também foram isoladas de tumores desenvolvidos em animais RAG1^{-/-} através de seleção negativa utilizando esferas magnéticas conjugadas com anticorpo anti-CD45 e colunas *MACS Column VS/LS* (MACS Milteny Biotec Inc, GE) para separar o infiltrado inflamatório das células tumorais. As células isoladas foram lavadas com PBS e lisadas de acordo com instruções do fabricante. A seguir fez-se a quantificação das proteínas para todos os lisados utilizando-se o método de Bradford (descrito posteriormente), e 100ug dos lisados foram utilizados para os experimentos, realizados conforme o protocolo do fabricante. As autorradiografias obtidas no experimento foram digitalizadas e os *spots* correspondentes a cada citocinas foram densitometrados com auxílio do programa ImageJ, versão 1.45.

3.10 Eletroforese 2D

Esta parte do projeto foi realizada em colaboração com a Prof. Dra. Nathalie Cella (Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, ICB, USP), Profa. Dra. Deborah Schechtman (Departamento de Bioquímica, IQ, USP) e alunos Mariana Tamazato Longhi e José Matheus Camargo Bonatto.

3.10.1 *Extração de proteínas*

As células C33, C33 pLXSN e C33 E6/E7 com até 10 passagens em cultura foram semeadas em placas de Petri de cultura com meio de cultura com 10% de SFB e incubadas por aproximadamente 14 horas. Em seguida, estas células foram lavadas com PBS e lisadas com tampão de lise (8 M de uréia, 2% de CHAPS, 0,002% de azul de bromofenol, inibidores de protease (1 mM Phenylmethanesulfonyl (PMSF), 1 µg/ml aprotinina e 1 µg/ml leupeptina – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), fosfatase (1 mM Na₃VO₄, 50 µM β-glicerofosfato e 5 mM NaF – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e serina protease (1 mM - Cell Signaling, Danvers, MA, EUA).

Os lisados ficaram sob agitação por 30 minutos, foram centrifugados a 14.000 rpm por 5 minutos e os sobrenadantes transferidos para novos tubos e armazenados a -20 °C.

As proteínas foram precipitadas com uma solução de 10% TCA em acetona pura, por 14-16 horas a -20 °C. Então foram centrifugadas durante 30 min a 16.000 g e o sedimento protéico foi lavado com acetona pura gelada e incubado por 3 horas a -20 °C. Após nova centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento de proteína foi seco em *SpeedVac*. As proteínas foram então ressolubilizadas em tampão de solubilização (7 M de uréia, 2 M de tio-uréia, 50 mM DTT, 4% CHAPS e 0,4% Triton X-100).

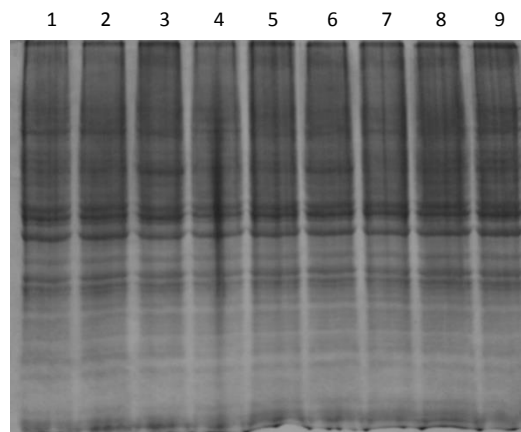
3.10.2 *Quantificação das proteínas*

As proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (1976), utilizando-se o kit comercial Biorad protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Neste método, 2 µL de cada lisado foram adicionados a 200 µL do reagente comercial já diluído (4 partes de água para 1 parte de reagente) em uma placa de 96 cavidades. Paralelamente, fez-se uma curva padrão de Albumina de Soro Bovina (BSA). A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro

a 595 nm. As concentrações das proteínas foram calculadas pela equação da reta gerada pela curva padrão de BSA.

A fim de confirmar a quantificação protéica, fez-se um gel de poliacrilamida de 10% com 50 µg de cada lisado e tampão de amostra (figura 2).

Figura 2 - Eletroforese unidimensional das linhagens C33, C33pLX e C33E6/E7.



Para a eletroforese foram utilizados 50 µg de lisado das diferentes linhagens em um gel de poliacrilamida de 10%. 1, 4 e 7 – C33; 2, 5 e 8 – C33 pLX; 3, 6 e 9 – C33 E6/E7.

3.10.3 Eletroforese 2D

Primeiramente as proteínas foram separadas pelo ponto isoelétrico (pI) pelo processo de focalização isoelétrica utilizando-se o sistema IPGphor 2 Strip Holder (Immobilized pH Gradient Strips – GE Healthcare). Para isto, foram utilizadas fitas de 13 cm de comprimento com pH imobilizado de 3 a 10 não linear. Estas, foram reidratadas no aparato de focalização isoelétrica, por 15 horas em temperatura ambiente, com 800 µg de cada amostra adicionada de tampão de solubilização (7 M de uréia, 2 M de tio-uréia, 10 mM de DTT, 0,4% v/v de Triton X-100) com 1% de IPG Buffer pH 3-10 não linear, a fim de totalizar 250uL de volume final para reidratação. Para evitar evaporação das amostras, as fitas foram cobertas com 2 mL de óleo mineral (Fluid Cover, GE Healthcare). A focalização isoelétrica foi realizada nas seguintes condições: 30 Volts (V) por 11 horas em step, 100 V por 1 hora em step, 200 V por 1 hora em step, 400 V por 1 hora em step, 700 V por 1 hora em step, 1000 V por 1 hora em step, 5.000 V por 10 horas em step e 8.000 V constante até que a voltagem total acumulada

chegasse em 80.000 V. Após a focalização as fitas foram acondicionadas a -20°C . Todos os lisados foram focalizados ao mesmo tempo.

Para a segunda dimensão, as fitas contendo as proteínas focalizadas foram mantidas a temperatura ambiente no aparato de focalização isoeletrica, durante 15 minutos em solução de equilíbrio e redução (50 mM Tris-HCl pH 8,8, 6 M uréia, 30% glicerol, 2% SDS e 2% DTT). Em seguida, as fitas foram colocadas em solução de alquilação (50 mM Tris-HCl pH 8,8, 6M uréia, 30% glicerol, 2% SDS, 4% de iodocetamida e 0,002% de azul de bromofenol) durante mais 15 minutos.

A eletroforese para fracionamento por massa molecular foi realizada em gel de poliacrilamida de 12,5% (180 mm x 160 mm x 0,75 mm) segundo Laemmli (1970). As fitas foram inseridas sobre o gel de poliacrilamida e fixadas com uma solução de 0,05% de agarose solubilizada em tampão de corrida (25 mM de Tris-HCl, 192 mM Glicina e 0,01% de SDS). O padrão de peso molecular (Full-Range Rainbow Molecular Weight Markers – GE Healthcare) foi aplicado em papel de cromatografia e inserido sob o gel ao lado de cada fita contendo um lisado isofocalizado. A separação eletroforética das proteínas foi realizada a 8°C em cuba modelo PROTEAN II XI 2-D Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA), utilizando-se inicialmente uma corrente fixa de 15 mA por gel durante 30 minutos e uma corrente fixa de 60 mA por gel até o corante atingir o final do gel. Foram preparados três géis para cada amostra, as quais foram obtidas de passagens subsequentes das linhagens celulares utilizadas.

3.10.4 Detecção de proteínas

Para a visualização das proteínas obtidas nos géis de poliacrilamida, estes foram corados com *Coomassie Brilliant Blue G-250*, baseado no protocolo de Candiano et al. (2004). Primeiramente, os géis foram mantidos em uma solução fixadora (40% de etanol, 10% de ácido acético), por 14 a 16 horas. Em seguida, a solução fixadora foi removida e adicionada a solução de coloração (10% ácido ortofosfórico, 10% sulfato de amônio, 10% sulfato de amônio, 0,1% *Coomassie Brilliant Blue G-250* e 20% metanol), na qual os géis foram mantidos por 48 horas. Por fim, os géis foram lavados em água milli-Q para remoção do excesso de corante e armazenados em 5% de ácido acético. Todas as etapas foram realizadas sob agitação, à temperatura ambiente.

3.10.5 Obtenção e análise das imagens

As imagens dos géis foram obtidas com o scanner ImageScanner 3 (GE Healthcare) e com auxílio do programa LabScan 6.0 (GE Healthcare). As imagens foram analisadas no programa ImageMaster 2D Platinum versão 7.0 (GE Healthcare).

A detecção das bandas foi realizada de modo automático adotando-se os seguintes parâmetros: smooth: 2, área mínima: 5 e saliência: 100.000. Após esta detecção, foi feita uma edição manual das bandas, onde as mesmas foram divididas, removidas ou adicionadas. Depois desta etapa, foi feito o pareamento automático entre as triplicatas, a fim de detectar as mesmas bandas entre diferentes géis. Uma nova etapa de edição manual foi realizada e por fim, agruparam-se os diferentes tratamentos em classes (C33, C33pLX e C33 E6/E7) e fez-se um novo pareamento, agora entre as classes.

Por fim, prosseguiu-se com a análise estatística entre as classes, utilizando um módulo de estatística que o próprio ImageMaster fornece. Para isto, as classes foram comparadas em etapas: C33 x C33pLX, C33 x C33E6/E7 e C33E6/E7 x C33pLX. Foram consideradas alterações significativas, as bandas que apresentaram $p < 0,05$ no teste de ANOVA. Além das alterações significativas, também foram consideradas bandas inéditas, presentes em somente uma das classes.

3.11 Análise estatística

Para os experimentos de citometria de fluxo e perfil de citocinas, cada população foi avaliada por teste-t, onde o intervalo de confiança aceitável foi de 95%, portanto $p < 0,05$. O objetivo das análises nos experimentos com camundongos foi comparar animais com tumor e sem tumor, e animais com tumor HPV+ e HPV-. Além disso, os resultados obtidos com esses experimentos apresentam distribuição normal, de forma que um teste paramétrico é o mais adequado.

Para estas análises foi utilizando o software estatístico GraphPad Prism 5 (La Jolla, CA, USA). Na eletroforese 2D a análise estatística foi realizada pelo software ImageMaster 2D Platinum versão 7.0 (GE Healthcare), onde as bandas foram comparadas por ANOVA e novamente, aceitamos intervalo de confiança de 95%, $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Infiltrado inflamatório

Evidências anteriores do nosso laboratório demonstram que no tumor de animais imunocompetentes injetados com células TC-1 (linhagem murina transformada com os oncogenes E6 e E7 de HPV16 e Ej-ras), há presença de um infiltrado inflamatório associado ao tumor, composto em grande maioria por macrófagos com características supressoras (LEPIQUE et al., 2009). Apesar de utilizado por vários grupos de pesquisa no mundo todo, o modelo TC-1 não tem um controle negativo para HPV, o que nos levou a questionar, quanto dos resultados obtidos com TC-1 são devidos a mecanismos disparados pelas oncoproteínas virais. Para melhor investigar essa questão, nós utilizamos linhagens derivadas de tumores do colo uterino de pacientes. Animais foram injetados com duas linhagens tumorais positivas para HPV (HeLa – HPV18 e SiHa – HPV16) e uma negativa para HPV (C33, mutação em p53 - (SCHEFFNER et al., 1991)). Como essas são linhagens humanas, nós utilizamos camundongos imunodeficientes para formação destes tumores, tendo trabalhado até o momento com camundongos RAG1^{-/-} e Nude. Estes dois modelos animais são amplamente utilizados em estudos como este (MORTON; HOUGHTON, 2007).

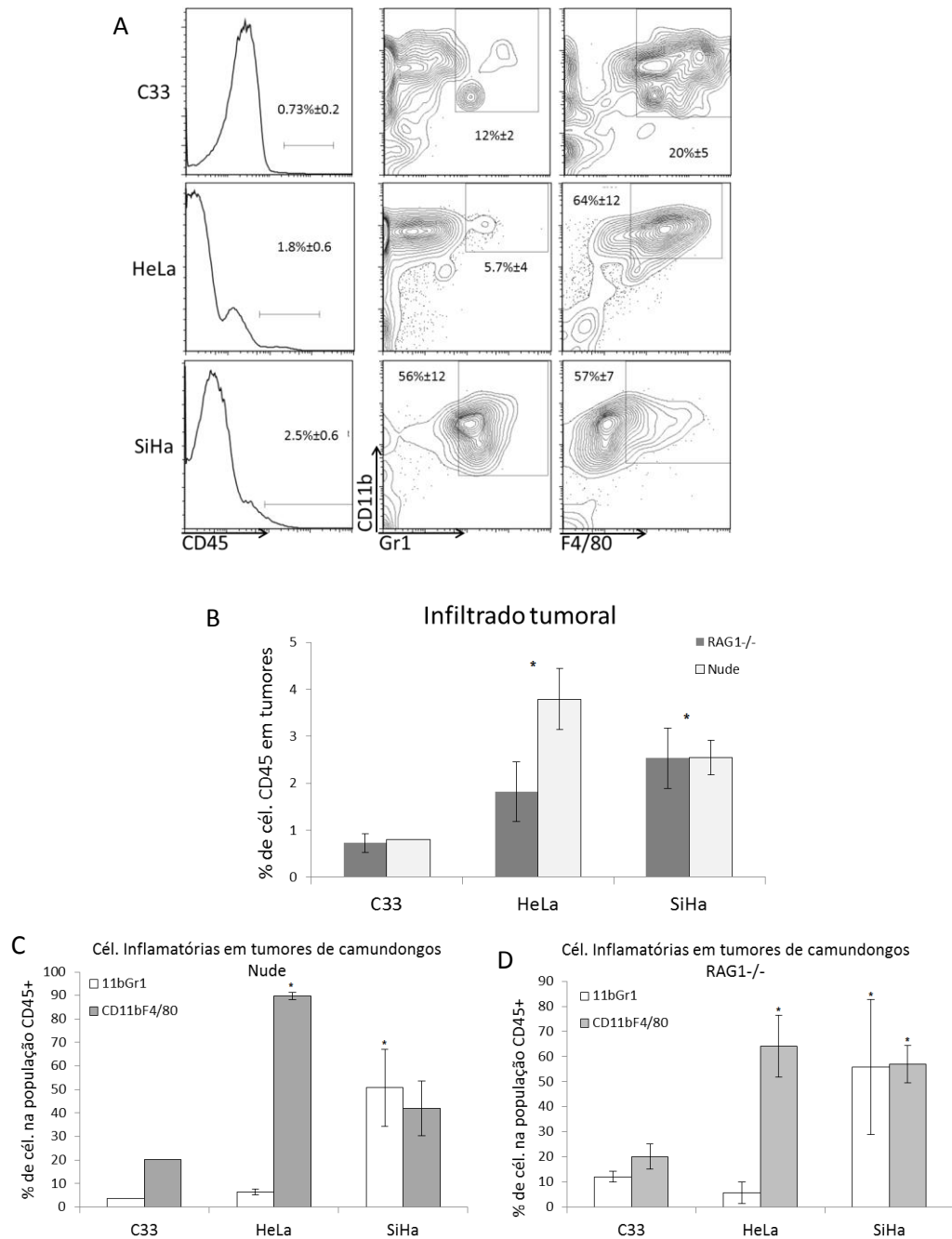
Após injeção de células tumorais, os camundongos foram acompanhados até que os tumores atingissem 6 a 8 mm de diâmetro (em cerca de 45 dias), os animais foram, então, sacrificados e seus tumores e órgãos linfóides coletados, digeridos ou dissociados e marcados com anticorpos específicos para linhagens mielóides. As populações presentes no infiltrado inflamatório (CD45) de tumores foram definidas como macrófagos (CD11bF4/80), e granulócitos ou células mieloderivadas supressoras (CD11bGr1). Nós observamos que entre as células CD11bGr1 há mais de uma subpopulação. Como essas subpopulações parecem heterogêneas entre as diferentes condições experimentais, optamos por denominar este conjunto de CD11bGr1. Posteriormente discutiremos que linhagens ou subpopulações mielóides essas células podem representar, e seu papel na resposta ou tolerância a antígenos tumorais.

O tumor negativo para HPV (C33) apresenta menor frequência de células inflamatórias ($0,73\% \pm 0,2$ de células CD45+), quando comparado com os tumores positivos (HeLa – $1,8\% \pm 0,6$ e SiHa – $2,5\% \pm 0,6$ de células CD45+), tanto em camundongos da linhagem RAG1^{-/-}, como Nude (Figura 3 A-B). Nós observamos uma mistura de macrófagos

e células CD11bGr1 nestes tumores, sendo que em tumores HeLa, há maior frequência de macrófagos ($64\% \pm 12$), enquanto tumores SiHa apresentam praticamente metade do infiltrado de macrófagos ($57\% \pm 7$) e metade de células CD11bGr1 ($56\% \pm 12$) (Figura 3C-E). Novamente, os resultados obtidos com células injetadas em camundongos RAG1^{-/-} e Nude foram similares.

O crescimento tumoral é heterogêneo entre as diferentes linhagens celulares, mas não entre as diferentes linhagens de camundongos, sendo que o tumor de C33, apesar do menor número de infiltrado, é o que cresce mais rapidamente, ainda que demore em torno de 45 dias para chegar a um diâmetro de 6 a 8 mm. No entanto, independentemente do crescimento tumoral, os tumores positivos para HPV recrutam mais células inflamatórias para o sítio tumoral, nas duas linhagens de camundongos. Logo, aparentemente o HPV é importante neste recrutamento.

Figura 3 - Caracterização do infiltrado inflamatório em tumores SiHa, HeLa e C33 em camundongos imunodeficientes Nude e RAG1^{-/-}.



Suspensões totais de células tumorais foram marcadas com os anticorpos indicados e analisadas por citometria de fluxo. Foram adquiridos 30000 eventos da população CD45⁺ em cada amostra. Os histogramas e os dot plots (A) são representativos de um experimento de caracterização do infiltrado tumoral em camundongos RAG1^{-/-}, representando a diferença de recrutamento de células entre os tumores positivos para HPV e tumor negativo para HPV (C33). Gráficos representam a porcentagem de infiltrado inflamatório total, identificado por marcação com anti-CD45, em tumores SiHa, HeLa e C33 em camundongos Nude e RAG1^{-/-} (B); e a porcentagem de diferentes populações celulares contidas no infiltrado inflamatório em tumores SiHa, HeLa e C33 em camundongos Nude (C) e RAG1^{-/-} (D). Os asteriscos indicam diferenças significativas entre os tumores C33 e o restante dos grupos experimentais, testado por teste-t dois a dois, $p < 0,05$. CD45 – infiltrado total, CD11bGr1 – granulócitos ou células mieloderivadas supressoras, CD11bF4/80 – macrófagos.

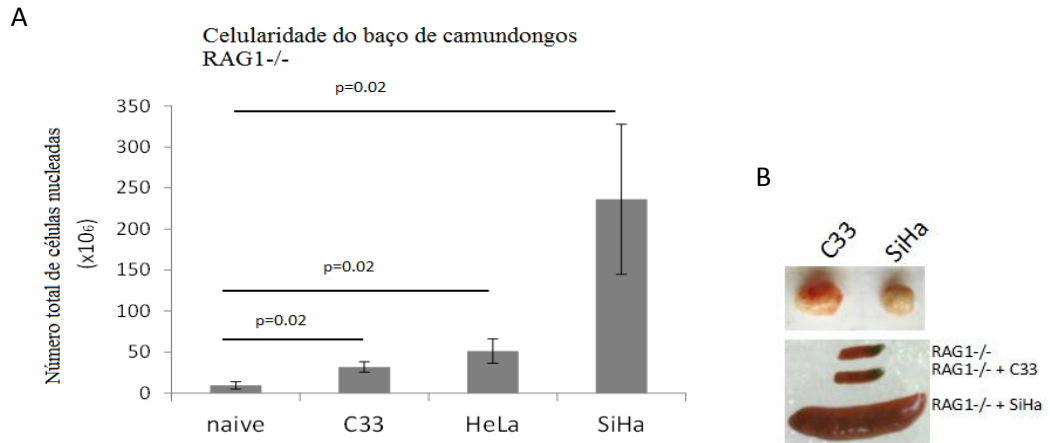
4.2 Avaliação do efeito dos tumores sobre populações de células do sistema imune

Resultados anteriores do nosso laboratório indicam que há um aumento significativo das populações CD11bGr1 e CD11bF4/80 no baço de camundongos com tumores TC-1, além de um aumento significativo do número de linfócitos B em linfonodos destes mesmos animais (LEPIQUE et al., 2009). O uso de lipossomos com clodronato é capaz de reduzir tanto o número de macrófagos tumorais, como as populações de células mielóides no baço, o que leva à expansão de células CD8 específicas para antígenos tumorais (LEPIQUE et al., 2009). O aumento do número de células mielóides em pacientes com tumor tem sido demonstrado em diversas situações e tem sido associado à progressão tumoral e pior prognóstico (WILCOX, 2010).

Para identificar se o fenômeno que nós observamos no sistema TC-1 e que tem sido descrito para pacientes com carcinoma do colo uterino, pode ser dependente de HPV, como observamos na avaliação do infiltrado tumoral, nós analisamos os tecidos linfoides dos mesmos camundongos descritos anteriormente. De acordo com nossos resultados, quando os tumores atingem o tamanho desejado (6 a 8 mm), o número total de células dos mesmos é de 50 a 70 milhões de células. Como descrito anteriormente, nos tumores SiHa, por exemplo, cerca de 3% são células inflamatórias. Além disso, nós observamos ao sacrificarmos os camundongos, acentuada esplenomegalia. Com isto, nos perguntamos qual a origem e mecanismos de expansão de células tanto que migram para o tumor, como que se acumulam no baço dos camundongos.

Macroscopicamente, foi possível observar que o baço do animal com tumor de SiHa apresentava volume significativamente maior que dos outros animais testados, o que é refletido no número total de células presentes neste órgão. Apesar deste fenômeno ser mais expressivo em SiHa, onde ocorre aumento de 24 vezes do número de esplenócitos em comparação com camundongos da mesma linhagem sem tumor, nos demais tumores também é observado aumento significativo da celularidade dos baços avaliados em relação aos controles (Figura 4).

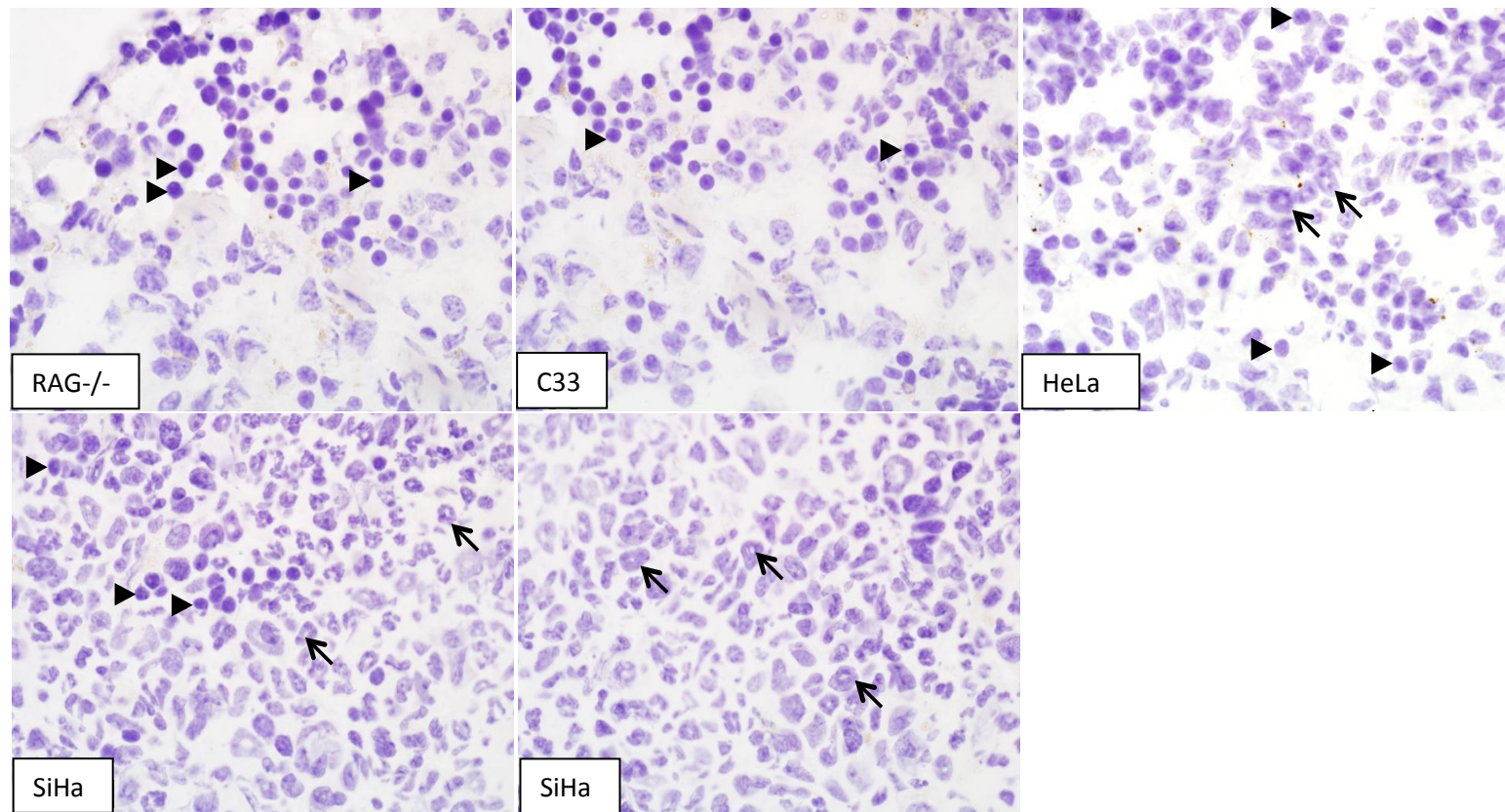
Figura 4 - Celularidade dos baços de animais RAG1^{-/-} naive e com tumores SiHa, HeLa e C33.



A: Após o processamento do baço foi contado o número total de células nucleadas com auxílio de câmara de Neubauer. Os valores representam média e desvio padrão de 4 animais. Os grupos foram testados por teste-T, onde $p < 0,05$. B: Fotografia dos tumores de C33 e de SiHa e dos baços dos animais RAG1^{-/-} naive e com tumores SiHa e C33.

Em cortes histológicos dos baços, foi possível observar uma mudança nos tipos celulares que constituem o órgão dos animais com e sem tumor (Figura 5). Os baços do animal controle e do animal com tumor C33 possuíam predominantemente células mononucleares. Já no baço do animal com tumor SiHa ocorreu acúmulo de células com características morfológicas de células mieloderivadas supressoras (células com núcleo em forma de anel) o que também foi observado, em menor frequência, no baço do animal com tumor HeLa.

Figura 5 - Cortes histológicos de baços de animais RAG1^{-/-} naive e com tumores SiHa, HeLa e C33

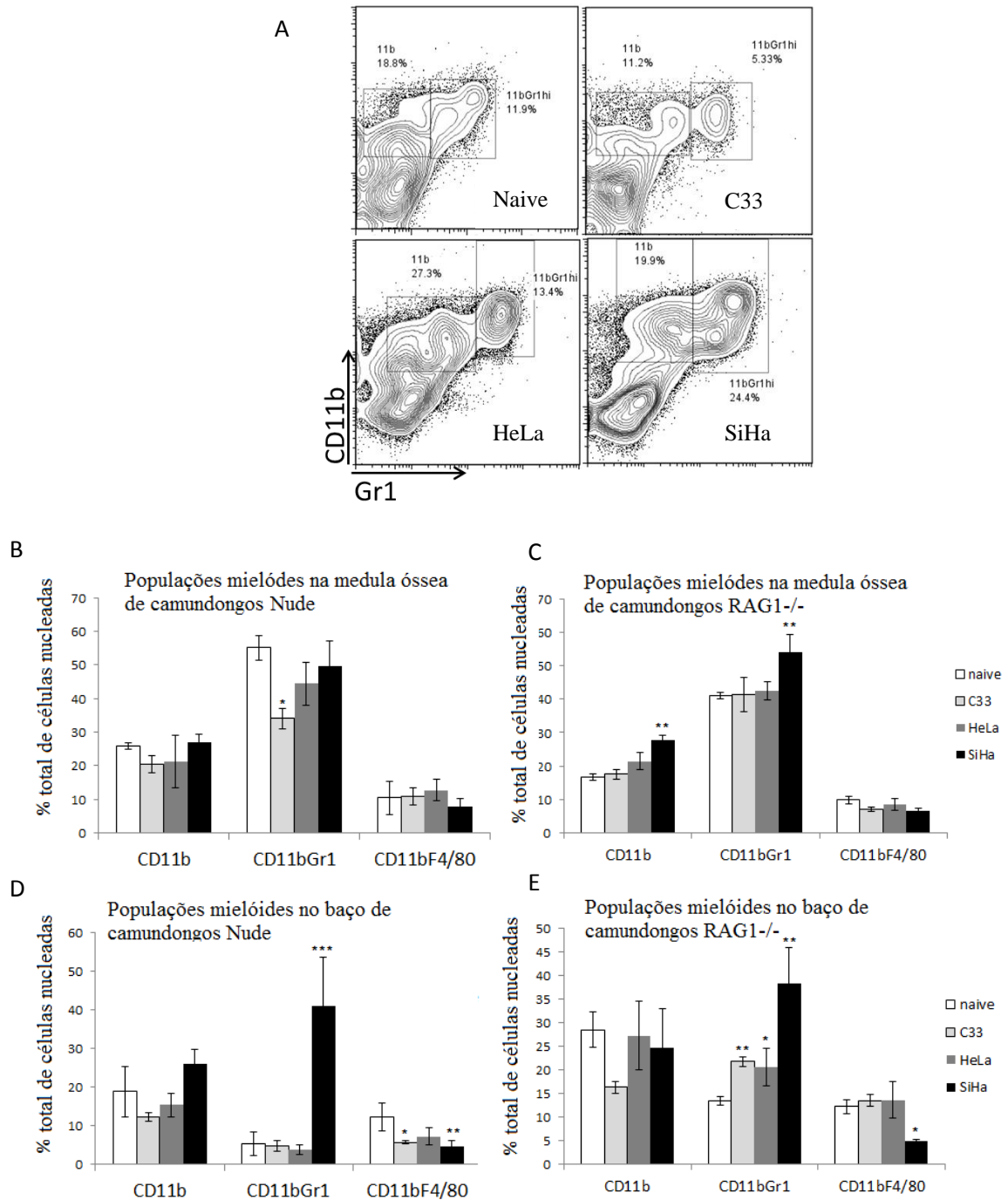


Porções dos baços foram congelados em TissueTek-OCT, seccionados em cortes de 5 μ m e corados com hematoxilina. Cabeça de flecha: células mononucleares; flechas: células mielóides.

Através da imunofenotipagem das células presentes no baço desses animais, foi possível observar aumento na frequência de células possivelmente mieloderivadas supressoras (CD11bGr1) nos animais RAG1^{-/-} (38,43% \pm 7,64) e Nude (40,88% \pm 12,62) com o tumor SiHa, como observado nos cortes histológicos. Os animais RAG1^{-/-} com os demais tumores também apresentam aumento significativo da população CD11bGr1 no baço (HeLa: 20,68% \pm 4, C33: 21,75% \pm 0,95) (Figura 6).

O aumento da frequência de CD11bGr1 nos animais com tumor SiHa também ocorreu na medula óssea dos animais RAG1^{-/-}, assim como aumento de monócitos (CD11b). Já animais Nude com tumor C33 apresentaram menor frequência de células CD11bGr1 neste compartimento (Figura 6).

Figura 6 - Frequência de células mielóides em animais imunodeficientes (RAG1^{-/-} e Nude) com tumores de HeLa, SiHa e C33.

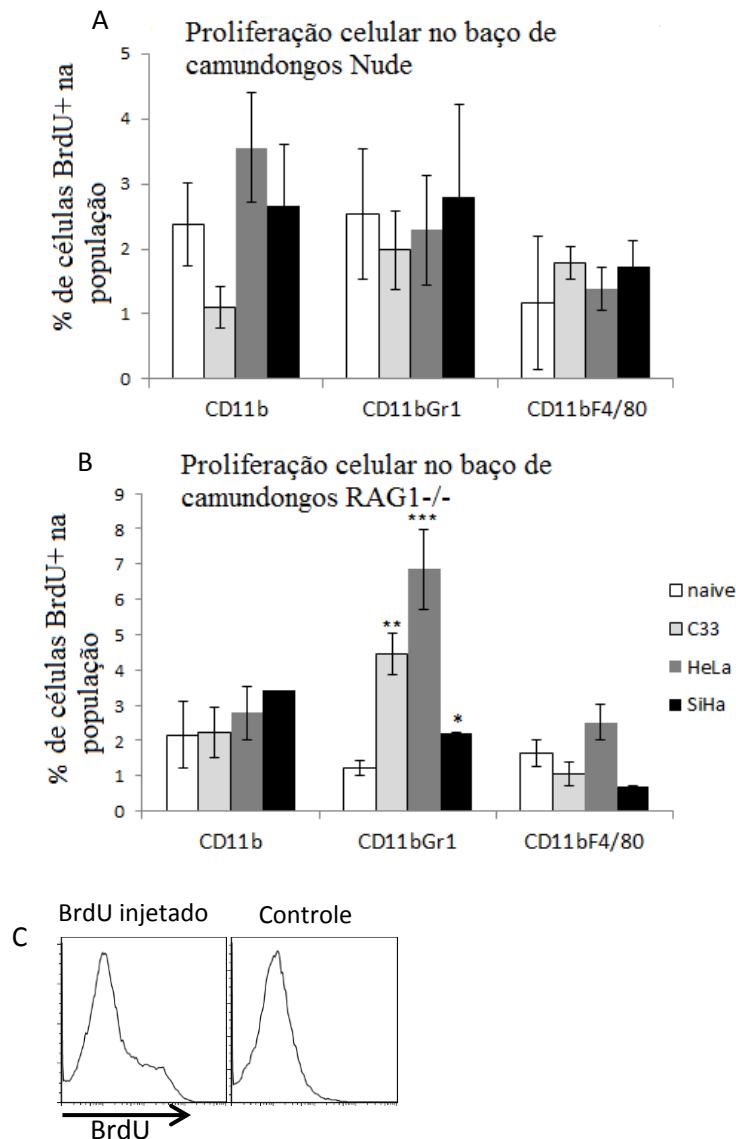


A: Dot plot obtido da citometria de fluxo de células de baço marcadas com CD11b e Gr1 de camundongos RAG1^{-/-} naive ou com tumores C33, HeLa e SiHa, conforme indicado (experimento representativo). B-C: frequência das populações de células nas medulas ósseas dos animais Nude (B) e RAG1^{-/-} (C). D-E: frequência das populações de células no baço dos animais Nude (D) e RAG1^{-/-} (E). Suspensões de células nucleadas foram marcadas com os anticorpos contra os marcadores indicados e analisadas por citometria de fluxo, onde pelo menos 30.000 eventos por amostra foram adquiridos. CD11b – monócitos; CD11bGr1 – granulócitos ou células mieloderivadas supressoras; CD11bF4/80 – macrófagos. De 3 a 8 animais foram avaliados nestes experimentos. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre o controle e o restante dos grupos experimentais, testado por teste-t dois a dois, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Dados referentes a média e desvio padrão.

O acúmulo de algumas populações de células na medula óssea e baço de camundongos com tumor reflete que a homeostase destas populações está alterada nestes animais. Em um momento qualquer, o número de células em uma dada população reflete o equilíbrio entre células sendo produzidas e células sendo eliminadas. Isso é particularmente dinâmico em populações hematopoiéticas. Nós nos perguntamos se, conforme descrito em outros trabalhos da literatura, e observado em nosso laboratório, com o modelo TC-1, os tumores HPV+ induziriam aumento de proliferação de células na medula óssea e baço dos camundongos aqui avaliados (Figura 7). Ao atingirem o volume tumoral esperado, os animais receberam 1mg de bromodeoxiuridina (BrdU) intraperitoneal e após uma hora foram sacrificados, seus órgãos coletados e processados. A 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) é um análogo de timidina que contém um átomo de Bromo no lugar do grupo metil e que é incorporada ao DNA de células em fase de síntese de DNA (fase S). Essa molécula pode ser detectada por um anticorpo específico, permitindo a identificação de células que estão na fase S do ciclo celular. O anticorpo anti-BrdU apresenta alta especificidade, sendo capaz de detectar a incorporação apenas em animais que receberam a BrdU (Figura 7D).

Os resultados apresentados na Figura 7 demonstram que em animais Nude não houve alteração significativa da incorporação de BrdU nas populações de baço, nas nossas condições experimentais, em nenhum dos grupos estudados. Por outro lado, em camundongos RAG1^{-/-}, nós observamos aumento significativo da incorporação de BrdU pela população CD11bGr1 em todos os animais com tumor (Figura 7B). Interessantemente, os camundongos com tumor SiHa apresentaram resposta menos robusta que os outros grupos, o que pode indicar, que a cinética de proliferação destas células é diferente, ou ainda que essas células apresentam meia-vida muito mais longa do que os esplenócitos dos camundongos com tumores HeLa e C33.

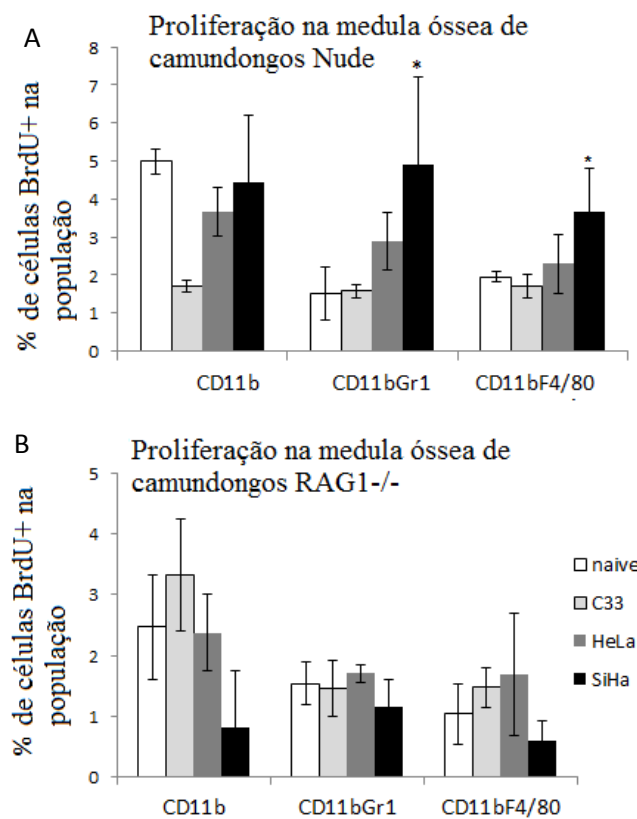
Figura 7 - Frequência de células em proliferação em baços de camundongos Nude (A) e RAG1^{-/-} (B) com tumores SiHa, HeLa e C33.



Os gráficos representam a frequência de células que incorporaram BrdU por 1 hora antes da eutanásia dos animais. Os baços foram processados e as suspensões de células nucleadas foram marcadas com anticorpos contra proteínas de superfície seguidos da detecção de BrdU utilizando o kit Flow Cytometry BrdU kit (BD Biosciences, Carlsbad, CA). Pelo menos 30.000 eventos foram adquiridos num FACSCalibur (BD Biosciences, San Diego, CA). Os asteriscos indicam populações com incorporação de BrdU significativamente diferente dos animais controle do mesmo grupo, testado por teste-t, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Dados referentes a média e desvio padrão. CD11b: monócitos, CD11bGr1: granulócitos ou células mieloderivadas supressoras, CD11bF4/80: macrófagos. C: Controle de detecção de BrdU em camundongo com tumor HeLa injetado ou não com BrdU (controle). Nota-se que em camundongos não injetados com BrdU, não há nenhuma marcação com o anticorpo.

Na medula óssea de camundongos Nude houve proliferação de macrófagos e de células CD11bGr1 em camundongos com tumores SiHa, enquanto nos animais RAG1^{-/-}, não observamos diferenças de proliferação das populações avaliadas entre os animais com tumores e os animais controles (Figura 8).

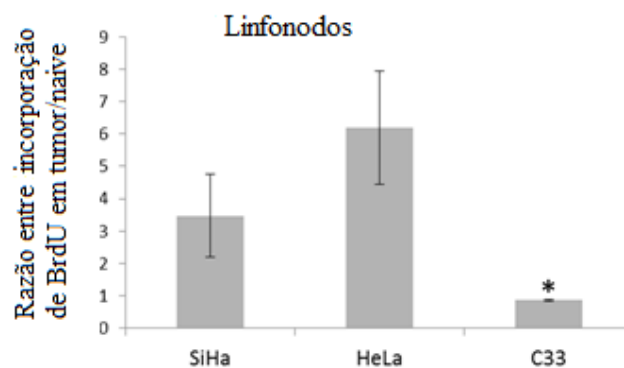
Figura 8 - Frequência de proliferação de células mielóides em medula óssea de camundongos Nude (A) e RAG1^{-/-} (B) com tumores gerados por injeção com cada uma das linhagens celulares indicadas.



Os gráficos representam a frequência de células que incorporaram BrdU por 1 hora antes da eutanásia dos animais. A seguir, as medulas ósseas foram processadas e as suspensões de células nucleadas foram marcadas com anticorpos contra proteínas de superfície seguidos da detecção de BrdU utilizando o kit Flow Cytometry BrdU kit (BD Biosciences, Carlsbad, CA). Pelo menos 30.000 eventos foram adquiridos num FACSCalibur (BD Biosciences, San Diego, CA). Os asteriscos indicam populações com incorporação de BrdU significativamente diferente dos animais controle do mesmo grupo, testado por teste-t, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Dados referentes a média e desvio padrão. CD11b: monócitos, CD11bGr1: células progenitoras de linhagens mielóides, granulócitos e células maduras em circulação pela medula, CD11bF4/80: macrófagos.

A frequência e a proliferação de linfócitos B também foi analisada nos órgãos linfóides dos animais Nude onde observamos que os linfonodos drenantes do tumor encontravam-se aumentados e com isto, analisamos as populações mielóides e os linfócitos B. As populações mielóides não apresentaram diferenças significativas de frequência e de proliferação de células em relação aos camundongos controle. Por outro lado, os animais com tumores positivos para HPV apresentaram maior proliferação de células B quando comparados com animais injetados com a linhagem C33, negativa para HPV, nos linfonodos (Figura 9).

Figura 9 - Frequência de proliferação de linfócitos B em linfonodos de camundongos Nude com tumores SiHa, HeLa e C33.



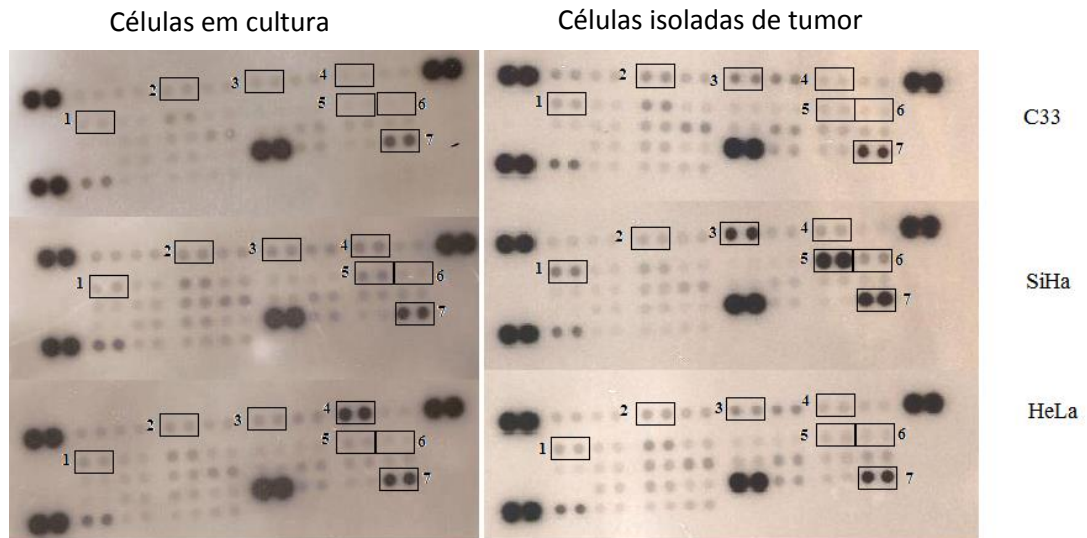
Células foram marcadas metabolicamente por 1 hora com BrdU antes da eutanásia dos animais. A seguir, os linfonodos foram processados e as suspensões de células nucleadas foram marcadas com anticorpos contra proteínas de superfície seguidos da detecção de BrdU utilizando o kit Flow Cytometry BrdU kit (BD Biosciences, Carlsbad, CA). Pelo menos 30.000 eventos foram adquiridos num FACSCalibur (BD Biosciences, San Diego, CA). Dados apresentados como razão de incorporação de BrdU entre animais com os tumores indicados e animais naive. Os asteriscos indicam populações com incorporação de BrdU significativamente diferente das outras amostras do mesmo grupo, testado por teste-t, * $p < 0,05$. Dados referentes a média e desvio padrão. Linfócitos B foram definidos como CD19+MHC-II+.

Os resultados apresentados acima indicam que tumores positivos para HPV são capazes de induzir proliferação de algumas populações mielóides e de linfócitos B em tecidos linfóides do hospedeiro.

4.3 Fatores inflamatórios, de crescimento e imunomoduladores em células tumorais e tumor

Para identificar os possíveis fatores produzidos pelos tumores e promotores do recrutamento e proliferação de leucócitos, nós utilizamos uma plataforma que permite a identificação simultânea de diversos fatores expressos ou presentes nas células tumorais. Deste modo, foram avaliados os fatores expressos primeiramente pelas células em cultura e pelas mesmas após isolamento do tumor crescido em animais. Isso permite avaliar os fatores expressos inicialmente pelas células tumorais em cultura sem qualquer estímulo e posteriormente pelas mesmas após exposição ao microambiente tumoral. Apesar de possuímos resultado de somente um experimento a partir das células isoladas de tumores, podemos observar que o perfil de citocinas e fatores inflamatórios é diferente em células cultivadas *in vitro* e isoladas do tumor (*ex vivo*) (Figura 10). Nós observamos também diferenças entre fatores expressos nas três diferentes linhagens celulares utilizadas neste estudo. Importante notar, que enquanto podemos afirmar que todas as moléculas detectadas a partir de culturas de células foram expressas pelas células em questão, isso pode não ser verdade para os lisados de células que foram isoladas de tumores. É possível, em alguns casos, provável, que alguns fatores estejam depositados nas células tumorais e presentes, portanto, no lisado celular.

Figura 10 - Perfil de expressão de citocinas e moléculas inflamatórias das células SiHa, HeLa e C33.

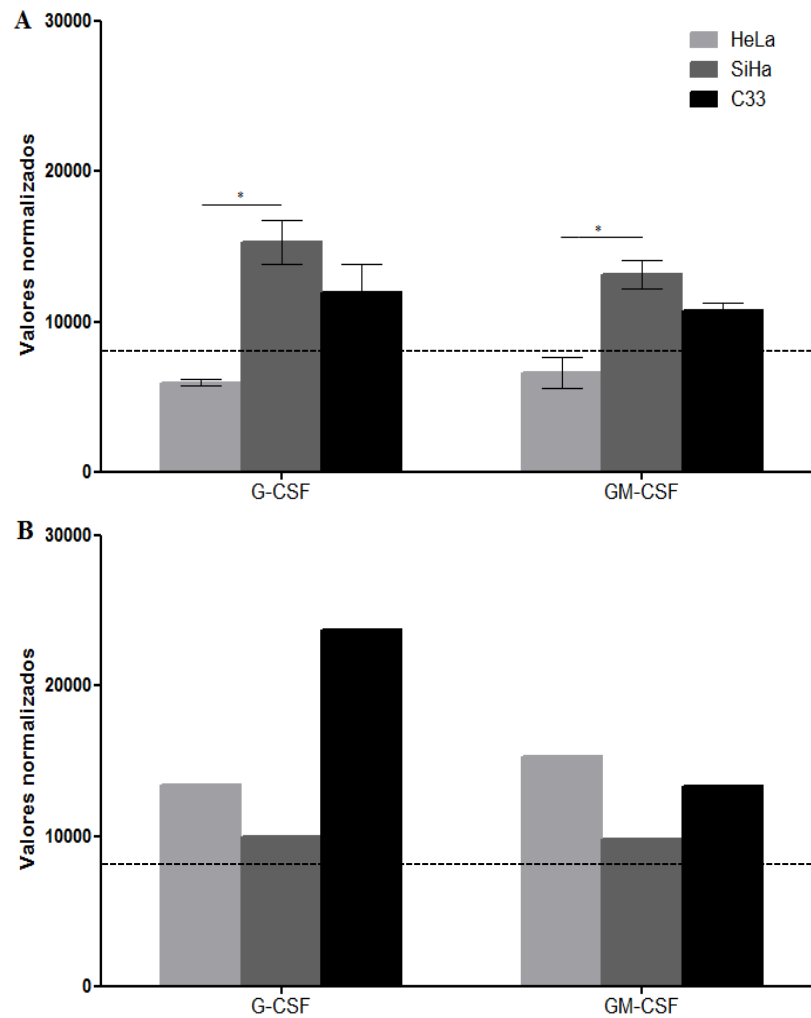


Autorradiogramas representativos de um experimento com lisado de células *in vitro* e experimento com lisado de células *ex vivo*. Filme da esquerda: células em cultura; filme da direita: células isoladas de tumores de animais. Utilizamos 100 µg dos lisados de cada linhagem foram utilizadas no *Human Cytokine Array Kit* (R&D Systems). Retângulos e números indicam duplicadas de *spots* referentes a: 1- IL-1 α , 2- G-CSF, 3- CXCL1, 4- sICAM, 5- IL-6, 6- IL-8, 7- Serpina E1

Nós dividimos os resultados abaixo em grupos de moléculas segundo sua atividade biológica para facilitar a descrição e entendimento dos mesmos.

Nas células em cultura, foi possível identificar diferenças de expressão de dois fatores de crescimento: G-CSF (*Granulocyte colony-stimulating fator*) e GM-CSF (*Granulocyte macrophage colony-stimulating fator*) (Figura 11), onde as linhagens celulares SiHa e C33 apresentaram uma expressão mais elevada dos dois fatores, com relação a linhagem celular HeLa. Já quando estas células são isoladas dos tumores, apenas a célula C33 apresenta maior expressão de G-CSF.

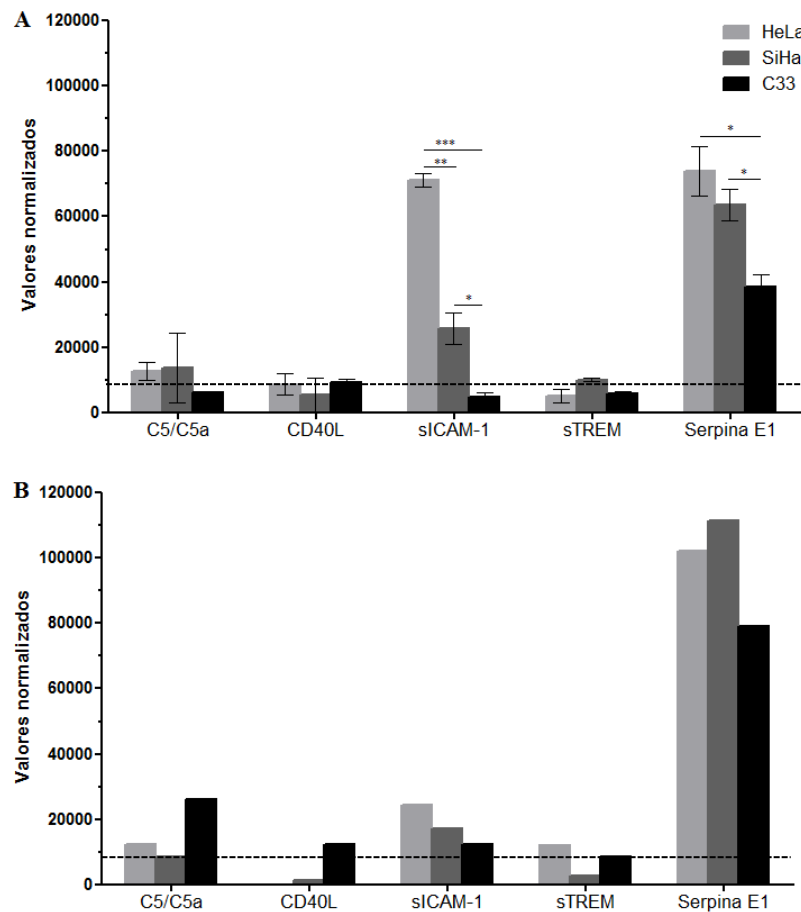
Figura 11 - Perfil de expressão de fatores de crescimento nas linhagens SiHa, HeLa e C33



A: células em cultura (dados de três experimentos independentes); B: células isoladas de tumores de animais (dados de um experimento). Utilizamos 100 μ g dos lisados de cada linhagem para incubação com membranas do *Human Cytokine Array Kit* (R&D Systems). Eixo y: valores absolutos de densitometria subtraídos de valores da média de seis *spots* referentes a *background*. Os dados foram testados por teste-t onde, $*p < 0,05$. Dados referentes a média e erro padrão da média. A linha que cruza as barras no valor 8000 é o limite de detecção que nós adotamos para estes experimentos em valor 10% maior que a média do *background*.

Com relação a diferentes fatores pró-inflamatórios (Figura 12), observou-se uma elevada produção de sICAM pelas células positivas para HPV, sendo que a célula HeLa ainda demonstrou maiores níveis que a célula SiHa. Nas células *ex vivo*, nós observamos uma redução da expressão de sICAM em todas as linhagens celulares. Outro fator mais expresso pelas células positivas para HPV, apesar de presente em todas as linhagens, é a Serpina E1, que é mantida nas células isoladas de tumores. A expressão de outros fatores pró-inflamatórios nestes experimentos ficou abaixo do valor que nós consideramos detectável (10% acima da média do background do autorradiograma).

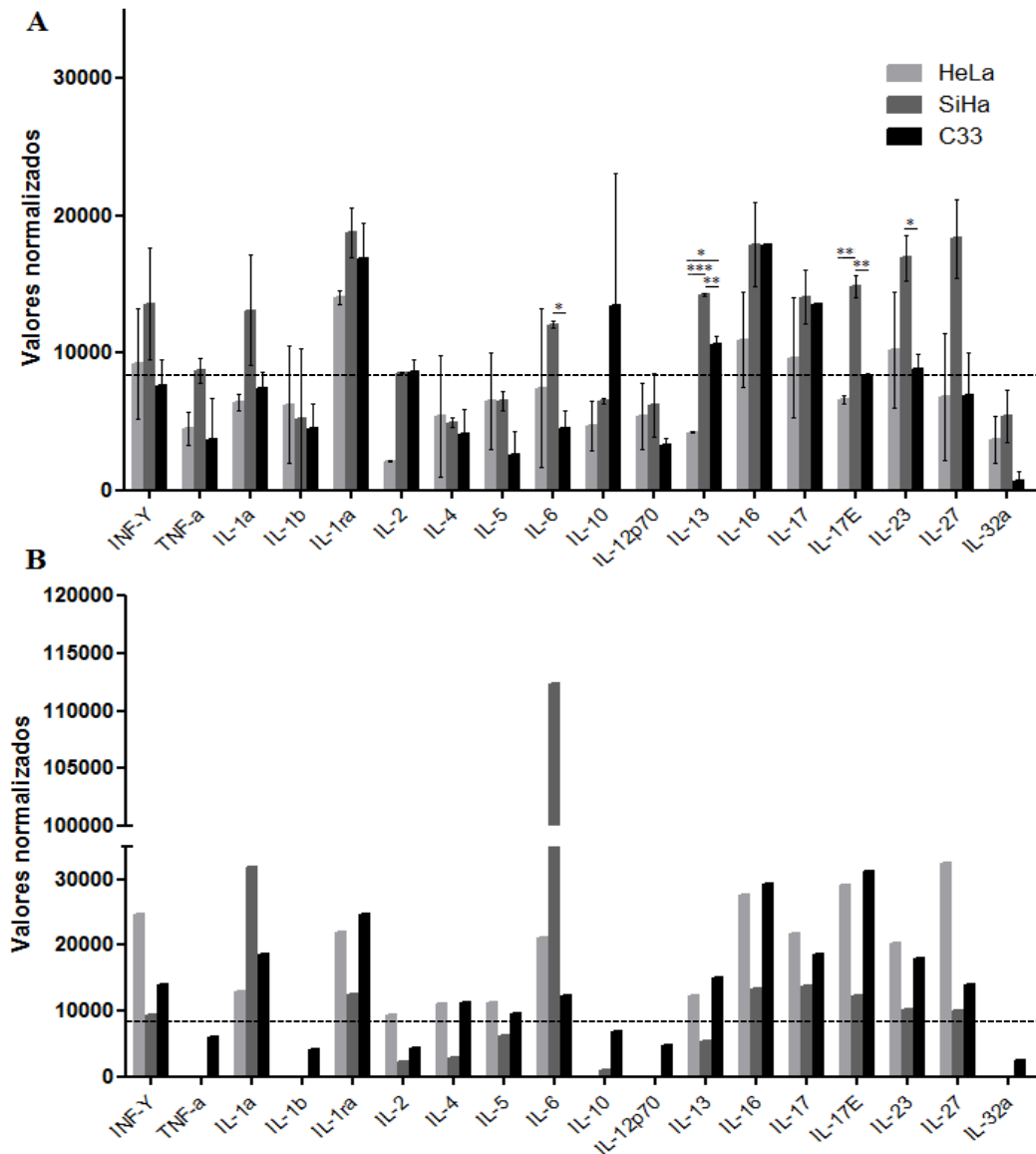
Figura 12 - Perfil de expressão de fatores pró-inflamatórios nas linhagens SiHa, HeLa e C33.



A: células em cultura (dados de três experimentos independentes); B: células isoladas de tumores de animais (dados de um experimento). Utilizamos 100 μ g dos lisados de cada linhagem para incubação com membranas do *Human Cytokine Array Kit* (R&D Systems). Eixo y: valores absolutos de densitometria subtraídos de valores da média de cinco *spots* referentes a *background*. Os dados foram testados por teste-t onde, * $p > 0,05$; ** $p > 0,01$; *** $p > 0,001$. Dados referentes a média e erro padrão da média. A linha que cruza as barras no valor 8000 é o limite de detecção que nós adotamos para estes experimentos em valor 10% maior que a média do *background*.

Quanto a expressão de citocinas (Figura 13) percebe-se que a linhagem SiHa apresentou um padrão misto de expressão de citocinas com diferença significativa de expressão de IL-6, IL-13, IL-17E e IL23. IL-16 foi expressa tanto por células SiHa, quanto C33, *in vitro*. Curiosamente, uma série destas citocinas mostrou perfil oposto nas células isoladas dos tumores, onde a expressão foi maior nas linhagens HeLa e C33 do que SiHa. Interessantemente, todas as linhagens analisadas apresentaram alta expressão de IL-1ra, tanto *in vitro* como *ex vivo*. Já nas células isoladas de tumores, o que chama atenção é a alta expressão de IL-6 por células SiHa, além disso como este é único, pouco podemos concluir a partir deste.

Figura 13 - Perfil de expressão de citocinas nas linhagens SiHa, HeLa e C33.

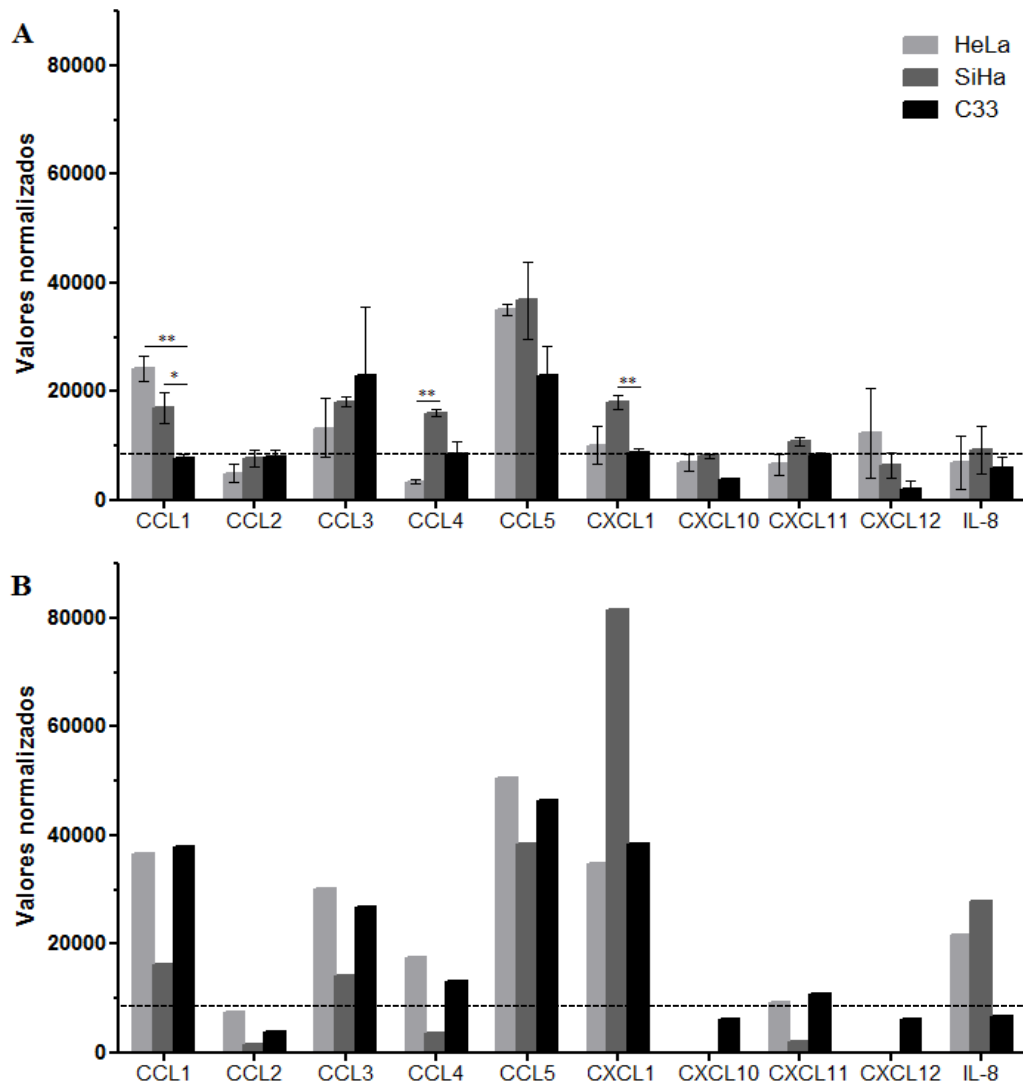


A: células em cultura (dados de três experimentos independentes); B: células isoladas de tumores de animais (dados de um experimento). Utilizamos 100 μ g dos lisados de cada linhagem para incubação com membranas do *Human Cytokine Array Kit* (R&D Systems). Eixo y: valores absolutos de densitometria subtraídos de valores da média de cinco *spots* referentes a *background*. Os dados foram testados por teste-t onde, * $p > 0,05$; ** $p > 0,01$; *** $p > 0,001$. Dados referentes a média e erro padrão da média. A linha que cruza as barras no valor 8000 é o limite de detecção que nós adotamos para estes experimentos em valor 10% maior que a média do *background*.

O padrão de expressão de quimiocinas (Figura 14), assim como os demais fatores analisados, também apresentou diferenças entre as duas condições. Nas células em cultura, observamos maior expressão de CCL-1 pelas linhagens positivas para HPV, enquanto a linhagem SiHa expressou mais CCL-4 e CXCL-1. Quando as células foram isoladas de

tumores, o resultado que chamou atenção foi a expressão de CXCL-1 por células SiHa, IL-8 por células HeLa e SiHa, e CCL5 por todas as linhagens testadas.

Figura 14 - Perfil de expressão de quimiocinas nas linhagens SiHa, HeLa e C33.



A: células em cultura (dados de três experimentos independentes); B: células isoladas de tumores de animais (dados de um experimento). Utilizamos 100 µg dos lisados de cada linhagem para incubação com membranas do *Human Cytokine Array Kit* (R&D Systems). Eixo y: valores absolutos de densitometria subtraídos de valores da média de cinco *spots* referentes a *background*. Os dados foram testados por teste-t onde, * $p > 0,05$; ** $p > 0,01$; *** $p > 0,001$. Dados referentes a média e erro padrão da média. A linha que cruza as barras no valor 8000 é o limite de detecção que nós adotamos para estes experimentos em valor 10% maior que a média do *background*.

A análise do perfil de fatores expressos pelas células tumorais demonstra que as mesmas expressam fatores capazes de modular e atrair células do sistema imune. Alguns destes fatores estão relacionados parecem relacionados especificamente à linhagem positiva para HPV16.

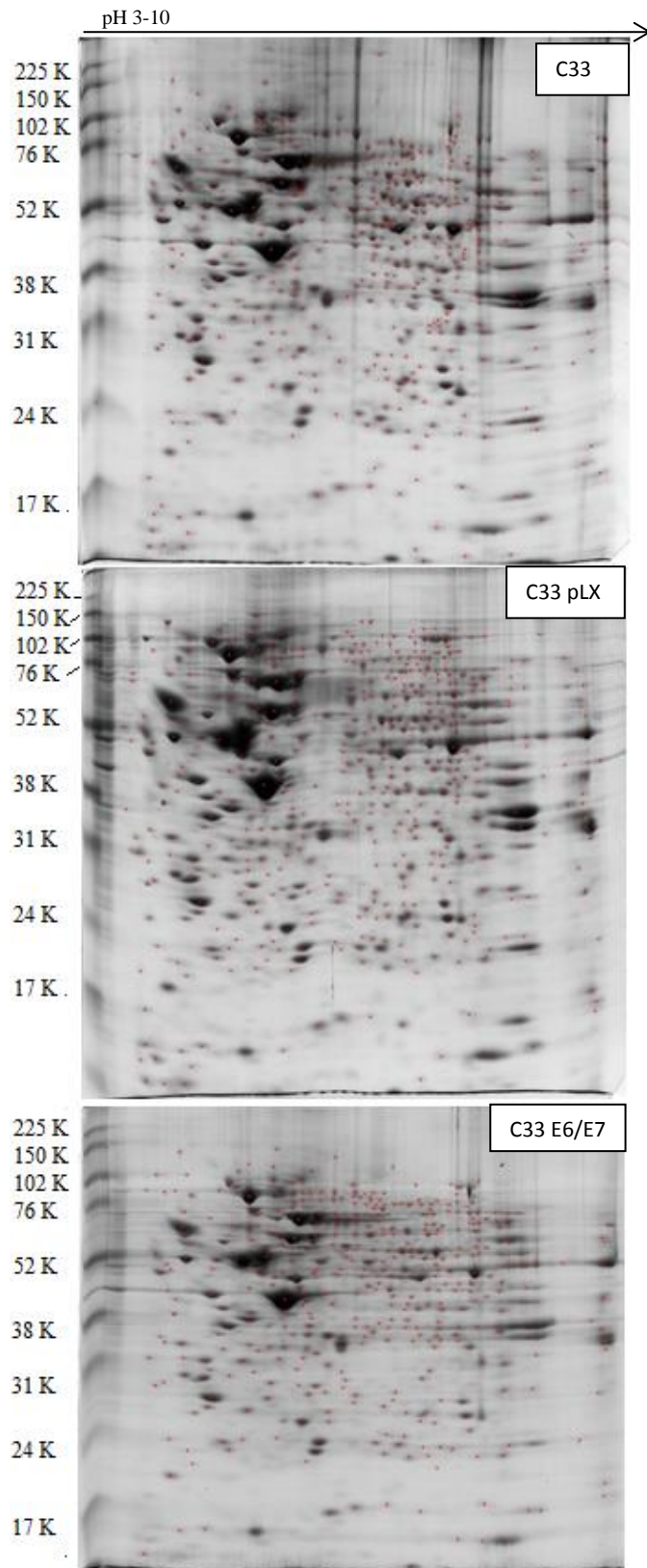
4.4 Eletroforese 2D

Para a identificação detalhada de proteínas envolvidas na patogênese do HPV, nós fracionamos lisados de células C33 transduzidas ou não com oncogenes de HPV16 por eletroforese 2D, o que permitiu uma maior separação das proteínas tornando possível a detecção de proteínas diferencialmente expressas. Sendo assim, a célula C33, transduzida com um vetor retroviral contendo os dois principais oncogenes de HPV16 (E6 e E7), antes negativa para HPV, agora potencialmente mimetiza as células de câncer cervical associado ao HPV, que possuem o genoma integrado do vírus com estas duas oncoproteínas. Como o vetor retroviral pode acarretar em respostas antivirais, o controle da transfecção, a célula contendo o vetor vazio (C33 pLX) também foi utilizado neste experimento.

Para estes experimentos nós utilizamos 800 µg de lisados protéicos de cada linhagem celular para a focalização isoeétrica, momento de separação por ponto isoeétrico, seguido de fracionamento das proteínas focalizadas por massa molecular. Deste modo, foram gerados nove géis, a partir de três lisados independentes de cada linhagem. As proteínas ficaram bem distribuídas ao longo da faixa de pH utilizada (3-10) não havendo necessidade da utilização de uma faixa mais restrita de pH. As bandas ficaram bem definidas, exceto mais próximo ao pH básico onde realmente a focalização é prejudicada (LUCHE et al., 2004) (Figura 15).

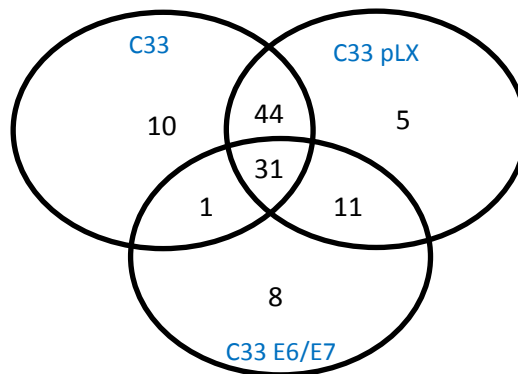
Após a identificação e ajuste das bandas de cada gel, os mesmos foram comparados a fim de identificar as mesmas bandas em cada triplicata e entre as classes (compostas pelas diferentes linhagens celulares). A partir desta etapa foi possível identificar 110 bandas de interesse, ou seja, bandas cujos valores de densitometria apresentaram significância de 0,05. Dentre estas bandas, 31 estão presentes em todos os géis, algumas são exclusivas em cada linhagem e outras estão ausentes em alguma das linhagens (Figura 16).

Figura 15 - Eletroforese bidimensional das linhagens C33, C33pLX e C33E6/E7.



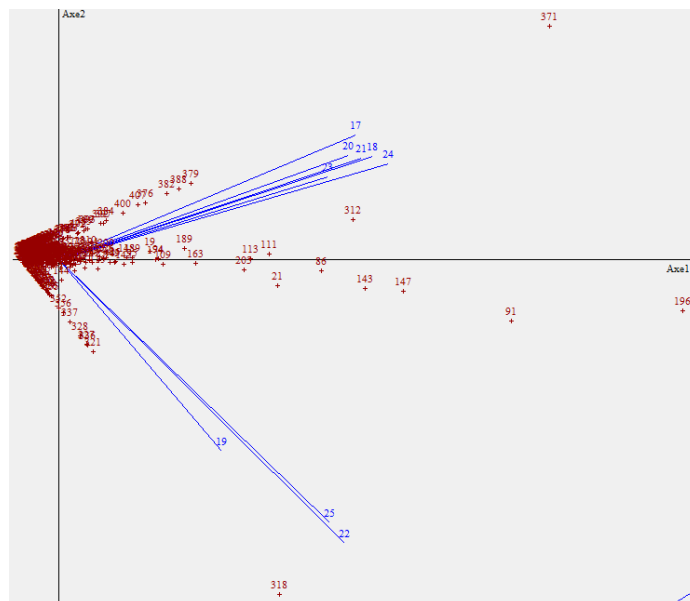
Utilizou-se 800 μ g de lisado das diferentes linhagens para a focalização isoelétrica em fitas de pH 3-10 NL (Immobilized pH Gradient Strips – GE Healthcare) e posterior separação eletroforética em gel de poliacrilamida de 12,5%. Valores indicam os pesos moleculares (KDa) do padrão utilizado (Full-Range Rainbow Molecular Weight Markers – GE HealthCare). Pontos vermelhos sinalizam as bandas identificadas em cada gel. Imagens correspondentes a um gel representativo de cada linhagem.

Figura 16 - Representação esquemática das bandas diferencialmente expressos nas linhagens C33, C33 pLX e C33 E6/E7.



No geral observa-se que os géis das linhagens C33 e C33 pLX são mais semelhantes entre si e diferem igualmente dos géis da linhagem C33 E6/E7. Através da análise fatorial, que agrupa o valor de todas as bandas de todos os géis e faz uma correlação entre a abundância de proteínas e a variabilidade entre os grupos, é possível visualizar esta diferença (Figura 17). No momento, todas as amostras já foram processadas e aguardam a identificação das proteínas por espectrometria de massa.

Figura 17 - Análise fatorial das bandas dos géis das linhagens C33, C33 pLX e C33 E6/E7.



Linhas azuis representativas das médias de todas as bandas detectados em cada gel. 17, 20 e 23 - géis da linhagem C33; 18, 21 e 25 - géis da linhagem C33 pLX; 19, 22 e 25 - géis da linhagem C33 E6/E7. Pontos vermelhos representam cada banda identificada.

5 DISCUSSÃO

O câncer cervical é um importante problema de saúde pública, uma vez que os países em desenvolvimentos são os mais afetados (GLOBOCAN, 2008). Estratégias de prevenção, como vacinação profilática da população, ainda são pouco efetivas devido ao seu elevado custo. Portanto, os estudos da imunobiologia do câncer cervical são importantes ferramentas para buscar uma melhor compreensão da doença, para assim, permitir o desenvolvimento de melhores terapias e tratamentos. Deste modo, este trabalho visou estudar interações entre o hospedeiro com células derivadas de tumores do colo uterino e ainda identificar fatores que tenham papel nessas interações.

5.1 Infiltrado inflamatório e proliferação celular

Células mielóides possuem papel bem estabelecido no microambiente tumoral. Especificamente no caso de tumores do colo uterino, dados da literatura têm demonstrado o aumento do número de macrófagos proporcionalmente à progressão da lesão (HAMMES et al., 2007; KOBAYASHI et al., 2008; MAZIBRADA et al., 2008). Esses macrófagos não expressam iNOS (KOBAYASHI et al., 2008) podendo ser macrófagos alternativamente ativados (GORDON; MARTINEZ, 2010). Dados prévios em modelos animais, tanto de nosso laboratório como de outros, mostram que tumores associados ao HPV16 recrutam macrófagos que tem características supressoras da resposta imune, sendo capazes de induzir diferenciação de células T reguladoras (LEPIQUE et al., 2009). O recrutamento destas células é dependente da expressão de CCR2 (PAHLER et al., 2008), e na ausência de macrófagos há comprometimento da angiogênese nos tumores. Esse efeito é transitório, uma vez que células polimorfonucleares podem substituir os macrófagos tumorais, desempenhando o mesmo papel em relação à angiogênese. Nos camundongos com tumores associados ao HPV16, observa-se aumento de populações de células mielóides no baço (GABRILOVICH et al., 2001; LEPIQUE et al., 2009), sendo que as mesmas são capazes de inibir a resposta antitumoral. No trabalho aqui apresentado, nós fomos um passo adiante e demonstramos que HPV na célula tumoral é importante tanto para o acúmulo de células em órgãos linfóides periféricos, como para o recrutamento de células para o tumor. Claramente, os tumores positivos para HPV promovem aumento de proliferação de algumas populações mielóides, sendo que em camundongos RAG1^{-/-} esse efeito é observado principalmente no baço e em camundongos

Nude principalmente na medula óssea. É possível que a presença de linfócitos B nos camundongos Nude tenha um efeito modulador de alguns dos efeitos causados pelos tumores. Interessante notar também, que os resultados de proliferação de células mielóides não espelham bem a celularidade observada no baço dos camundongos com tumor. Por exemplo, há menor incorporação de BrdU em camundongos com tumores SiHa do que nos camundongos com tumores HeLa, mas a celularidade do baço é bem maior nos hospedeiros de tumores SiHa. Isso indica que proliferação pode ser um fator importante, mas não único, para acúmulo de células mielóides nos animais com esses tumores. É possível que as células que nós estamos investigando tenham meia-vida mais longa em algumas condições, e mais ainda que progenitores ou células menos diferenciadas, que não foram detectadas pelos anticorpos que nós utilizamos neste estudo, também estejam proliferando e posteriormente se diferenciando nas populações que observamos acumuladas nos órgãos linfóides dos animais em questão (Figura 18).

Figura 18 - Possíveis mecanismos de interferência disparados por tumores para levar ao acúmulo de células mielóides no hospedeiro.



Esses mecanismos poderiam ocorrer separadamente ou em conjunto. Poderia haver aumento da proliferação de células progenitoras, ou como descrito nesse trabalho aumento da proliferação de células mielóides, bem como poderia haver aumento da sobrevivência das células, indicado por redução em morte celular.

Novos estudos serão necessários para identificar os outros mecanismos que estão levando ao acúmulo de células mielóides nos hospedeiros destes tumores. Devido a resultados anteriores do laboratório e morfologia das células mielóides observadas neste estudo, nós estamos trabalhando com a hipótese de que as células mielóides destes animais são supressoras da resposta imune. Para testar esta hipótese, temos experimentos em andamento que nos indicarão se de fato, há modulação das respostas imunes nestes animais. Dados anteriores do nosso laboratório mostraram que linfócitos T naive transplantados em

camundongos RAG1^{-/-} com tumores TC-1, geram três vezes mais células T reguladoras, do que quando transplantados em camundongos RAG1^{-/-} naive (LEPIQUE, manuscrito em preparação). Experimentos semelhantes estão sendo realizados com os modelos explorados nesse trabalho.

Além das linhagens mielóides, nós observamos aumento de proliferação de linfócitos B em linfonodos de camundongos Nude com tumores HPV positivos. O papel destes linfócitos ainda não foi estudado, mas sabemos que em animais com tumores TC-1, há expansão de linfócitos B, principalmente na medula, e que esses linfócitos apresentam expressão reduzida de CD19 e MHC-II. Porém são funcionais e podem ser estimulados *ex vivo* (ROSSETTI, manuscrito em preparação).

5.2 Fatores produzidos em células tumorais e tumor

Fatores secretados pelo microambiente tumoral estão associados à persistência e à progressão tumoral. Dentre estes fatores, as citocinas e quimiocinas, pequenas moléculas solúveis, estão envolvidas na modulação e recrutamento de leucócitos e em outros processos tumorais, conforme já abordado neste trabalho.

O uso da plataforma do *Human cytokine array* permitiu uma ampla identificação de fatores proteicos produzidos pelas células tumorais que sugerem possíveis fatores envolvidos no controle das respostas imunes, incluindo homeostase de populações linfóides e mielóides, como interessa a esse projeto. Ainda, utilizando células em cultura sem qualquer estímulo e as mesmas isoladas de tumores crescidos em animais, podemos observar que não somente as células tumorais exercem papel na modulação como também o microambiente tumoral modifica o perfil de expressão das células tumorais. O perfil de expressão de algumas moléculas pelas células tumorais é alterado pela exposição ao microambiente tumoral, mostrando que a comunicação entre as células tumorais e o microambiente é bilateral. Por outro, lado, é possível que alguns dos fatores que eram expressos *in vitro* e que foram inibidos *in vivo* tenham, até certo ponto, auxiliado no estabelecimento do tumor no hospedeiro. Além disso, *in vitro*, essas células foram cultivadas em meio com 10% de soro fetal bovino, o que também pode ter influenciado a expressão gênica das mesmas de forma diferente do que no organismo.

O estudo de fatores de crescimento, moléculas pró-inflamatórias e citocinas produzidas pelas células tumorais, assim como o estudo de proteômica, foram tentativas de

identificar possíveis fatores associados aos fenômenos que estamos vendo em nosso modelo de estudo. Por exemplo, no trabalho de Pahler e colaboradores (PAHLER et al., 2008), o recrutamento de macrófagos foi inibido em camundongos CCR2^{-/-}, como nós também conseguimos depletar macrófagos e inibir o crescimento tumoral utilizando lipossomos com clodronato (LEPIQUE et al., 2009). Porém esses métodos são impossíveis ou difíceis de aplicar na clínica. Por outro lado, a utilização de anticorpos como agentes farmacológicos tem sido amplamente utilizada para tratamento de diversos tipos de doenças em humanos. Com isso, a identificação de fatores que possam levar à proliferação, diferenciação ou acúmulo de células mielóides em portadores de tumores pode ter uma aplicação clínica relevante.

Infelizmente, devido ao longo período que as linhagens tumorais utilizadas nesse estudo demoram a formar tumores em camundongos, parte do estudo está bastante atrasada. Porém, como demonstrado acima, uma citocina claramente expressa por células SiHa (HPV 16 positivas), no ambiente tumoral é IL-6. Esse dado tem sido demonstrado em diversos estudos, mostrando que os nossos dados estão dentro do esperado. Esta citocina é pró-inflamatória e, juntamente com PGE₂, tem sido implicada na indução de fenótipo supressor em células dendríticas diferenciadas na presença de células tumorais (HEUSINKVELD et al., 2011). Além disso, a expressão de IL-6 em câncer cervical foi associada à severidade da doença (TJIONG et al., 1999) e possivelmente esteja relacionado com a expansão do baço em animais com tumores SiHa (JENKINS et al., 2007).

Outras moléculas também são mais expressas por células SiHa do que pelas outras linhagens: CXCL1, IL-17E, IL-23, IL-27, as últimas três apenas expressas *in vitro*. Dentre estas citocinas, IL-13, IL-17E são associadas a respostas Th₂, e IL-23 à indução de angiogênese. Algumas moléculas foram expressas por HeLa e SiHa, ou seja, pelas linhagens HPV positivas: IL-13, IL-16, CCL1, CCL5 (mais em SiHa e HeLa do que em C33), IL-8 (*in vivo*). A quimiocina CCL1, que atua via CCR8 no recrutamento de células T reguladoras (HOELZINGER et al., 2010) e de monócitos (MILLER; KRANGEL, 1992) possui maior expressão nas células *in vitro* positivas para HPV, sendo possivelmente necessária para atrair monócitos no início da tumorigênese. Nas células isoladas a partir do tumor, outras quimiocinas passam a ser mais expressas pelas células positivas para HPV como a IL-8 e a CXCL1. Estas duas quimiocinas tem papel redundante por ambas estarem envolvidas na atração de neutrófilos, além de angiogênese, sobrevivência e evasão tumoral (VANDERCAPPELLEN; van DAMME; STRUYF, 2008; WAUGH; WILSON, 2008). Em um modelo animal de câncer cervical semelhante ao nosso, foi demonstrado que o bloqueio

desta quimiocina promove um menor crescimento tumoral, diminuição de metástase e maior sobrevivência do hospedeiro (WU et al., 2012). Deste modo, conjuntamente estas duas quimiocinas parecem estar contribuindo para a progressão tumoral de tumores positivos para HPV. Recentemente, associou-se a expressão de CXCL1 ao recrutamento de células polimorfonucleares, e também ao recrutamento de células mieloderivadas supressoras em tumores de mama (ACHARYYA et al., 2012). Interessantemente, CXCL1 é principalmente expresso por células da linhagem SiHa, que promovem aumento robusto de células CD11bGr1 no baço dos camundongos com esse tipo de tumor e que recrutam maior número desta população de células para o tumor.

IL-1ra é um antagonista do receptor de IL-1, e foi expresso consistentemente por todas as células tumorais no microambiente tumoral, enquanto que sua expressão não aparece nas células em cultura. Esse pode ser mais um mecanismo de evasão destes tumores, sendo que ele não parece ser dependente de HPV.

Quando em cultura, as células SiHa e C33 apresentaram maior expressão de G-CSF e GM-CSF que a linhagem HeLa. Em pacientes com câncer cervical que apresentam leucocitose, o fator de crescimento G-CSF parece apresentar uma forte correlação com o aumento de leucócitos no sangue (MABUCHI et al., 2011). Curiosamente, a linhagem C33 induz proliferação de células CD11bGr1 no baço de camundongos RAG1^{-/-}, onde também observamos aumento da frequência desta população. Por outro lado, a celularidade dos baços do camundongos RAG1^{-/-} com tumores C33 é a menor entre os três modelos tumorais utilizados. Isso nos remete à hipótese levantada na Figura 18, onde vários mecanismos devem estar contribuindo para os resultados observados neste trabalho.

Um dos fatores marcadamente expressos pelas células positivas para HPV, principalmente HeLa, é o sICAM-1. Esta molécula é capaz de atuar como um *counter-receptor* para a integrina de leucócitos, LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen*), ou seja, ao se ligar ao LFA-1 impede a ligação dos leucócitos ao endotélio via ICAM-1 expresso pelas células endoteliais. Deste modo, inibindo a adesão e a migração dos leucócitos pelo endotélio. O sICAM-1 encontra-se aumentado em diversos tipos de câncer, e sua função está associada a progressão tumoral e a evasão da resposta imune, por atuar inibindo a ligação de linfócitos T às células tumorais e bloquear a citotoxicidade mediada por células NK (WITKOWSKA; BORAWSKA, 2004). Outro fator que tem sua expressão mais elevada quando as células são positivas para HPV, é a Serpina E1, também conhecida como PAI-1 (*serine proteinase inhibitor*). Em diferentes tipos de tumor já foi observado o aumento deste

inibidor, sendo associado ao mal prognóstico por estar envolvido em funções pró-tumorais, como angiogênese e metástase (BINDER; MIHALY, 2008).

Em modelo de tumor associado a HPV, utilizando a linhagem celular murina TC-1, foi demonstrado que ocorre o recrutamento de macrófagos para o tumor via CCR2/CCL2 (PAHLER et al., 2008). Contudo, nos tumores derivados de câncer cervical humano, esta quimiocina não apresenta grande expressão sendo que possivelmente outras quimiocinas estejam envolvidas no recrutamento de células inflamatórias. Dados do nosso trabalho também demonstram que CCL2 é produzido por outras células tumorais e macrófagos tumorais. Porém, nos modelos utilizados neste estudo não observamos expressão de CCL2. É possível que outras citocinas estejam desempenhando o papel desta, como CCL7, CCL8, CCL12 ou CCL13. Esses são ligantes de menor afinidade a CCR2, e que infelizmente não estão presentes na plataforma que utilizamos para este estudo. Porém como discutido acima, outras quimiocinas capazes de recrutar células mielóides são expressas pelas células tumorais.

Além dos fatores aqui estudados, outros poderiam ter efeito sobre os fenômenos que estamos descrevendo, por exemplo, mediadores lipídicos, citocinas produzidas por outras células, e metabólitos produzidos e secretados pelo tumor, como lactato. Dados do nosso laboratório, mostram que os macrófagos que infiltram tumores TC-1 e SiHa (apesar das diferenças do sistema imunológico dos hospedeiros destas duas linhagens tumorais) são muito semelhantes. Esses macrófagos são, por exemplo, a fonte principal fonte de IL-10 nesses animais, sendo IL-10 uma citocina fundamental para a supressão das respostas imunes anti-tumorais (BOLPETTI et al., 2010).

Nossos resultados de expressão de citocinas em células tumorais nos indicam algumas moléculas que podem ter papel relevante na manutenção do ciclo de expansão e recrutamento de células mielóides para o tumor e supressão das respostas imunes antitumorais. Acreditamos que será relevante testar funcionalmente alguns destes fatores, por exemplo, CXCL1 tanto em modelos experimentais, como investigar se há expressão do mesmo em um painel de amostras de tumores de pacientes.

5.3 Eletroforese 2D

A proteômica é uma importante ferramenta que nos permite complementar os resultados obtidos pelo *Human cytokine array*, possibilitando a identificação de diversas proteínas envolvidas em variadas funções, como no metabolismo celular e até mesmo no escape imunológico. Deste modo, é possível a identificação de proteínas dependentes de HPV para assim, elaborar estratégias terapêuticas que auxiliem a quebrar os mecanismos de tolerância estabelecidos pelas células transformadas.

Os experimentos de eletroforese 2D ainda não estão totalmente concluídos, restando a análise dos peptídeos obtidos por espectrometria de massa. Porém a análise computacional indica que há diferenças na expressão de algumas proteínas nas três linhagens utilizadas e que os géis da célula C33 e da célula C33 pLX são mais semelhantes entre si. Indicando que o HPV está, de fato, alterando a expressão de proteínas na célula transduzida com seus oncogenes. Algumas proteínas com nível de expressão igual entre C33 e C33E6/E7 e expressão alterada em C33pLX podem refletir uma resposta ao vetor retroviral, que é inibida na linhagem transduzida com E6/E7. Além disso, C33E6/E7 apresenta diminuição na expressão de diversas proteínas comuns às duas outras linhagens, sugerindo que as oncoproteínas de HPV atuam inibindo a expressão de certas proteínas.

6 CONCLUSÕES

- Linhagens tumorais associadas ao HPV são mais eficientes para recrutar células de infiltrado inflamatório do que a linhagem tumoral controle, C33. As principais populações recrutadas foram de macrófagos e células CD11bGr1.
- Há aumento de celularidade no baço de camundongos com tumor, e aumento da frequência de algumas populações mielóides na medula e baço de camundongos com tumores. Esse fenômeno é mais robusto nos animais com tumor associado ao HPV16.
- O aumento de celularidade observado é devido, em parte, ao aumento de proliferação que foi detectado nos animais com tumores.
- Os efeitos dos tumores não foram restritos a células mielóides, em camundongos Nude, houve aumento da proliferação de linfócitos B em linfonodos de camundongos com tumores HeLa e SiHa.
- O perfil de expressão de citocinas das linhagens tumorais utilizadas é diferente *in vitro* e no microambiente tumoral, indicando que o mesmo é capaz de modular as células tumorais.
- Entre os fatores produzidos pelas linhagens tumorais utilizadas nós encontramos fatores de crescimento, quimiocinas com papel de atração de células mielóides, e citocinas pró-inflamatórias como IL-6, e anti-inflamatórias como IL-1ra.
- Estudos de proteômica indicam que há expressão diferencial de proteínas entre células C33 transduzidas com oncogenes de HPV16 e controles. Em breve teremos a identidade das proteínas diferencialmente expressas para estudos funcionais.

REFERÊNCIAS *

- ACHARYYA, S. et al. A CXCL1 paracrine network links cancer chemoresistance and metastasis. **Cell**, v. 150, n. 1, p. 165-178, 2012.
- ALCOCER-GONZÁLEZ, J. M. et al. *In vivo* expression of immunosuppressive cytokines in human papillomavirus-transformed cervical cancer cells. **Viral Immunology**, v. 19, n. 13, p. 481-491, 2006.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer Facts & Figures 2008**. Atlanta: American Cancer Society, 2010.
- ANTONSSON, A. et al. The human papillomavirus type 16 E7 protein binds human interferon regulatory factor-9 via a novel PEST domain required for transformation. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 26, n. 7, p. 455-461, 2006.
- ASHRAFI, G. H. et al. E5 protein of human papillomavirus type 16 selectively downregulates surface HLA class I. **International Journal of Cancer**, v. 113, n. 2, p. 276-283, 2005.
- BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **Lancet**, v. 357, n. 9255, p. 539-545, 2001.
- BERNARD, H. U. et al. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. **Virology**, v. 401, n. 1, p. 70-79, 2010.
- BINDER, B. R.; MIHALY, J. The plasminogen activator inhibitor “paradox” in cancer. **Immunology Letters**, v. 118, n. 2, p. 116-124, 2008.
- BOCCARDO, E. HPV-mediated genome instability: at the roots of cervical carcinogenesis. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 128, n. 1-3, p. 57-65, 2010.
- BOCCARDO, E.; LEPIQUE, A. P.; VILLA, L. L. The role of inflammation in HPV carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 11, p. 1905-1912, 2010.
- BOLPETTI, A. et al. Interleukin-10 production by tumor infiltrating macrophages plays a role in Human Papillomavirus 16 tumor growth. **BMC immunology**, v. 11, p. 11-27, 2010.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 7, n.72, p. 248-254, 1976.
- CANDIANO, G. et al. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, v. 25, n. 9, p.1327-1333, 2004.
- CARTER, J. J. et al. Comparison of human papillomavirus types 16, 18, and 6 capsid antibody responses following incident infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 6, p. 1911-1919, 2000.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CHIODA, M. et al. Myeloid cell diversification and complexity: an old concept with new turns in oncology. **Cancer Metastasis Reviews**, v. 30, n. 1, p. 27-43, 2011.

CID-ARREGUI, A. et al. A synthetic e7 gene of human papillomavirus type 16 that yields enhanced expression of the protein in mammalian cells and is useful for dna immunization studies a synthetic e7 gene of human papillomavirus type 16 that yields enhanced expression of the pro. **Journal of Virology**, v. 77, n. 8, p.4928-4937, 2003.

COLEMAN, N. et al. Immunological events in regressing genital warts. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 102, n. 6, p. 768-774, 1994.

CONRAD, M.; BUBB, V. J.; SCHLEGEL, R. The human papillomavirus type 6 and 16 E5 proteins are membrane-associated proteins which associate with the 16-kilodalton pore-forming protein. **Journal of Virology**, v. 67, n. 10, p. 6170-6178, 1993.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 860-867, 2002.

CHO, Y. S. et al. Down modulation of IL-18 expression by human papillomavirus type 16 E6 oncogene via binding to IL-18. **FEBS Letter**, v. 501, n. 2-3, p. 139-145, 2001.

CULLEN, A. P. et al. Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. **Journal of Virology**, v. 65, n. 2, p. 606-612, 1991.

de JONG, A. et al. Human papillomavirus type 16-positive cervical cancer is associated with impaired CD4+ T-cell immunity against early antigens E2 and E6. **Cancer Research**, v. 64, n. 15, p. 5449-5455, 2004.

de VILLIERS, E. M. et al. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, n. 1, p. 17-27, 2004.

de VISSER, K. E.; KORETS, L. V.; COUSSENS, L. M. De novo carcinogenesis promoted by chronic inflammation is B lymphocyte dependent. **Cancer Cell**, v. 7, n. 5, p. 411-423, 2005.

DOORBAR, J et al. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. **Nature**, v. 352, n. 6338, p. 824-827, 1991.

DOORBAR, J. The papillomavirus life cycle. **Journal of Clinical Virology** , v. 32 Suppl 1, p. S7-15, 2005.

DUENSING, S. et al. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 18, p. 10002-10007, 2000.

DYSON, N. et al. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. **Science**, v. 243, n. 4893, p. 934-937, 1989.

EINSTEIN, M. H. et al. Comparison of the immunogenicity and safety of Cervarix and Gardasil human papillomavirus (HPV) cervical cancer vaccines in healthy women aged 18-45 years. **Human Vaccine**, v. 5, n. 10, p. 705-719, 2009.

FEHRMANN, F., LAIMINS, L. A. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. **Oncogene**, v. 22, p. 5201–5207, 2003.

FRATTINI, M. G.; LAIMINS, L. A. Binding of the human papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer-binding protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 26, p. 12398-12402, 1994.

FRIDLENDER, Z. G. et al. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: “N1” versus “N2” TAN. **Cancer Cell**, v. 16, n. 3, p. 183-194, 2009.

GABRILOVICH, D. I. et al. Mechanism of immune dysfunction in cancer mediated by immature Gr-1+ myeloid cells. **Journal of Immunology**, v. 166, n. 9, p. 5398-5406, 2001.

GARCIA-ARIAS, A. et al. The prognostic significance of leukocytosis in cervical cancer. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 17, n. 2, p. 465-470, 2007.

GARCIA-CHACON, R.; VELASCO-RAMIREZ, S. F.; FLORES-ROMO, L. Immunobiology of HPV Infection. **Archives of Medical Research**, v. 40, p. 443-448, 2009.

GLOBOCAN. **Cancer Incidence and Mortality Worldwide**, 2008. Lyon, France:International Agency for Research on Cancer. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr>> Acesso em: 10 ago 2012.

GOODWIN, E. C. et al. Transactivation-competent bovine papillomavirus E2 protein is specifically required for efficient repression of human papillomavirus oncogene expression and for acute growth inhibition of cervical carcinoma cell lines. **Journal of Virology**, v. 72, n. 5, p. 3925-3934, 1998.

HAMMES, L. S. et al. Macrophages, inflammation and risk of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) progression--clinicopathological correlation. **Gynecologic Oncology**, v. 105, n. 1, p. 157-165, 2007.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HASAN, U. A. et al. TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16. **Journal of Immunology**, v. 178, n. 5, p. 3186-3197, 2007.

HAWLEY-NELSON, P. et al. HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. **The EMBO Journal**, v. 8, n. 12, p. 3905-3910, 1989.

HEUSINKVELD, M. et al. M2 macrophages induced by prostaglandin E2 and IL-6 from cervical carcinoma are switched to activated M1 macrophages by CD4+ Th1 cells. **Journal of Immunology**, v. 187, n. 3, p. 1157-1165, 2011.

HOELZINGER, D. B. et al. Blockade of CCL1 inhibits T regulatory cell suppressive function enhancing tumor immunity without affecting T effector responses. **Journal of Immunology**, v. 184, n. 12, p. 6833-6842, 2010.

HU, L.; CERESA, B. P. Characterization of the plasma membrane localization and orientation of HPV16 E5 for cell-cell fusion. **Virology**, v. 393, n. 1, p. 135-143, 2009.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Estimativas 2012: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2011.

ISBEL, N. M. et al. Local macrophage proliferation correlates with increased renal M-CSF expression in human glomerulonephritis. **Nephrology, Dialysis, Transplantation**, v. 16, n. 8, p. 1638-1647, 2001.

JENKINS, B. J. et al. Pathologic consequences of STAT3 hyperactivation by IL-6 and IL-11 during hematopoiesis and lymphopoiesis. **Blood**, v. 109, n. 6, p. 2380-2388, 2007.

JENKINS, S. J. et al. Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. **Science**, v. 332, n. 6035, p. 1284-1288, 2011.

JENKINSON, E. J. et al. The thymus and T-cell commitment: the right niche for Notch? **Nature reviews. Immunology**, v. 6, n. 7, p. 551-555, 2006.

JEON, S.; LAMBERT, P. F. Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: Implications for cervical carcinogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, p. 1654-1658, 1995.

KIYONO, T. et al. Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. **Nature**, v. 396, p. 6-10, 1998.

KLINGELHUTZ, A J; FOSTER, S A; MCDUGALL, J. K. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. **Nature**, v. 380, n. 6569, p. 79-82, 1996.

KOBAYASHI, A. et al. Recent developments in understanding the immune response to human papilloma virus infection and cervical neoplasia. **Oncology Nursing Forum**, v. 27, n. 4, p. 643-651, 2000.

KOBAYASHI, A. et al. Evolving immunosuppressive microenvironment during human cervical carcinogenesis. **Mucosal Immunology**, v. 1, n. 5, p. 412-420, 2008.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LEE, S. J. 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. **Journal of Immunology**, v. 167, n. 1, p. 497-504, 2001.

LEPIQUE, A. P. et al. HPV16 tumor associated macrophages suppress antitumor T cell responses. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 13, p. 4391-400, 2009.

- LORUSSO, G.; RÜEGG, C. The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 130, n. 6, p. 1091-1103, 2008.
- LUO, Y.; POLLARD, J. W.; CASADEVALL, A. Fcγ receptor cross-linking stimulates cell proliferation of macrophages via the ERK pathway. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 6, p. 4232-4242, 2010.
- MABUCHI, S. et al. Pretreatment leukocytosis is an indicator of poor prognosis in patients with cervical cancer. **Gynecologic Oncology**, v. 122, n. 1, p. 25-32, 2011.
- MASSON, M. et al. Preferential nuclear localization of the human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein in cervical carcinoma cells. **Journal of General Virology**, v. 84, n. 8, p. 2099-2104, 2003.
- MATTHEWS, K. et al. Depletion of langerhans cells in human papillomavirus type 16-infected skin is associated with e6-mediated down regulation of e-cadherin. **Journal of Virology**, v. 77, n. 15, p. 8378-8385, 2003.
- MAZIBRADA, J. et al. Interaction between inflammation and angiogenesis during different stages of cervical carcinogenesis. **Gynecologic Oncology**, v. 108, n. 1, p. 112-120, 2008.
- MELANI, C. et al. Myeloid cell expansion elicited by the progression of spontaneous mammary carcinomas in c-erbB-2 transgenic BALB/c mice suppresses immune reactivity. **Blood**, v. 102, n. 6, p. 2138-2145, 2003.
- MILLER, M. D.; KRANGEL, M. S. The human cytokine I-309 is a monocyte chemoattractant. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 7, p. 2950-2954, 1992.
- MORTON, C. L.; HOUGHTON, P. J. Establishment of human tumor xenografts in immunodeficient mice. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 247-250, 2007.
- MOSCICKI, A. B. et al. Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. **Vaccine**, v. 24, p. S3/42-51, 2006. Suppl. 3.
- MOVAHEDI, K. et al. Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. **Blood**, v. 111, n. 8, p. 4233-4244, 2008.
- MUÑOZ, N. et al. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine**, v. 24, p. S3/1-10, 2006. Suppl 3.
- MÜNGER, K. et al. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. **Journal of Virology**, v. 63, n. 10, p. 4417-21, 1989.
- OZBUN, M. A.; MEYERS, C. Temporal usage of multiple promoters during the life cycle of human papillomavirus type 31b. **Journal of Virology**, v. 72, n. 4, p. 2715-2722, 1998.
- PAHLER, J. C. et al. Plasticity in tumor-promoting inflammation : impairment of macrophage recruitment evokes a compensatory. **Neoplasia**, v. 10, n. 4, p. 329-339, 2008.

PALEFSKY, J. M. et al. Cervicovaginal human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus-1 (HIV)-positive and high-risk hiv-negative women. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 91, n. 3, p. 226-36, 1999.

PEREA, S. E.; MASSIMI, P.; BANKS, L. Human papillomavirus type 16 E7 impairs the activation of the interferon regulatory factor-1. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 5, n. 6, p. 661-6, 2000.

PETRY, K.U. et al. Cellular immunodeficiency enhances the progression of human papillomavirus-associated cervical lesions. **International Journal of Cancer**, v. 57, n. 6, p. 836-40, 1994.

PIERSMA, S. J. et al. High number of intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes is associated with the absence of lymph node metastases in patients with large early-stage cervical cancer. **Cancer Research**, v. 67, n. 1, p. 354-61, 2007.

PIERSMA, S. J. Immunosuppressive tumor microenvironment in cervical cancer patients. **Cancer Microenvironment**, v. 4, n. 3, p. 361-75, 2011.

ROMANCZUK, H.; HOWLEY, P M. Disruption of either the E1 or the E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 7, p. 3159-3163, 1992.

RONCO, L. V. et al. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. **Genes & Development**, v. 12, n. 13, p. 2061-2072, 1998.

SCHEFFNER, M. et al. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. **Cell**, v. 63, n. 6, p. 1129-1136, 1990.

SCHEFFNER, M. et al. The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 13, p. 5523-5527, 1991.

SMITH, J. S. et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. **International Journal of Cancer**, v. 121, n. 3, p. 621-632, 2007.

STANLEY, M. HPV - immune response to infection and vaccination. **Infectious Agents and Cancer**, v. 5, n. 1, p. 19, 2010a.

STANLEY, M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. **Gynecologic Oncology**, v. 117, n. 2, p. S5-10, 2010b.

STANLEY, M. Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 2, p. 215-222, 2012.

STEELE, J. C. et al. T-cell responses to human papillomavirus type 16 among women with different grades of cervical neoplasia. **British Journal of Cancer**, v. 93, n. 2, p. 248-259, 2005.

STÖPPLER, M. C. et al. The E5 gene of HPV-16 enhances keratinocyte immortalization by full-length DNA. **Virology**, v. 223, n. 1, p. 251-254, 1996.

STRAIGHT, S. W. et al. The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 transforms fibroblasts and effects the downregulation of the epidermal growth factor receptor in keratinocytes. **Journal of Virology**, v. 67, n. 8, p. 4521-4532, 1993.

TADMOR, T. et al. The absence of B lymphocytes reduces the number and function of T-regulatory cells and enhances the anti-tumor response in a murine tumor model. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 60, n. 5, p. 609-619, 2011.

THOMAS, M.; BANKS, L. Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV-18 E6. **Oncogene**, v. 17, n. 23, p. 2943-2954, 1998.

TINDLE, R. W. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 1, p. 59-65, 2002.

TJIONG, M. Y. et al. Increased IL-6 and IL-8 levels in cervicovaginal secretions of patients with cervical cancer. **Gynecologic Oncology**, v. 73, n. 2, p. 285-291, 1999.

UM, S. J. et al. Abrogation of IRF-1 response by high-risk HPV E7 protein in vivo. **Cancer Letters**, v. 179, n. 2, p. 205-212, 2002.

van der BURG, S. H. et al. Association of cervical cancer with the presence of CD4+ regulatory T cells specific for human papillomavirus antigens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 29, p. 12087-12092, 2007.

van GINDERACHTER, J. A. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) ligands reverse CTL suppression by alternatively activated (M2) macrophages in cancer. **Cancer**, v. 108, n. 2, p. 525-535, 2006.

VANDERCAPPELLEN, J.; van DAMME, J.; STRUYF, S. The role of CXC chemokines and their receptors in cancer. **Cancer Letters**, v. 267, n. 2, p. 226-244, 2008.

VISSER, J. et al. Frequencies and role of regulatory T cells in patients with (pre)malignant cervical neoplasia. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 150, n. 2, p. 199-209, 2007.

W, L. et al. Down-regulation of HLA class I antigen in human papillomavirus type 16 E7 expressing HaCaT cells: correlate with TAP-1 expression. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 20, n. 2, p. 227-232, 2010.

WALBOOMERS J. M. et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **Journal of Pathology**, v. 189, n. 1, p. 12-19. 1999.

WAUGH, D. J. J.; WILSON, C. The interleukin-8 pathway in cancer. **Clinical cancer research**, v. 14, n. 21, p. 6735-6741, 2008.

WELTERS, M. J. P. et al. Detection of human papillomavirus type 18 E6 and E7-specific CD4+ T-helper 1 immunity in relation to health versus disease. **International Journal of Cancer**, v. 118, n. 4, p. 950-956, 2006.

WHITESIDE, M. A.; SIEGEL, E. M.; UNGER, E. R. Human papillomavirus and molecular considerations for cancer risk. **Cancer**, v. 113, n. 10, p. 2981-2994, 2008.

WHITESIDE, T. L. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. **Oncogene**, v. 27, n. 45, p. 5904-5912, 2008.

WILCOX, R. A. Cancer-associated myeloproliferation: old association, new therapeutic target. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 85, n. 7, p. 656-663, 2010.

WITKOWSKA, A. M.; BORAWSKA, M. H. Soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1): an overview. **European Cytokine Network**, v. 15, n. 2, p. 91-98, 2004.

WU, S. et al. Targeted blockade of interleukin-8 abrogates its promotion of cervical cancer growth and metastasis. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 8, n. 1-2, p. 69-79, 2012.

YOUNOS, I. H. et al. Tumor regulation of myeloid-derived suppressor cell proliferation and trafficking. **International Immunopharmacology**, v. 13, n. 3, p. 245-256, 2012.

ZHANG, B. et al. The E5 protein of human papillomavirus type 16 perturbs MHC class II antigen maturation in human foreskin keratinocytes treated with interferon- γ . **Virology**, v. 310, n. 1, p. 100-108, 2003.

ZITVOGEL, L.; TESNIERE, A.; KROEMER, G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. **Nature Reviews. Immunology**, v. 6, n. 10, p. 715-727, 2006.

ZOU, W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. **Nature Reviews. Cancer**, v. 5, n. 4, p. 263-274, 2005.

zur HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nature Reviews. Cancer**, v. 2, n. 5, p. 342-350, 2002.

APÊNDICE

Manuscrito

HPV associated tumors control homeostasis of the host's myeloid populations

Simone Cardozo Stone¹, Renata Arizza Marques Rossetti¹, Ana Paula Lepique^{1#}.

¹Department of Immunology, Instituto de Ciências Biomédicas, University of São Paulo

Corresponding author: Ana Paula Lepique

Laboratory of Immunomodulation, Department of Immunology, Instituto de Ciências Biomédicas, University of Sao Paulo

Av. Prof. Lineu Prestes, 1730, room 136, ZIP 055508-900, Sao Paulo, SP, Brazil

Phone: 5511-30917376, email: alepique@icb.usp.br

Keywords: Human Papillomavirus, inflammation, leukocytosis, cell signaling

Running title: Systemic effects of HPV associated tumors.

ABSTRACT

Persistent infection with a high oncogenic risk Human Papillomavirus, HPV, is the main etiological factor for cervical cancer and a number of other anogenital and oropharyngeal tumors. In patients with cervical cancer, there is an increase in the number of M2-like macrophages as lesions progress from low to high grade. Our laboratory has previously shown that in a HPV16 associated tumor model, tumor macrophages, TAM, inhibit anti-tumor T cell responses, in a mechanism partially mediated by IL-10 expression. Our laboratory, as well, as others have shown that there is an increase in myeloid cell populations, possibly myeloid derived suppressor cells, in the spleen of HPV associated tumor bearing mice, and these cells can also suppress T cell activity. Furthermore, we have shown that depletion of TAM and myeloid cells in the spleen allow anti-tumor CD8 cells expansion in the spleen and inhibit tumor growth. The identification of the source of these cells and the signals that induce their differentiation and accumulation in the host may be important for controlling the expansion of these cells and therefore permitting anti-tumor T cell responses to occur. In this work, we show, using different animal models, that HPV16 associated tumors are very efficient in controlling cell signaling and cell proliferation, systemically, loading the host with myeloid cells and creating an environment prone to development of regulatory T cells. Our data invites research groups in this area to reflect on the current therapies and take into consideration a possible vicious cycle created by the tumor that must be broken to allow the various immunotherapy protocols under test success.

INTRODUCTION

The tumor microenvironment is complex, composed not only of different cell types, but also of extracellular matrix and soluble factors. Other important elements are hypoxia and pH gradient in different areas of the tumor. Nutrient and oxygen availability, cell-cell interactions, autocrine and paracrine signaling define the microenvironment. Tumor cells can survive in very stringent conditions, for instance under hypoxia and with limited nutrient concentration [1]. Tumor cells can shut down oxidative phosphorylation, bring glycolysis to production of lactate and shift pentose-phosphate pathway towards generation of 5P-glucose, in order to maintain biosynthetic pathways working. Under such situations, cells could easily die, however, activation of Phosphatidil Inositol 3 Kinase (PI3K) pathway seem to be a mechanism by which tumor cells can survive such complex and challenging environment. PI3K is classically associated to cell survival, and one of its main effectors is Akt [2]. Inflammatory cells in the tumor environment are submitted to the same situation and may respond in ways to assure its survival. Besides metabolic pathways, tumors secrete a variety of cytokines and other mediators that can act locally and systemically on the host's cells. Some of these factors are known to induce myeloid cell proliferation and increase in leukocyte numbers in the blood, a phenomenon known as leucocytosis. Under these circumstances, secondary lymphoid organs can accumulate cells that may have a role in modulating anti-tumor immune responses [3-4].

Human Papillomavirus is the etiological factor for virtually all cervical cancers and a number of anogenital and oropharyngeal cancers in both men and women. These small DNA viruses are sexually transmitted, infecting young people. Most infections are spontaneously cleared as well as low and even a percentage of high-grade lesions. However, in some patients the infection persists, creating situations where cancer may develop [5-6]. Among all types of cancer associated to HPV infection, cervical cancer is the one we understand better, simply because researchers have been studying for more than 20 years. In HPV associated cervical lesions there is a positive correlation between lesion grade and number of infiltrating macrophages. These cells seem to be M2-like macrophages, but there is not a very clear idea of their phenotype and function in the patients [7-8]. Animal models have been very helpful to understand how myeloid populations may interact and control T cells to modulate anti-tumor responses.

Others and our research group have previously shown that myeloid cells in the tumor and spleen of HPV16 tumor bearing mice inhibit T cell activity [9]. In this work, we are showing that associated tumors secrete mix of cytokines in the tumor environment, but also modulate cytokine expression in secondary lymphoid organs. Moreover, HPV16 tumors mainly, are very efficient to induce proliferation of myeloid populations, increase in cell numbers in the spleen of tumor bearing mice and create an environment where there is expansion of regulatory T cells.

Our data should call attention of researchers looking for immunotherapies against HPV associated tumors, remind them to take into consideration the systemic effects generated by the tumor, and looking for ways to break the cycle of expansion and accumulation of myeloid cells in the tumor host.

MATERIALS AND METHODS

1. Tumor models

TC-1 is a C57BL/6 epithelial cell line transduced with HPV16 and E_j-ras ([10]; kindly donated by Dr. Wu, John Hopkins's, Baltimore, US). Subcutaneous injection of 10^5 cells in C57BL/6 or any of the immunodeficient mouse strains used in this study, generate tumors 1cm diameter 3 to 4 weeks post-injection. SiHa, HeLa and C33 are lineages derived from human cervical tumors. C33 is the only know cervical cancer cell line negative for HPV DNA. SiHa was originally infected with HPV16 and HeLa with HPV18. As these are human cell lines they have to be injected into immunodeficient mice. We used the RAG1^{-/-} (B6.127S7-Rag1^{tm1Mom}/J, The Jackson Laboratory, Maine, US) and Nude (B6.Cg-Foxn1nu/J, CEMIB, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil) mouse strains, both in C57Bl/6 genetic background. Subcutaneous injection of 3×10^6 cells in both of these mouse strains generates tumors in 6 to 8 weeks post-injection. Our mouse experimentation protocols were approved by the Ethical Committee for Animal Experimentation of the Institute of Biomedical Sciences.

2. Cell preparation and flow cytometry analysis

When tumors reached 6 to 8 mm diameter, mice were injected with 1mg Bromodeoxyuridine, and one hour later euthanized with anesthesia. Peripheral lymph nodes, spleen, tibia, femur and tumor were harvested (lymph nodes only from Nude mice) and the lymphoid tissues were mechanically dissociated, while the tumor was digested in 1mg/ml Collagenase I and IV solution. Tissues and cells were maintained at all times in MTH (mouse tonic Hanks's solution: 1x Hanks', 15 mM HEPES pH 7.4, 0.5 U/ml DNase I, 5% bovine fetal serum) in ice. After mechanical or enzymatic dissociation, cells were washed in MTH, filtered and counted. For cell proliferation assays, 5×10^6 cells were stained with antibodies against surface markers, as indicated in the text, washed, fixed, and incubated with anti-BrdU, after partial digestion of the genomic DNA for better access of the antibody (BrdU Kit, BD Biosciences, Carlsbad, CA). For detection of phosphorylated proteins, after staining with surface markers, cells were fixed with 1% formaldehyde in PBS (phosphate buffered saline), washed with PBS and permeabilized with 90% methanol at -20°C for 10 min. Antibodies

against total and phosphor-proteins were diluted in PBS and incubated with cells for 20 min on ice. Cells were washed and incubated with FITC or APC conjugated secondary antibody. All cells were filtered before acquisition in a FACSCanto (BD Biosciences, Carlsbad, CA).

3. Histology and Immunofluorescence

Transversal sections of 5 μ m were cut from TissueTek-OCT (Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn, NL) compound frozen spleens. Sections were fixed in an acetone/methanol 2:1 mix for 5 min at room temperature and air dried. Sections were rehydrated with 3 incubations in PBS. For histology, sections were stained with Gill's hematoxylin for 2 min, before washing with water and PBS. Sections were dehydrated through an ethanol gradient followed by 2 incubations in neat xylol. Sections were mounted with Permount (FisherScientific, Whaltam, MA) and a coverslip. BrdU detection was performed on fixed sections, as described above. The tissues were treated with 1.5M HCl for 15 min, followed by incubation with 0.1 M sodium borate (pH 8.5) for 10 min at room temperature and 3 washes in PBS for DNA denaturation. We then incubated sections with FITC conjugated anti-BrdU and coverslipped sections with Vectashield with DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Images were acquired with a BX61 Olympus microscope (Tokyo, JP).

5. Determination of cytokine expression profile

To determine the cytokine and chemokine expression levels in TC-1 and SiHa tumor model, we used the Mouse Cytokine Array Panel (cat number ARY006) (Proteome ProfilerTM Array, R&D Systems, Minneapolis, MN). We obtained protein extracts from peritoneal macrophages and TAM after sorting and lysis, as specified by the kit protocol. Surface markers to define TAM were CD45⁺/CD11b⁺/F4/80⁺ and for peritoneal macrophages we used only F4/80⁺. The assays were performed according to manufacturer instructions. After the chemiluminescent reaction (ECL Kit, Little Chalfont, England) for detection of the bound cytokines, the membranes were exposed to X ray films for various periods of time to guarantee signals in the linear range for densitometry. Scanned autoradiogram images were analyzed and quantified with the ImajeJ software (NIH, US).

4. Statistical analyzes

We compared groups in pairs according to the status with and without tumor, or with HPV+ and HPV- tumors. We applied t-test to results with these groups and accepted $p < 0.05$ to indicate significance in the differences between groups.

RESULTS AND DISCUSSION

1. HPV associated tumors promote increase in cellularity of secondary lymphoid organs in mice

Leukocytosis is a relatively common phenomenon in patients with cancer. In mice, several groups have described increase in myeloid cell populations in the spleen [3, 9, 11]. We have been working with the TC-1 tumor model for several years. This cell line, generated in the laboratory of Prof. Wu at John Hopkins [10], expresses the E6 and E7 oncogenes cloned from the HPV16 genome. They also express V12 mutated Ras, which confers fully transformed phenotype to these cells. This is a very efficient tumor model, although as long as we know there is no HPV negative control for this cell line. Interested in knowing mechanisms that may be specifically triggered HPV, we used cervical cancer derived cell lines that contain or not HPV genome. We also used SiHa (HPV16), HeLa (HPV18) and C33 as tumor models in this work. These are human cell lines, injected into immunodeficient mice. Most of the data we are showing regards the TC-1 tumor model, but we will show also data using the other tumor models to be able to show if the mechanisms we are seeing are dependent or not on HPV oncogene expression.

We have previously described an increase in specific cell populations in the lymph nodes and spleen of TC-1 tumor bearing mice [9, 12]. We have seen significant increase in myeloid populations CD11bGr1 and CD11bF4/80 [9], as well as increase in B cell populations in the bone marrow, spleen and lymph nodes of tumor bearing mice ([12]; and data to be published elsewhere). One question we always asked ourselves was if the effects that we observed were due to HPV oncoprotein expression in the TC-1 tumors. We do not have, until now, a good HPV- control for this cell line. To circumvent this problem, we decided to test cervical cancer derived cell lines to look for HPV specific responses. As these are human cell lines, we have injected them in RAG1^{-/-} or Nude mice. In both cases, tumors grow in approximately 45 days, when we harvest tumors and lymphoid organs for examination. The first striking feature of this model was the difference in the inflammatory infiltrates in tumors of mice injected with HeLa or SiHa cells and C33 cells. HeLa and SiHa tumors displayed 3.1 ± 0.5 and 5.4 ± 0.6 fold more infiltrate than C33 tumors, which were very poor in inflammatory infiltrate (maximum 1% of total tumor cells). So we started to look at lymphoid organs to understand if there was a difference in myeloid cell numbers or just cell

recruitment to the tumors. Figure 1A shows spleens of RAG1^{-/-} mice injected with cervical cancer derived cell lines displayed an increase in cellularity. Although all human tumor cell lines promote an increase in spleen cellularity, SiHa triggered a 24 fold increase in cell numbers in the spleen of tumor bearing mice. When we looked at spleen morphology, we saw accumulation of myeloid derived suppressor cells mainly in SiHa injected mice, but also in HeLa injected mice. In C33 injected mice, there most splenocytes were mononuclear cells, as well as in the spleens of RAG mice (Figure 1B). More detailed analysis of these spleens was obtained by flow cytometry analysis, where indeed, we observed an increase in CD11bGr1 cells in gradient where, RAG naive < C33 < HeLa < SiHa (Figure 1C).

An important question comes from the data above, are cells proliferating in the spleens of mice injected with tumor cells? There is an increase of bromodeoxyuridine incorporation in the spleens of C57Black/6 mice bearing TC-1 tumors (Figure 2A). In the case of mice injected with the human cell lines, we saw an increase in proliferation of CD11bGr1 cells in the bone marrow of Nude mice injected with SiHa cells. Interestingly, these cells do not accumulate in the bone marrow, which leads us to believe they leave the marrow to colonize other tissues, possibly the spleen and tumor. In the bone marrow of RAG1^{-/-} mice, no significant differences were observed regarding cell proliferation, regardless of the tumor each mice had growing. On the other hand, in the spleens of HeLa tumor bearing mice, we observed an increase in CD11bGr1 and CD11bF4/80 cells proliferation. These data indicates: HPV positive cell lines can induce myeloid cell proliferation in lymphoid organs; the proliferation is limited to some lineages and do not reflect completely the increase in tissue cellularity observed in the tumor bearing mice. Therefore, it is likely that other mechanisms are at play in these systems, for instance, myeloid cell survival may be increased in mice with tumors. We did not directly address cell survival in lymphoid organs, but we observed that the Akt protein, an effector protein in the PI3K pathway, is phosphorylated in C57Black/6 mice and RAG1^{-/-} mice bearing TC-1 or SiHa tumors. TC-1 and SiHa tumors are both HPV16+, they both display approximately 10% of infiltrating cells in the tumors. We have, therefore, focused our experiments in these cell lines, using, when necessary the C33 (HPV-) cell line as control. The PI3K pathway is classically associated with cell survival. Signals produced in the tumor, as hypoxia, for instance, can activate the PI3K pathway to guarantee tumor cell proliferation. Our data shows that Akt is phosphorylated also in the tumor macrophages and in the spleen of tumor bearing mice (Figure 3A and 3B). In parallel to Akt, we tested NFκB phosphorylation as an activator marker. The NFκB pathway is essential

for antigen presentation and pro-inflammatory responses. We asked therefore, what was the status of NFkB in mice bearing tumors. Opposed to what we observe with Akt, NFkB expression was always detected, but the protein is never phosphorylated, indicating that this pathway is inactive in our tumor models. Interestingly, Akt phosphorylation did not seem to be an exclusive feature of HPV associated tumors, since we detected Akt phosphorylation in the C33 tumor cells and infiltrate (Figure 3B, lower panels). NFkB, on the other hand, is also phosphorylated in C33 infiltrating tumor cells, but not in SiHa infiltrating tumor cells. Similar results were observed with the TC-1 model in C57Black/6 mice. In the spleen, we observe an increase in cellularity (Figure 4A), as previously described. And we observed that the population that increased significantly between naïve and tumor bearing mice were MHC-II+CD19- antigen presenting cells, which are myeloid cells (dendritic cells and macrophages) (Figure 4B). We observed that Akt is phosphorylated in cells from tumor bearing mice, and NFkB not (Figure 4C and 4D). We observed, again, a similar pattern in the inflammatory infiltrate of TC-1 tumors (Figure 4E).

One will ask how hypoxia, if this is the important factor, could contribute to the events we are observing, acting systemically, when if it is contained within the tumor microenvironment. We expect soluble factor should be secreted from the tumor and circulate through the organism to alter cell proliferation and cell signaling in tissues unrelated to the tumor. We have investigated cytokine expression in the inflammatory infiltrate of SiHa and TC-1 tumors and observed similar cytokine expression profiles, indicating that these tumor cells indeed trigger mechanisms that are specific to HPV16 (Figure 5A).

Finally, we wanted to understand the role that the conditioning of the organism by the tumor on immune responses. To follow this objective, we transplanted naïve T cells from a C57Black/6 mouse into RAG1^{-/-} mice naïve or bearing TC-1 tumors. We took advantage of the natural process of homeostatic expansion that T cells undergo when exposed to free niche for colonization and asked if in RAG1^{-/-} mice conditioned by TC-1 tumors, regulatory T cells would be more frequent. Indeed, as observed in Figure 6, when transplanted into TC-1 bearing RAG1^{-/-} mice, naïve T cells generated 2.4 fold more regulatory T cells, when transplanted into naïve RAG1^{-/-} mice.

Our data indicates that tumors display several important systemic effects, controlling myeloid cell proliferation, survival and signaling, and ultimately promoting an environment when regulatory T cells are prone to expand. We are searching for specific factors that may be

creating this environment, and we urge researchers in this area to consider the systemic effects of tumors when designing new immunotherapies.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Myeloid populations in tumor bearing RAG1^{-/-} mice. A. Total number of cells in the spleen of RAG1^{-/-} mice control (naive) or injected with C33, or HeLa or SiHa cells. Tissues were harvested when tumors had approximately 1 cm in its largest diameter, which corresponds to 60 to 70x10⁶ total tumor cells. There was no significant difference in cellularity between the spleens of C33 and HeLa tumor bearing mice. Mice with SiHa tumors displayed a significant increase in cellularity to compared to all others. Each group was tested against the others by t-test. B. Morphology of splenocytes. Transversal 5µm sections of control mice (RAG) or mice injected with the indicated cells lines were fixed and stained with hematoxylin for 2 min, prior to dehydration and mounting with Permount. Micrograph magnification 1000X. Arrows indicated myeloid derived suppressor cells and arrowheads mononuclear cells. C. Flow cytometry analysis of splenocytes from RAG1^{-/-} mice naive, or injected with C33 cells, or SiHa cells or HeLa cells, as indicated. Nucleated single cell suspensions were stained with anti-CD11b and anti-Gr1 and analyzed by flow cytometry. At least, 30000 events were acquired per sample.

Figure 2. Cell proliferation and frequency in the bone marrow and spleen of Nude and RAG1^{-/-} mice injected with tumor cells. Following tumor cell injection, mice were euthanized when tumors reached approximately 1 cm in the largest diameter. Spleens and bone marrow from long bones were harvested, processed into single nucleated cell suspensions, stained with the indicated antibodies, then fixed, permeabilized, treated with DNase and incubated with anti-BrdU. Cells were analyzed in a FACSCalibur or FACSCanto, where at least 30000 events were acquired per sample. Experimental groups had from 3 to 8 mice. Results are the average of % of BrdU⁺ cells within a given population or % of total nucleated cells in the tissue.

Figure 3. Cell signaling in mice with SiHa and C33 tumors. A. Splenocytes obtained from SiHa tumor bearing mice were stained with antibodies against MHC-II, CD11c and F4/80 (plot on the left). Cells were then fixed, permeabilized and incubated with anti-phospho or total signaling proteins, as indicated. B. Total tumor cell suspensions were stained with anti-CD45 (plot on the left) and then fixed and permeabilized for anti-signaling protein staining, as indicated.

Figure 4. Cell proliferation and signaling in the spleen of TC-1 tumor bearing C57Black/6 mice. Bromodeoxyuridine incorporation (1 mg/mouse for 1 hour), detected in spleen 5µm sections, after fixation, DNA denaturation and incubation with anti-BrdU. B. Frequency of antigen presenting cells in the spleen of naive Black/6 mice or TC-1 tumor bearing mice. Spleens were harvested, nucleated cell suspension was stained with the indicated antibodies and analyzed by flow cytometry. At least 30000 events were acquired per sample. The plots are representative of 3 independent experiments, average of frequencies is displayed above each gate. C and D. Expression of phosphorylated Akt and NFκB, respectively, within gated marked in B. E. . Total tumor cell suspensions were stained with anti-CD45 (plot on the left) and then fixed and permeabilized for anti-signaling protein staining, as indicated.

Figure 5. Comparison between cytokine expression in TAM from different tumor models. TAM from TC-1, grown in C57 Black/6 mice and SiHa, grown in RAG1^{-/-} mice, tumor single cell suspensions were sorted (CD45⁺CD11b⁺F4/80⁺) and lysed for Proteome Cytokine Array kit (R&D Systems, Minneapolis, MN) analyzes. Peritoneal macrophages, F4/80⁺ cells, were used as reference population. We separated data in four groups, growth factors, cytokines, chemokines and inflammatory molecules to facilitate reading and analyzes. All results are displayed as a ratio between expression of a given cytokine in CD45⁻ or TAM and the expression of the same cytokine in peritoneal macrophages. The line in each graph marks the value 1, where expression of a given cytokine is the same between the target population and peritoneal macrophages. SiHa tumors derived TAM are represented by light gray bars and TC-1 tumors derived TAM are represented by dark gray bars. Comparison between a given cytokine expression in the target population and in peritoneal macrophage was done by t-test. To compare expression of a given cytokine among all populations we used the Mann Whitney test. In both cases, we considered p<0.05 a significant result. t-test results are indicated in the figure.

Figure 6. Regulatory T cell expansion in RAG1^{-/-} mice. T cells from naive C57Black/6 mice were isolated by negative selection and transplanted into RAG1^{-/-} mice previously injected with TC-1 cells, 3×10^6 cells/mouse. Two weeks later, lymph nodes were harvested from both groups of mice, single cell suspensions were stained with anti-CD4, anti-CD25 and anti-Fox p3. Cells were analyzed by flow cytometry, in a FACSCalibur, when at least 30000 events were acquired per sample.

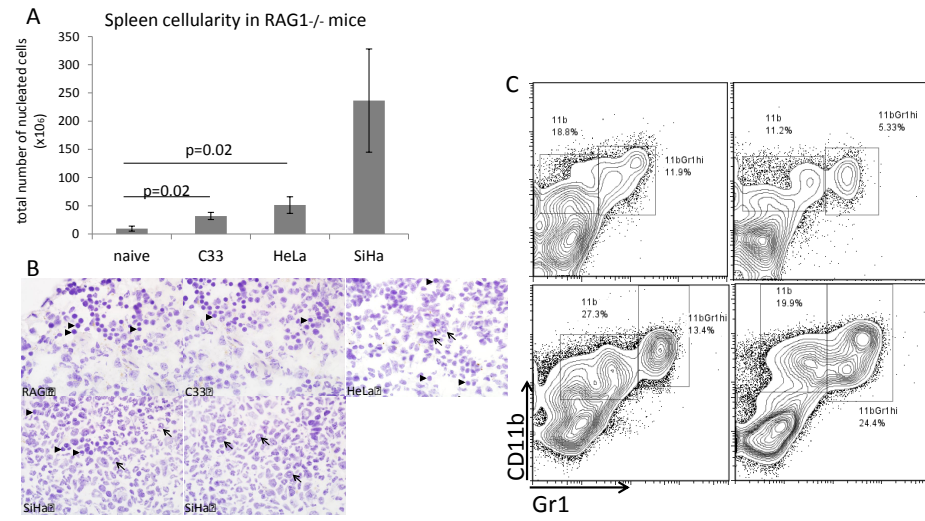


Figure 1

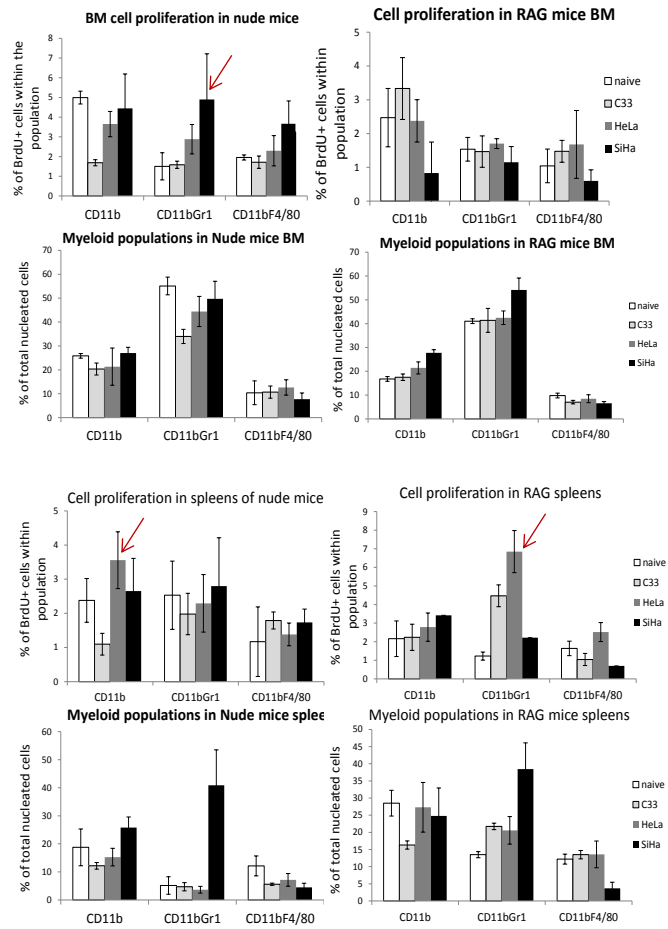


Figure 2

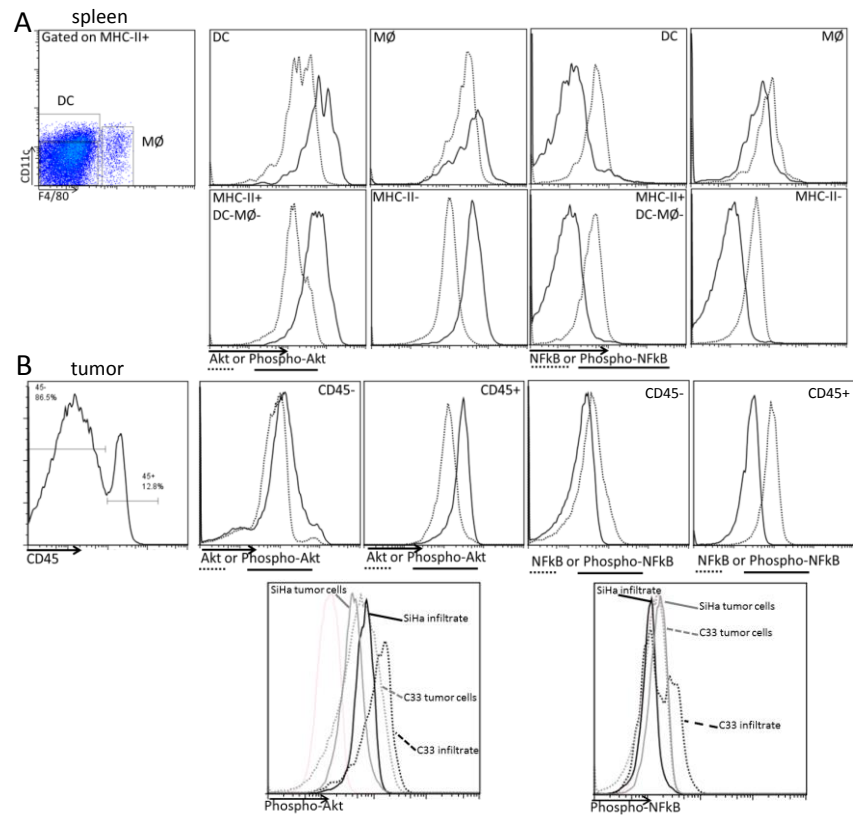


Figure 3

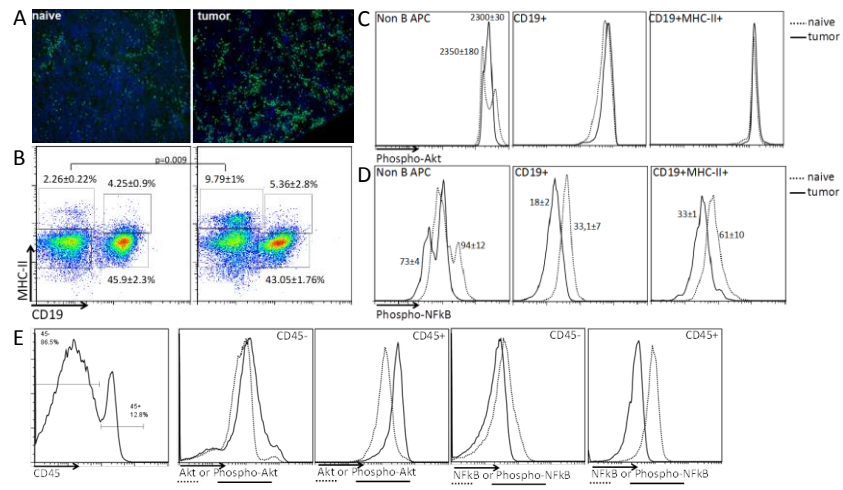


Figure 4

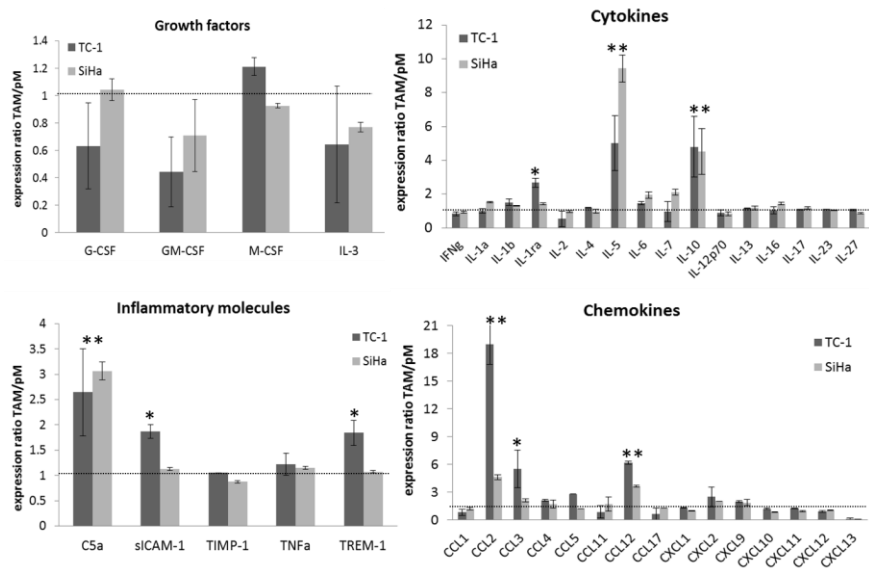


Figure 5

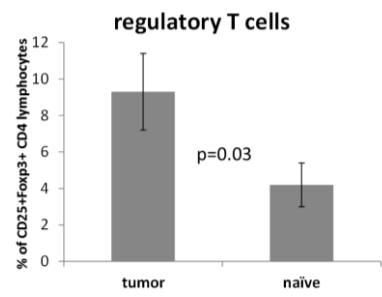


Figure 6

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by FAPESP, grants 2008/03232-8 and 2010/20010-2. SCS has a CAPES graduation fellowship and RAMR has a FAPESP doctorate fellowship.

REFERENCES

- [1] HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144, 646-674.
- [2] ZHONG, H. et al. (2000) Modulation of hypoxia-inducible factor 1 α expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: Implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res.* **6**, 1541-1545.
- [3] van GINDERACHTER, J. A. (2006) et al. Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) ligands reverse CTL suppression by alternatively activated (M2) macrophages in cancer. *Cancer*. **108**, 525-535.
- [4] WILCOX, R. A. (2010) Cancer-associated myeloproliferation: old association, new therapeutic target. *Mayo Clinic Proceedings*. **85**, 656-663.
- [5] BOSCH, F. X. et al. (2002) The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*. **55**, 244-265.
- [6] TINDLE, R. W. (2002) Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Nat Rev Cancer*. **2**, 59-65.
- [7] COLEMAN, N. et al. (1994) Immunological events in regressing genital warts. *American J of Clin Pathol*. **102**, 768-774.
- [8] HAMMES, L. et al. (2007) Macrophages, inflammation and risk of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) progression-clinicopathological correlation. *Gynecol Oncol*. **105**, 57-65.
- [9] LEPIQUE, A. P. et al. (2009) HPV16 tumor associated macrophages suppress antitumor T cell responses. *Clin Cancer Res*. **15**, 4391-400.
- [10] LIN, C.T. et al. (2006) A DNA vaccine encoding a codon-optimized human papillomavirus type 16 E6 gene enhances CTL response and anti-tumor activity. *J Biomed Science*. **13**, 481-488.
- [11] GABRILOVICH, D. I. et al. (2001) Mechanism of immune dysfunction in cancer mediated by immature Gr-1+ myeloid cells. *J of Immunol*. **166**, 5398-5406.
- [12] BOLPETTI, A. et al. (2010) Interleukin-10 production by tumor infiltrating macrophages plays a role in Human Papillomavirus 16 tumor growth. *BMC Immunol*. 11, 11-27.