

LUCAS GIAROLLA GONÇALVES DE MATOS

ASSOCIAÇÃO ENTRE A VIA DOS RECEPTORES TOLL
SÍMILE COM A VIA DOS FATORES DE NECROSE
TUMORAL NAS LESÕES PRÉ-INVASORAS E CÂNCER DE
COLO UTERINO

Belo Horizonte
Universidade Federal de Minas Gerais
Junho 2014

LUCAS GIAROLLA GONÇALVES DE MATOS

ASSOCIAÇÃO ENTRE A VIA DOS RECEPTORES TOLL
SÍMILE COM A VIA DOS FATORES DE NECROSE
TUMORAL NAS LESÕES PRÉ-INVASORAS E CÂNCER DE
COLO UTERINO

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ginecologia,
Obstetrícia e Mastologia–Programa Saúde da Mulher, da Faculdade
de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, para
Obtenção do Título de Mestre em Ginecologia.

Orientador: Prof. Agnaldo Lopes da Silva Filho
Coorientador: Prof. Eduardo Batista Cândido

Belo Horizonte
Universidade Federal de Minas Gerais
Faculdade de Medicina
Junho 2014

Reitor

PROF. JAIME ARTURO RAMÍREZ

Vice-Reitora

PROFa. SANDRA REGINA GOULART ALMEIDA

Pró-Reitor de Pós-Graduação

PROF. RODRIGO ANTÔNIO DE PAIVA DUARTE

Pró-Reitora de Pesquisa

PROFa. ADELINA MARTHA DOS REIS

Diretor da Faculdade de Medicina

PROF. TARCIZO AFONSO NUNES

Vice-Diretor da Faculdade de Medicina

PROF. HUMBERTO JOSÉ ALVES

Coordenadora do Centro de Pós-Graduação

PROFa. SANDHI MARIA BARRETO

Subcoordenadora do Centro de Pós-Graduação

PROFa. ANA CRISTINA CORTES

Chefe do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia

PROF. CEZAR ALENCAR DE LIMA REZENDE

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher

PROF. ANTÔNIO CARLOS VIEIRA CABRAL

Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher

PROF. ANTÔNIO CARLOS VIEIRA CABRAL

PROF SELMO GEBER

PROF VICTOR HUGO DE MELO

PROFa ALAMANDA KFOURY PEREIRA

PROF GABRIEL COSTA OZANAN

Dedicatória

Dedico essa tese,

Aos meus pais Nilson e Tania pela carinhosa e constante entrega pessoal dispendida ao longo da minha vida, vocês é que viabilizam todas as minhas conquistas.

À minha irmã Luciana que só ela consegue compartilhar, em silêncio, todas as minhas alegrias e aflições cotidianas. Grande parceira!

À minha esposa Suellen pelo amor e toda a doce magia que ele carrega consigo. Pelos cuidados, paciência e entrega sem limites...Sempre NÓS!

Aos meus familiares pelos bons momentos

Ao que há de vir pelo desafio e motivação

Agradecimentos

Um agradecimento especial ao Professor Agnaldo Lopes da Silva Filho, que me incentivou sempre, teve a paciência necessária e acreditou que essa tese era possível. Sempre disposto a transmitir o conhecimento com um equilíbrio técnico, científico e humano inigualáveis.

Ao Professor Eduardo Batista Cândido pelos ensinamentos em vídeo-endoscopia ginecológica e por ensinar a respeitar os limites do médico enquanto homem. Obrigado pelo espaço cedido para orientação nas corridas terças pela manhã. Sentirei falta.

Aos Professores Henrique Vitor Leite e Antônio Carlos Vieira Cabral pela iniciação na vida científica ainda enquanto aluno e por permanecerem me apoiando até a pós-graduação.

À professora Paula Vidigal pelo profissionalismo, agilidade e competência na confecção e leitura das lâminas.

Ao Professor Francisco de Assis Nunes Pereira pela ajuda fundamental na coleta e organização dos dados.

Tais colaborações foram essenciais para realização desta tese.

“Todo abismo é navegável a barquinhos de papel”

João Guimarães Rosa

“O tempo, o tempo, o tempo e suas águas inflamáveis, esse rio largo que não cansa de correr, lento e sinuoso, ele próprio reconhecendo seus caminhos, recolhendo e filtrando de várias direções o caldo turvo dos afluentes e o sangue ruivo de outros canais para com eles construir a razão mística da história...”

Raduam Nassar

Índice

Resumo

Abstract

Lista de Siglas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

1. Introdução.....	15
1.1. Generalidades.....	15
1.1.1. Câncer do Colo Uterino.....	15
1.1.2. Carcinogênese.....	16
1.2.1. O receptor TOLL Símile.....	17
1.2.2. O receptor TOLL Símile e câncer.....	19
1.2.3. O receptor TOLL Símile e câncer de colo uterino.....	20
1.3.1. Os Fatores de Necrose tumoral α e β	22
1.3.2. Os Fatores de Necrose tumoral α e β e câncer de colo uterino.....	23
1.4.1. Associação entre Receptores TOLL Símile e Fatores de Necrose Tumoral.....	24
1.5. Justificativa do estudo.....	25
2. Objetivos.....	26
3. Artigo.....	27
4. Conclusões.....	45
5. Referências Bibliográficas.....	46
6. Anexos.....	50
6.1 Materiais e métodos	50

Resumo

Introdução: A infecção persistente pelo papiloma vírus humano (HPV) é o principal agente causador do carcinoma de células escamosas do colo uterino. No processo de carcinogênese, o HPV interage com a resposta imune do hospedeiro modificando-a em seu favor. Os receptores TOLL símile (TLR) são receptores transmembrana presentes em células de defesa do hospedeiro e são responsáveis pelo reconhecimento de estruturas patógenas e ativação da resposta imune inata. Em humanos, já foram reconhecidos 10 tipos de TLR sendo que alguns deles foram associados a alguns tipos de tumor, inclusive ao carcinoma cervical. Os fatores de necrose tumoral (TNF- α , TNF- β) são importantes mediadores de inflamação da pele e mucosas. Vários estudos indicam que a expressão desses fatores influencia diretamente o destino da infecção por HPV sendo que a sua expressão desregulada no microambiente tumoral parece favorecer o desenvolvimento e invasão tumoral. Desse modo, esse estudo visa avaliar se há uma interação entre essas duas vias de resposta imune no processo de carcinogênese cervical. Além disso, este estudo visa avaliar a expressão dos receptores TOLL símile 2,3 e 4 e da expressão de TNF- α e TNF- β em amostras de neoplasia cervical, assim como em lesões pré-invasoras (NICs) em comparação com os controles. Os dados foram analisados através do teste de razão de verossimilhança para a primeira comparação e o teste qui-quadrado para a segunda comparação. O nível de significância foi considerado quando $p < 0,05$.

Resultados: Houve associação entre os níveis de expressão de TLR2 com TNF- α e com TNF- β ($p=0.01$, $p=0.021$; respectivamente) assim como associação entre os níveis de expressão de TLR4 com TNF- α e com TNF- β ($p=0.016$, $p=0.025$; respectivamente)

Observou-se também maior expressão de TLR2 ($p=0.032$), TLR4 ($p<0.001$), TNF- α ($p=0.007$) e TNF- β ($p=0.036$) nos grupos de lesão pré invasora e carcinoma cervical quando comparado ao controle.

Conclusão: Há uma associação da via imunológica dos receptores TOLL símile 2 e 4 com a via dos fatores de necrose tumoral no processo de carcinogênese cervical . Além disso, há uma maior expressão desses marcadores nas lesões pré invasoras e no câncer cervical. A expressão receptor TOLL símile 3 não se associa a expressão dos fatores de necrose tumoral α e β e nem apresenta elevação de sua expressão no câncer cervical e lesões pré-invasoras quando comparado ao controle.

Palavras-Chave: Câncer invasor do colo uterino, imunohistoquímica, receptores TOLL símile, fator de necrose tumoral

Abstract

Introduction: Cervical cancer is an important cause of death in women worldwide. The persistent infection of human papillomavirus (HPV) is recognized as one of the causative agents. The persistence of HPV infection is necessary, but insufficient to the development of cervical cancer. HPV may alter the host's immune response in order to escape from the immune attack and use it favoring the malignant transformation. The TOLL Like receptors (TLR) are membrane receptors present in the defense cells and they are responsible to recognize pathogens structures and activate signaling pathways leading to an activation of innate immune response. In humans, 10 different types of TOLL Like receptors are recognized. Previous studies had shown association between TLR expression and cervical cancer. Tumor necrosis factors (TNF- α , TNF- β) are one of the main mediators of skin and mucosa inflammation. They have a potent antiproliferative effect on normal epithelial cells. Numerous observations indicate that TNF may influence the fate of HPV infected cells. Deregulated TNF expression within the tumor microenvironment appears to favor malignant cell tissue invasion, migration, and ultimately metastasis formation. The TLR and TNF are play crucial role in the development of the cervical cancer. Still, to date, there are no studies about a possible association between them in the cervical cancer. This study showed the association between the expression of TLR and TNF in cervical cancer, HPV related lesions when compared to normal controls.

Results: It was observed an association between expression levels of TLR2 with TNF- α ($p=0.01$) and with TNF- β ($p=0.021$) in cervical cancer and CIN groups. The expression of TLR4 was also associated with the expression of TNF- α ($p=0.016$) and TNF- β ($p=0.025$) in the groups. Differently, TLR3 was not statistically associated with

TNF α nor TNF β . It was also found, in accordance with previous studies, that there are higher levels of expression of TLR2 ($p=0.032$), TLR4 ($p<0.001$), TNF- α ($p=0.007$) e TNF- β ($p=0.036$) in the CIN and cervical cancer groups when compared to normal control. Once again, it was not observed statistical differences between TLR 3 among the three groups.

Conclusion: There might be an association between TOLL like receptors 2 and 4 pathways with the imunological response of tumor necrosis factors α and β . Those markers are also expressed in higher levels in cervical cancer and pre malignant lesions when compared to normal controls. The TOLL like receptor 3 was not associated with tumor necrosis factors. There were no differences between the level of expression among cervical cancer, CIN and controls groups

LISTA DE SIGLAS

ACOG	The American College of Obstetricians and Gynecologists
CAF	Cirurgia por alta frequência
CCE	Carcinoma de células escamosas
cm	Centímetros
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
EGF	Fator de crescimento epidérmico
FIGO	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
H₂O₂	Água oxigenada
HPV	Papilomavírus Humano
INCA	Instituto Nacional do Câncer
INF	Interferons
ISCC	Invasive cervical squamous cell carcinoma
mm	Milímetros
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
PRR	Receptores de reconhecimento padrão
TLR	Receptores TOLL Símile
TNF	Fator de necrose Tumoral
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
WHO	World Health Organization

Lista de Figuras

Figura 1: cascata de sinalização dos receptores TLR4 e TLR2.....	19
Figura 2: cascata de sinalização do TNF.....	23
Figura 3: FIGURE 1 no artigo: Expression levels of TLR2 in, control, CIN and cervical cancer tissues.....	38
Figura 4: FIGURE 2 do artigo: Expression levels of TLR4 in normal, CIN and cervical cancer tissues.....	39
Figura 5: FIGURE 3 do artigo: Expression levels of TNF- α in normal, CIN and cervical cancer tissues.....	40
Figura 6: FIGURE 4 do artigo: Expression levels of TNF- β in normal, CIN and cervical cancer tissues.....	41
Figura 7: FIGURE 5 do artigo: Expression levels of TLR3 in normal, CIN and cervical cancer tissues.....	42
Figura 8: Coloração por imuno-histoquímica dos receptores TLR3 e TLR4 nos grupos controle, NICs e câncer de colo.....	54

Lista de Tabelas

Tabela 1: Table 1.do artigo: Association between the level of expression of TLR2, TLR3 and TLR4 with levels of TNF- α and TNF- β in cervical tissues.....	37
---	----

I- INTRODUÇÃO

1.1 Generalidades

1.1.1 Câncer de colo uterino

Uma das descobertas científicas mais importantes nos últimos 30 anos foi a ligação causal entre a infecção por papiloma vírus humano (HPV) no colo uterino e o câncer cervical. O papiloma vírus humano (HPV) apresenta mais de 100 tipos identificados incluindo 13 tipos considerados de alto risco que são os responsáveis pelo desenvolvimento de neoplasias cervicais, anorretais e orofaríngeas. (Crosbie *et al.*, 2013) Mais de 85% desses óbitos ocorrem em países em desenvolvimento (Parkin, B *et al.* 2005). No Brasil, em 2013, representou a segunda causa de morte por câncer em mulheres com 4.800 óbitos. Além disso, 18.430 novos casos de câncer do colo uterino são diagnosticados a cada ano, com um risco estimado de 17 casos a cada 100 mil mulheres (Brazil), 2013).

A infecção persistente pelo Papilomavírus (HPV) é fundamental para carcinogênese cervical (Spriggs e Boddington, 1980; Ferenczy e Franco, 2002), entretanto, não é condição suficiente. A interação do HPV com o sistema imunológico do hospedeiro é um ponto crucial na evolução da infecção para a cura ou persistência. Através da infecção persistente o HPV se utiliza de vários mecanismos moleculares de interação com a resposta imune do hospedeiro que visam sua multiplicação (Lages *et al.*, 2011). Durante essa interação podem ocorrer alterações genéticas e epigenéticas que são passos necessários para a transformação e progressão neoplásica (Silva-Filho *et al.*, 2004), pois é através desses eventos que ocorrem a perda do controle da multiplicação celular, a

instabilidade genômica e a falha nos mecanismos de controle do ciclo celular (Del Mare, Salah e Aqeilan, 2009).

O prognóstico do câncer de colo uterino está associado a características individuais como idade e também fatores relacionados ao próprio tumor. Dentre estes tem importância o estadiamento, o volume tumoral, o tipo histológico e o grau de diferenciação, a invasão do corpo uterino e a profundidade da invasão estromal, a invasão linfovascular e a presença de metástases linfonodais (Waggoner, 2003; Silva-Filho *et al.*, 2005). Ainda assim, o CCE invasor do colo uterino possui evolução clínica variável. No estágio IB, a sobrevida em 05 anos pode variar de 65 a 95% (Gynecologists, 2003). Portanto, a identificação de biomarcadores com aplicação clínica e potencial prognóstico também é importante, auxiliando na adoção de um tratamento primário mais agressivo ou na avaliação do benefício de terapia adjuvante.

Desse modo, para uma melhor compreensão do processo de carcinogênese cervical deve-se investigar um dos pontos cruciais na interação molecular do vírus com o hospedeiro que é permeado pela resposta imunológico-inflamatória.

1.1.2 Carcinogênese

O processo de carcinogênese é complexo e envolve alterações genéticas sequenciais e somáticas, incluindo ativação de oncogenes e inativação de genes supressores tumorais. Essas alterações são essenciais tanto nos estágios iniciais da neoplasia como na progressão tumoral (Hanahan D *et. al.*, 2000; Hahn WC, *et. al.*, 2002).

Os genes supressores tumorais regulam a divisão, a proliferação e a apoptose celular e, desse modo, impedem o desenvolvimento de tumores (Hahn WC, *et. al.* 2002). A avaliação da expressão desses genes amplia o conceito da carcinogênese e permite o diagnóstico mais precoce das transformações neoplásicas (Lliopoulos *et. al.* 2006). Além disso, o envolvimento de genes supressores tumorais específicos durante o

processo do desenvolvimento e a progressão neoplásica, podem originar tumores de diferentes comportamentos clínicos, respostas terapêuticas heterogêneas, e, portanto, de prognósticos variáveis (Del Mare et. al. 2009).

1.2.1 O receptor TOLL símile (TLR)

Os receptores TOLL-Símile (TLR) são moléculas de superfície e endossomais, altamente conservadas evolutivamente, presentes nas células de defesa do hospedeiro, responsáveis pelo reconhecimento de estruturas microbianas e na geração de sinais, que levam à produção de citocinas pro inflamatórias essenciais para a ativação das respostas imunes inatas.

Sua descoberta se deu na década de 1990, com papel de proteção das moscas do gênero *Drosophila* contra as infecções fúngicas. Em humanos foi caracterizado um homólogo da proteína TOLL no ano de 1997 recebendo a denominação de receptor TOLL-Símile.

Dez homólogos da proteína TOLL já foram identificados em humanos cada um com diferentes funções específicas para determinado componente microbiano. Embora os receptores TOLL-Símile desempenhem um papel primordial na defesa do hospedeiro contra os processos infecciosos e inflamatórios, deve haver um equilíbrio entre a ativação e inativação destes receptores para evitar uma resposta inflamatória ou imunológica excessiva seja daninha ao hospedeiro.

De maneira geral, os TLRs responsáveis pelo reconhecimento de ácidos nucleicos (TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9), localizam-se no compartimento endossomal enquanto os TLRs que detectam antígenos lipoprotéicos (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 e TLR6),

localizam-se na superfície das células. Exceção ao padrão são os TLR2 e TLR10 que podem apresentar localização mista, ou seja, endossomal e de superfície. (Jinushi, 2012)

Os receptores TOLL-Símile são ditos receptores de reconhecimento padrão (PRR) presentes nos macrófagos, nas células dendríticas e nos neutrófilos (leucócitos polimorfonucleares ou PMN), responsáveis pelo reconhecimento dos padrões moleculares associados a patógenos (PAMP), que são epítomos expressos comumente por bactérias, vírus, protozoários e fungos, que podem ser estruturas lipoprotéicas assim como ácidos nucleicos.

A ativação PRR-PAMP faz parte da resposta imune inata do organismo que é a primeira linha de defesa contra patógenos. Posteriormente colaborando também para o desenvolvimento da imunidade adquirida contra os antígenos específicos.

Cada receptor TOLL-Símile tem sua própria via de sinalização intrínseca e induz respostas biológicas específicas contra microrganismos. Quando algum PAMP é reconhecido por algum receptor TOLL-Símile específico, a proteína MyD88 recruta as cinases associadas ao receptor da interleucina-1 (IRAK-1 e IRAK-4) para ativar o fator 6 associado ao receptor do fator de necrose tumoral (TRAF6). Este ativa o fator de crescimento β associado à cinase-1 (TAK1), que, por sua vez, promove a ativação do complexo IKK formado por duas subunidades catalíticas (IKK α e IKK β) e por uma subunidade regulatória (NEMO/IKK γ). Este complexo promove a fosforilação do I κ B e a sua degradação resulta nos fatores de transcrição nucleares (NF- κ B), que será translocado ao núcleo para induzir a expressão das citocinas inflamatórias e das moléculas de adesão. FIGURA 1

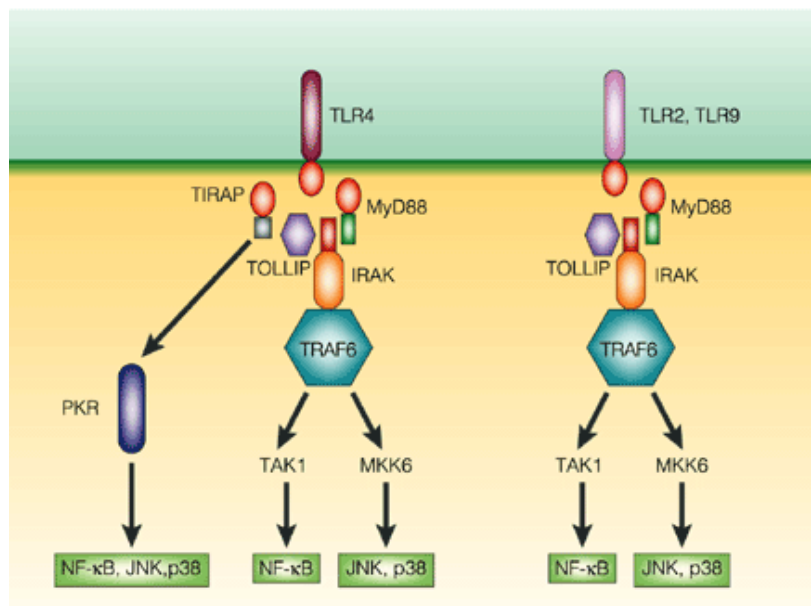


Figura 1: cascata de sinalização do receptor TLR4 e TLR2

1.2.2 Receptores TOLL símile e câncer

Os receptores TOLL-Símile apresentaram associação positiva com diversos tipos de câncer. A primeira observação da associação veio de que a injeção de ligantes dos TLR ao tecido tumoral apresentava efeito antitumoral (Coley, 1991; Kikkawa *et al.*, 1993). Dentre esses ligantes destacam-se os Lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos que sabidamente ativam o TLR 4. O uso de LPS foi testado no tratamento de neoplasia cervical, gástrica e orofaríngea e em todos os casos apresentou efeitos antiproliferativos, quando injetados dentro do tumor. Por outro lado, a injeção intraperitoneal de LPS em pacientes com neoplasia de cólon metastática, relaciona-se com aumento da proliferação celular. (Luo *et al.*, 2004). E ainda, ratos deficientes da proteína MYD88 que são importantes componentes da cascata de sinalização dos TLR, apresentavam menor incidência de cancer de cólon e além disso desenvolviam tumores de menores dimensões em média (Rakoff-Nahoum e Medzhitov, 2007). Além disso, uma maior expressão de TLR4 relaciona-se com a neoplasia epitelial ovariana estimulando o

crescimento tumoral e levando quimiorresistência (Kelly *et al.*, 2006). Os níveis de expressão mais elevados de TLR4 estão também relacionados a um maior potencial metastático no câncer prostático, assim como um estadiamento mais avançado no carcinoma escamocelular de cabeça e pescoço.(Hua *et al.*, 2009; Szczepanski *et al.*, 2009).

No cancer de mama,a injeção sistêmica de LPS aumenta a angiogênese tumoral, migração celular e invasão tecidual do tumor. (Harmey *et al.*, 2002). Foi observado que no microambiente tumoral da neoplasia mamária, aproximadamente vinte por cento das células mononucleares expressam TLR4 . Também são expressas TLR3 e TLR9 em quantidades expressivas, principalmente em tumores mais agressivos. (González-Reyes *et al.*, 2010). Por outro lado ratos “*knockdown*” para TLR4 mostraram redução na viabilidade das células tumorais diminuindo a persistência e proliferação do câncer de mama.(Yang *et al.*, 2010).

O estudo de polimorfismos relevantes nos genes que codificam vários tipos de TLRs mostraram influência na progressão natural de vários tipos de câncer , mesmo aqueles tumores que não possuem etiologia infecciosa. Os polimorfismos influenciam também a resposta a quimioterapia e imunoterapia em graus variáveis.(Jinushi, 2012)

Do acima exposto conclui-se que , os receptores TOLL símile, principalmente o TLR4, parecem se relacionar com o câncer de forma dual: enquanto o estímulo desses receptores nas células tumorais parece inibir o crescimento tumoral, sua estimulação nas células imunes parece favorecer seu crescimento, invasão e criação de metástases.

1.2.3 Receptores TOLL Símile e câncer de colo uterino

A cadeia dupla de DNA do vírus HPV é reconhecida pelos receptores TOLL símile e em seguida a cascata de interferons ($\text{INF-}\alpha$, $\text{INF-}\beta$, e $\text{INF-}\gamma$) é ativada. Tanto os receptores TOLL símile quanto a cascata de interferons são alvos das oncoproteínas do HPV levando a uma expressão aberrante dessas proteínas. O resultado é uma replicação viral mais intensa que favorece a transformação neoplásica.

Com a progressão da doença, a presença de HPV no epitélio cervical leva a uma expressão aumentada dos receptores TOLL símile no estroma subjacente o que aumenta a produção de interferons ali. Entretanto, a resposta imune encontra-se diminuída no epitélio devido a ação das oncoproteínas virais. Desta forma, o HPV que se encontra no epitélio foge do ataque imunológico e ao mesmo tempo cria um microambiente favorável à sua malignização no estroma. (Decarlo *et al.*, 2012).

Polimorfismos nos genes dos receptores TOLL símile também estão associados com uma maior susceptibilidade ao câncer cervical, principalmente os tipos TLR2, TLR3, TLR4 e TLR9 (Pandey *et al.*, 2009; Pandey *et al.*, 2011).

Especificamente, os receptores TLR4 e TLR7 apresentam maior expressão por imunohistoquímica em lesões cervicais pré-malignas e no câncer cervical e, além disso, esse aumento na expressão dos receptores é um preditor da progressão e agressividade tumoral. (Hasimu *et al.*, 2011). Também a expressão do receptor TLR9 aumenta conforme o grau de malignidade das lesões cervicais. (Lee *et al.*, 2007). A infecção persistente pelo HPV 16 por sua vez está relacionada com um aumento insuficiente na expressão de receptores TOLL símile quantificada pela reação em cadeia da polimerase (Daud *et al.*, 2011).

Assim, se pode concluir que os receptores TOLL símile são importantes para a primeira linha de defesa contra a infecção por HPV e os indivíduos que são incapazes de

produzir níveis satisfatórios de TLR apresentam maiores chances de adquirir uma infecção persistente pelo HPV. Entretanto uma vez estabelecida a infecção, o vírus HPV se utiliza da expressão aberrante e aumentada dos TLR para favorecer a carcinogênese e a progressão tumoral.

1.3.1 Fatores de necrose tumoral α e β

Os fatores de necrose tumoral (TNF- α e TNF- β) desempenham um papel central na resposta imune adaptativa. Eles são secretados principalmente por macrófagos ativadas e promovem a defesa do hospedeiro através da ativação do processo inflamatório. (Li *et al.*, 2013). Por isso mesmo desempenham papel chave na resposta antibacteriana, antiviral e antiparasitária no organismo humano. A expressão dessas citocinas nos queratinócitos se eleva em resposta ao trauma, inflamação, infecção viral e radiação ultra violeta (Termini *et al.*, 2008). O nome fator de necrose tumoral deriva da observação de três diferentes efeitos biológicos dessas substâncias. Primeiro; necrose hemorrágica provocada no endotélio tumoral. Segundo; imunomodulação realizada sobre outras células imunitárias. Terceiro; efeito citotóxico direto sobre células tumorais. Entretanto, paradoxalmente ao seu nome, essas substâncias podem apresentar efeitos que na verdade promovem o crescimento tumoral assim como a metastatização. (Diaconu *et al.*, 2008)

Duas grandes cascatas de sinalização podem ser ativadas pela ação dos fatores de necrose tumoral em seus receptores. O estímulo do receptor tipo um incluído no grupo dos receptores chamados de receptores da morte leva a apoptose da célula através da ação do domínio citoplasmático chamado de FADD que ativa as caspases. A outra cascata ativada após a ligação com o receptor é a cascata inflamatória que também

inicialmente ativa o domínio citoplasmático FADD que em seguida recruta os domínios TRAF2 e RIP que após uma complexa e ainda não completamente desvendada série de reações moleculares ativa o domínio NF- κ B que desempenha um papel chave na indução da transcrição de vários genes ligados a resposta inflamatória. FIGURA 2

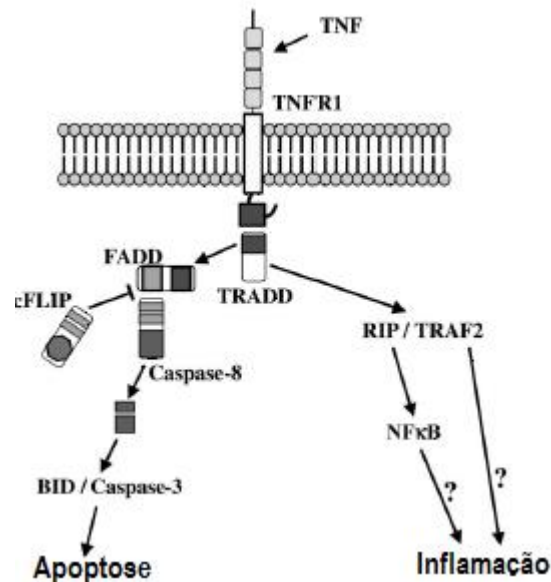


Figura 2: cascata de sinalização do TNF

1.3.2 Associação entre Fatores de Necrose Tumoral e câncer cervical

Os fatores de necrose tumoral apresentam efeitos controversos sobre células neoplásicas. Eles podem levar à citólise de algumas linhagens celulares sendo inclusive testados como tratamento para câncer em alguns estudos. De maneira oposta os fatores de necrose tumoral podem estimular células neoplásicas o que levou ao uso de algumas drogas anti-TNF para o tratamento oncológico.

Outro ponto importante que evidencia a relação dos fatores de necrose tumoral com o processo carcinogênese é o achado de que polimorfismos genéticos para TNF- α se associam com susceptibilidade a vários tipos de cânceres incluindo o câncer de mama, hepatocarcinoma, mieloma múltiplo e câncer de pulmão.

No processo de carcinogênese cervical especificamente, os fatores de necrose tumoral parecem influenciá-lo em diferentes níveis. Primeiro, promovendo a divisão e proliferação celular por aumentar a atividade das enzimas quinase ciclina-dependentes. Segundo, modulando a expressão do RNA das proteínas E6/ E7 do HPV16. (Diaconu *et al.*, 2008). Terceiro, aumentando a transcrição do fator de crescimento epidérmico (EGF).

Essas ações levam as células neoplásicas se tornarem resistentes ao efeito citotóxico dos TNFs o que favorece ainda mais a proliferação celular e a invasão tecidual. (Diaconu *et al.*, 2008) Essa resistência é mediada pela proteína E7 do vírus HPV que induz a supra regulação de um grupo de genes associados com a progressão da divisão celular (Termini *et al.*, 2008; Boccardo *et al.*, 2010).

A resistência aos TNF em lesões cervicais pode ser clinicamente comprovada, pois os níveis séricos de TNF- α de mulheres com neoplasia intraepitelial cervical (NIC) estão mais elevados em relação à mulheres saudáveis. (Lee *et al.*, 2009). Além disso, culturas de queratinócitos imortalizados derivados de tumores positivos para HPV 16 e HPV 18 continuam a crescer mesmo na presença dos fatores de necrose tumoral(Termini *et al.*, 2008).

Do acima exposto, fica claro que a resistência aos fatores de necrose tumoral adquirida pelo vírus HPV no processo de carcinogênese cervical é um ponto crucial no desfecho dessa neoplasia, apesar dos pormenores da base molecular subjacente não estejam ainda completamente clarificados.

1.4 Associação entre Receptores TOLL Símile e Fatores de Necrose Tumoral

Em um contexto inflamatório não neoplásico, a associação entre a via dos receptores TOLL símile e a via dos fatores de necrose tumoral já é conhecida. No sistema nervoso

central, a expressão de TLR2 e TLR4 se torna supra regulada ao nível da transcrição gênica como consequência da exposição do tecido ao TNF- α *in vitro e in vivo*. Essas mesmas células neurais quando expostas a agonistas de TLR2 e TLR4 produzem e secretam TNF- α .(Covacu *et al.*, 2009). Quando tecidos neurais são expostos ao um agente infeccioso como o *estafilococos aureus*, o TNF- α atua de maneira autócrina e parácrina levando a uma expressão maior de TLR2 na micróglia. (Syed, Phulwani e Kielian, 2007).

Já nas síndromes coronarianas agudas, a expressão de TLR4 assim como os níveis séricos de TNF- α estão aumentados e os mesmos correlacionam entre si.(Xie *et al.*, 2010). No choque séptico, o TNF- α afeta a expressão de TLR4 a nível molecular atuando como um modulador da resposta inflamatória (Lin e Yeh, 2005).

1.5 Justificativa do estudo

Pelo acima exposto percebe-se que o sistema imunológico desempenha um papel central no processo de carcinogênese e disseminação tumoral. Tanto os receptores TOLL símile como os Fatores de necrose tumoral estão entre os componentes mais ativos no processo neoplásico quando analisados separadamente. No entanto, apesar de haver uma clara associação entre essas duas vias imunológicas em um contexto inflamatório não neoplásico, essa associação nunca foi testada no processo neoplásico cervical. Essa associação uma vez confirmada pode abrir novos horizontes no que diz respeito a possíveis novos sítios de tratamento, acompanhamento e até mesmo diagnóstico.

2-Objetivos

2.1 Objetivo geral

- Avaliar a associação das vias imunológicas dos receptores TOLL símile com a via inflamatória dos fatores de necrose tumoral em lesões cervicais pré-invasoras e no câncer cervical.

2.1 Objetivo específico

- Comparar os níveis de expressão de TLR2, TLR3, TLR4, TNF- α , TNF- β por imuno-histoquímica em lâminas de tecido cervical entre o grupo controle, mulheres com neoplasia intraepitelial (NIC), e carcinoma de células escamosas.

3-Artigo

Association between Toll Like Receptors and Tumor Necrosis Factors immunological pathways in cervical lesions and cervical cancer

Abstract

Immune system plays a critical role on the defense against the HPV infection or its persistence. The carcinogenesis process is a result of the continuous pressure exerted on the developing tumor by the immune system [1]. The Toll Like receptors (TLR) are membrane receptors responsible for an activation of innate immune response and it was shown an association between TLR expression and cervical cancer. Tumor necrosis factors are one of the main mediators of skin and mucosa inflammation and they may influence the fate of HPV infected cells and they also could favor malignant cervical cells invasion. The aim of this study was to demonstrate the association between TLR and TNF immune pathways in cervical cancer and cervical lesions.

A total of 64 paraffin embedded tissues were obtained from gynecological procedures, including 35 specimens with cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and 10 specimens with squamous cervical cancer (SCC), as well as 19 normal cervical tissues. The expressions of TLR 2, TLR3, TLR4, TNF- α and TNF- β were measured by immunohistochemistry and were graded in low and high levels of expression. Results: There was an association between expression levels of TLR2 with TNF- α and with TNF- β (p=0.01, p=0.021, respectively) in cervical cancer and CIN groups. The expression of TLR4 was also associated with the expression of TNF- α and TNF- β (p=0.016, p=0.025 respectively) in the groups. On the other hand TLR3 was not

statistically associated with TNF α or TNF β . Conclusion: There might be an association between Toll like receptors 2 and 4 pathways with the immunological response of tumor necrosis factors α and β in cervical cancer. Those markers are also expressed in higher levels in cervical cancer and pre malignant lesions when compared to normal controls. The toll like receptor 3 was not associated with tumor necrosis factors expression. There was no difference in the level of expression of TLR3 between cervical cancer, CIN and controls.

Introduction:

Cervical cancer is an important cause of death in women worldwide [2]. In Brazil it is the second most common cancer among women. Every year, 18.430 new cases are diagnosed and about 4.800 women die annually from this condition [3]. The persistent HPV infection is recognized as the most important factor for the development of cervical cancer. Immune system plays a critical role on the defense against the HPV infection and its persistence.[4] The carcinogenesis process is a result of the continuous pressure exerted on the developing tumor by the immune system and it is known as cancer immunoediting.[1]. Innate immunity is the first line of defense against infection, before the acquired immune response is activated.

Toll like receptors belong to the innate immune system and they are able to recognize pathogen associated molecular patterns (PAMPS) and pattern recognition receptors (PRRs) promoting cytokines production by classic PI3K/Akt signaling pathway. After the TLR mediated signaling pathway is activated, proinflammatory cytokines are produced, antigen-presenting cells are activated, and innate immunity and acquired immune response are initiated. To date, 10 types of TLR were identified in humans. Of them, the TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8, and TLR9, have been demonstrated to

recognize viruses. [5] Cervical cancer appears to escape from immune surveillance of the TLR which results in a tumor microenvironment, favorable for its development and strengthened resistance to cancer chemotherapy. [6] TLR expression is emerging as an important biomarker in the development and progression of diverse neoplasia, including cervical cancer where although, the pathways are not yet completely clarified, the up regulation of certain TLRs seems to play an important role in the carcinogenesis process and they could become an attractive target for new treatments for cervical cancer.[7]

Tumor necrosis factors (TNF- α and TNF- β), have a central role in the adaptive immune response. They are mainly secreted by activated macrophages and they are able to promote the host's defense by activating the inflammatory process [8]. A moderate TNF level is necessary to maintain cell in-setting and to prevent certain diseases through regulating immune response. However, excessive TNF due to pathological conditions is associated with autoimmune diseases, infectious diseases, and malignant tumors. In cervical cancer, TNF promotes the progression of cell cycle by increasing cyclin-dependent kinase activity and HPV16 E6/E7 RNA expression in HPV-immortalized keratinocytes [9]. In addition, TNF enhances the transcription and stability of the epidermal growth factor (EGF) receptor, resulting in cell proliferation and tumorigenesis. [10] The serum level of TNF- α in women with cervical intraepithelial neoplasia (CIN) is much higher than in healthy controls, although there is no differences in the levels collected in cervical washings.[11] It seems that TNF deregulated expression favors the neoplastic cells.

An association between TLR signaling and TNF response had already been demonstrated. None of them in a neoplastic scenario. In septic shock, TLR 4 and TNF α signaling pathways collaborate to activate inflammatory cascades suggesting that these two inflammatory pathways may crosstalk in a molecular level [12]. In acute coronary

syndrome, the expression level of TLR4 has a positive correlation with serum levels of TNF- α [13]. In neuroinflammatory conditions, the central nervous system tissue exposed to TLR2 and TLR4 agonists, produce and released TNF- α protein.[14]. In the other hand, in response to neural *S. aureus* infection, TNF- α acts in an autocrine/paracrine manner to enhance TLR2 expression in microglia[15].

Although TLR and TNF signaling pathways have been previously associated to different types of cancer when studied separately we were not able find any study which associates the expression of this two pathways in any kind of neoplasia even though there is a clear association between them in many different non-neoplastic inflammatory conditions. Therefore, the aim of this study is to evaluate the TLR and TNF signaling pathways in the cervical carcinogenesis process. The expressions of the TLR2, TLR3, TLR4 and TNF- α , TNF- β were evaluated in cervical cancer and pre neoplastic lesions

Materials and Methods:

Data collection:

A total of 64 paraffin embedded tissues were obtained from gynecological procedures, including 35 specimens with cervical intraepithelial neoplasia (CIN) specimens and 10 squamous cervical cancer (SCC) specimens, as well as 19 normal cervical tissues obtained from resected uterus for benign causes, which were used as controls. Samples were selected from the Gynecology department of Federal University of Minas Gerais.

The women recruited had mean age of 40 years, ranging from 18 to 85 years old. They had a mean of 3,2 gestation ranging from 0 to 13 gestations. Eight (12.5%) patients were in menopause status. Only one patient was receiving hormonal therapy for menopause. Nineteen (29.7%) patients were using oral contraception and only 9(14.1%) patients were smokers. This study was approved in the local ethics committee.

Hematoxylin-Eosin (HE) staining

The HE staining was performed on formalin fixed and paraffin embedded samples. The samples were immersed in the filtered Harris Hematoxylin for 1 minute, after that, they were rinsed with tap water. Then, they were immersed in EOSIN stain for 1-2 minutes and again they were rinsed with tap water. The samples were dehydrated in ascending alcohol solutions (50%,70%,80%,95%, 100%) and then cleared with xylene twice.

Immunohistochemistry:

The immunohistochemical assay was performed on formalin fixed and paraffin embedded samples. Slides were conventionally dewaxed by xylene and hydrated with gradient alcohol, and antigen was then retrieved using a microwave. Endogenous peroxidase was blocked with 3% H₂O₂. Slides were incubated with primary antibody at 4°C overnight. PBS was used instead of primary antibody as a negative control. In the following day, secondary antibody was added, followed by DAB detection, hematoxylin staining, and conventional dehydration. Finally, the slides were clearly mounted. Slides were washed using PBS for 10 min between two steps. Immunohistochemical results were observed for a single experienced gynecologic pathologist. The expressions of TLR 2 , TLR3, TLR4, TNF- α and TNF- β were graded from absent to ++++ degrees according to two parameters. The darkness of the reaction in the tissue and the number of cells that presented the reaction compared with total of cells. For the analysis we considered as high levels of expression the +++ and ++++ degrees of reaction and low levels were defined as absent + or ++ degrees of reaction. This classification was made in accordance with previous studies.[6, 16]

Statistical analysis:

The Pearson Chi-Square was used to verify an association between the level of expression of TLR2, TLR3, TLR4 and the levels of expression of TNF- α and TNF- β . The Likelihood Ratio Test was used to determine whether the three groups expressed different levels of TLR2, TLR3, TLR4, TNF- α and TNF- β . Fisher's exact test was used for multiple comparisons between each two of the control, CIN, and CSCC groups. All the values presented in this study were two-sided and the significance level was set to less than 0.05. All of the statistical analyses were performed using SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, Ill, USA).

Results:

There is an association, in cervical tissues, of the expression levels of TLR2 with the expression levels of TNF- α and TNF- β ($p=0.010$ and $p=0.021$, respectively). There is also an association between the expression of TLR4 with expression of TNF- α and TNF- β , in normal, CIN and SCC tissues ($p=0.016$ and $p=0.025$ respectively). There is no association between the expression of TLR3 with TNF- α and TNF- β . ($p=0.513$ and $p=0.135$ respectively). Table 1

Cervical tissues with CIN and SCC had significantly higher levels of TLR2 compared with control ($p=0.032$). In the control group, 73% of the women had low levels of TLR2 and 27% had high levels. In the CIN group 31% had low levels and 69 % had high levels. In the SCC, 20 % of tissues had low levels and 80% had high levels of TLR2.

FIGURE 1

The expression levels of TLR4 are higher in the CIN and SCC groups when compared with the controls ($P<0.001$). All tissues in the SCC group and 15.4% in the CIN group had high levels of TLR4 while none of them had in the control group. FIGURE 2

Tissues in the CIN and in the SCC group had, significantly, higher levels of expression of TNF- α when compared with controls. ($p=0.007$). In the control group, 93% of the specimens expressed low levels of TNF- α while 61% in the CIN group and 50% in the SCC group expressed high levels of TNF- α . FIGURE 3

Tissues in the CIN and SCC groups expressed significantly higher levels of TNF- β ($p=0.036$). While 87% of the tissues in the control group expressed low levels of TNF- β , in the CIN and SCC groups expressed 69% and 50% tissues with high levels of TNF- β . FIGURE 4

There was no difference of TR3 expression between women with benign cervix, CIN and SCC ($p=0.150$) FIGURE 5

Discussion

This study showed for the first time that there is an association between the levels of expression of TLR2 and TLR4 with TNF- α and TNF- β expression in the cervical lesions and cervical cancer. There was no association between TLR3 levels with TNF- α and TNF- β expression.

It was already known that in non-neoplastic inflammatory conditions the TLR signaling cascade seems to correlate with the TNF- α pro-inflammatory pathway. In central nervous system, the expression of TLR2 and TLR4 was transcriptionally up-regulated as a consequence to inflammatory exposure of TNF- α in vitro and in vivo. Most importantly, neural system cells exposed to TLR2 and TLR4 agonists produced and released TNF- α protein [14, 15]. In central nervous tissues exposed to *S. aureus*, TNF- α acts in an autocrine/paracrine manner to enhance TLR2 expression in microglia[15]. In another inflammatory condition, the septic shock, TNF- α can affect the expression level of TLR4, suggesting that TNF- α may regulate the inflammatory response by

modulating TLR4 expression in molecular level [12]. In acute coronary syndromes, the expression of TLR4 and the serum level of TNF- α are high and they correlate to each other [13].

In our study, the same association between TLR and TNF- α expression was observed. It seems that HPV infection stimulates TLR2 and TLR4 expression that enhances the TNF- α production resulting in a pro inflammatory microenvironment. [6] The pathways involved in the virus scape from immune attack are not yet totally understood, but it seems that despite of activation of these inflammatory pathways in cervical lesions, the resulting inflammation is not able clear the virus infection, contrarily, it seems to favor it. The results are alteration in oncogenes and tumor suppressor gene, abnormal cell adhesion molecules and, finally, carcinogenesis.

Pre-malignant cervical lesions and cervical cancer had higher levels of expression of TLR2, TLR4, TNF- α and TNF- β , when compared to controls, in this study. In the other hand, TLR3 levels were not differently expressed between the groups.

These results are in accordance with the previous studies. The expression of several TLRs including TLR2, TLR4, TLR7 and TLR9 by some kinds of malignant cells may influence cancer progression in a direct fashion rather than as a consequence of immunological effects. [17]

Specifically in cervical cancer, TLR4 and TLR7 upregulation, quantified by immunohistochemistry, was shown to be an important predictor of cervical cancer progression significantly correlating with SCC differentiation [6]

Interestingly, the HPV- 16 persistence seems to be related with dampened TLR expression, measured by quantitative reverse transcription-PCR. [18]. These findings suggest that TLR are important for the first line of immune defense and those women that are not able to produce enough levels of TLR have higher chances to have

persistent infection. In the other hand, once the infection is established, TLRs are expressed in higher levels in pre-malignant lesions and cervical cancer suggesting that the virus uses the TLR immune response favoring the carcinogenesis.

The transition from infection to viral clearance as well as the development of HPV-related lesions is influenced by local cell-mediated immune response. There is a complex panel of interactions between these cells. Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) is an extraordinarily pleiotropic cytokine with a central role in immune homeostasis, inflammation, and host defense.[19] It is also involved in the defense against HPV infection, modulating viral replication[8] . However, tumors can become TNF- α resistant and eventually most malignant tumors become TNF- α resistant. In fact, some malignant tumors can escape from TNF- α -induced cell death suggesting that HPV mediated TNF resistance is a key event in the multi-step process leading to cervical cancer.[19-21].

It is a study with a small number of cases; however, the results could reach a statistical significance. The quantification of the expression of the markers was made by a immunohistochemistry which is less precise method than the quantitative reverse transcription (PCR), but as it was the first study about the subject, it was decided to use a immunohistochemistry as the first attempt to demonstrate the association.

The immune pathways and their association in the carcinogenesis process are much more comprehensive than these two pathways that have been studied but here the association was demonstrated for the first time in a neoplastic condition. It helps to understand the immune mechanisms involved in cervical cancer development.

Although the signaling pathways related to cervical carcinogenesis are not yet completely clarified, the TLRs and TNF immune pathways could be considered to be attractive targets for new treatments or new prognosis factors for cervical cancer [22].

Understanding the immunological mechanisms that underpin natural viral clearance and disease regression is needed to inform design of a therapeutic vaccine.

The aim of this study was to demonstrate the association between TLR and TNF immune pathways. These two important immune cascades are expressed in higher levels in cervical lesions and cervical cancer and their levels are statistically associated. This study highlights the importance of further studies to facilitate a greater understanding of biological processes and how the immunologic system pathways can help in prognosis and monitoring of patients.

Tables and Figures Legends:

Table 1.

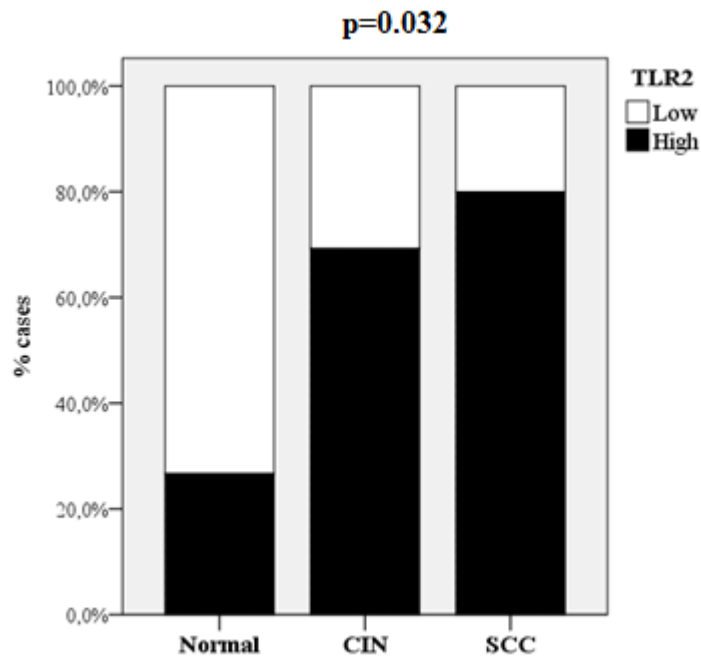
Association between the level of expression of TLR2, TLR3 and TLR4 with levels of TNF- α and TNF- β in cervical tissues

	TNF- α		p	TNF- β		p
	High n (%)	Low n(%)		High n(%)	Low n(%)	
TLR2			0.010			0.021
High	13(20.3)	15(9.4)		13(20.3)	15(24.2)	
Low	6(3.1)	30(67.2)		7(10.9)	29(44.6)	
TLR3	n (%)	n(%)	0.513	n(%)	n(%)	0.135
High	0(0)	1(1.6)		1(1.6)	0(0)	
Low	19(29.7)	44(68.7)		19(29.7)	44(68.7)	
TLR4	n (%)		0.016			0.025
High	7(11.0)	5(7.8)		7(11.0)	5(7.8)	
Low	12(18.7)	40(62.5)		13(20.3)	39(61.0)	

TLR2=Toll like receptor 2, TLR3 Toll like receptor 3, TLR4= Toll like receptor 4, TNF- α = Tumor necrosis factor α , TNF- β = Tumor necrosis factor β Values are expressed as absolute numbers and percentage (%). Association between the markers were evaluated chi square test

FIGURE 1:

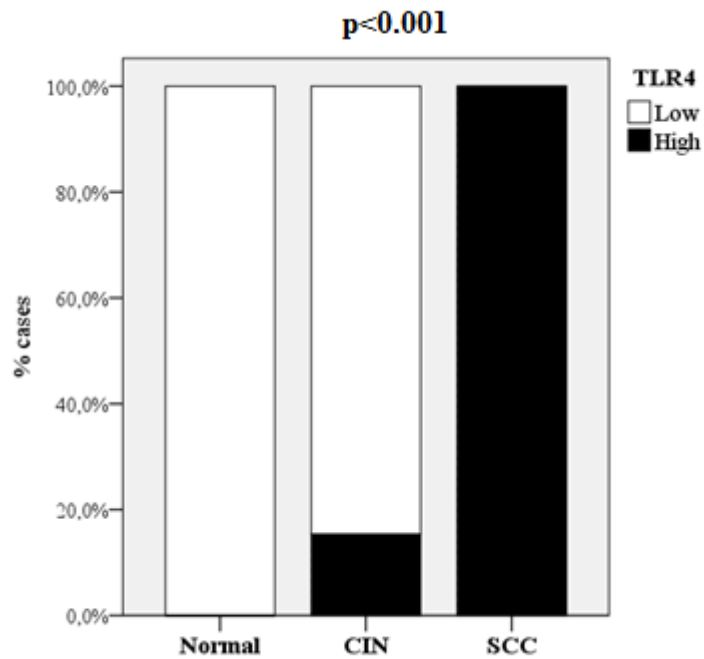
Expression levels of TLR2 in, normal, CIN and cervical cancer tissues



Note that tissues with CIN and SCC had significantly higher levels of TLR2 compared with control ($p=0.032$). In the control group, 73% of the women had low levels of TLR2 and 27% had high levels of TLR2. In the CIN group 31% had low levels and 69% of the women had high levels. In the SCC the results showed 20% of women with low levels and 80% with high levels of TLR2.

FIGURE 2:

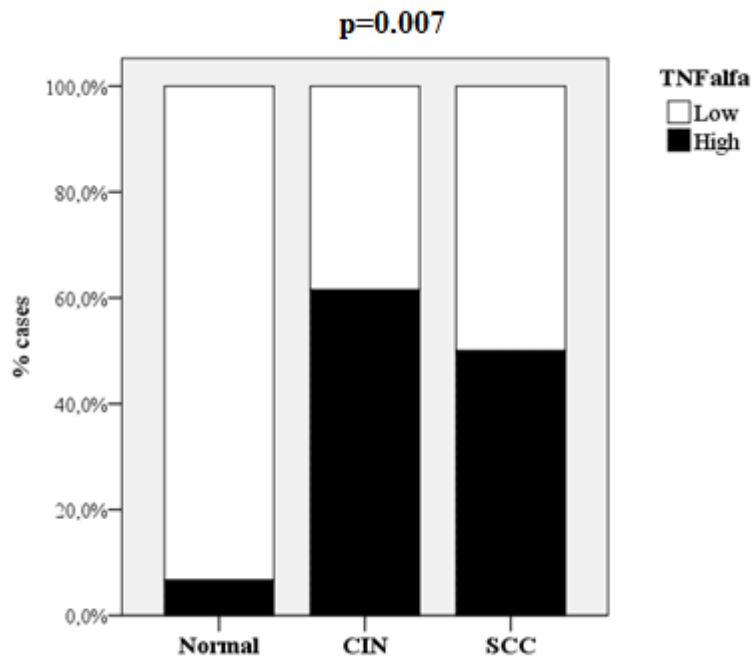
Expression levels of TLR4 in normal, CIN and cervical cancer tissues



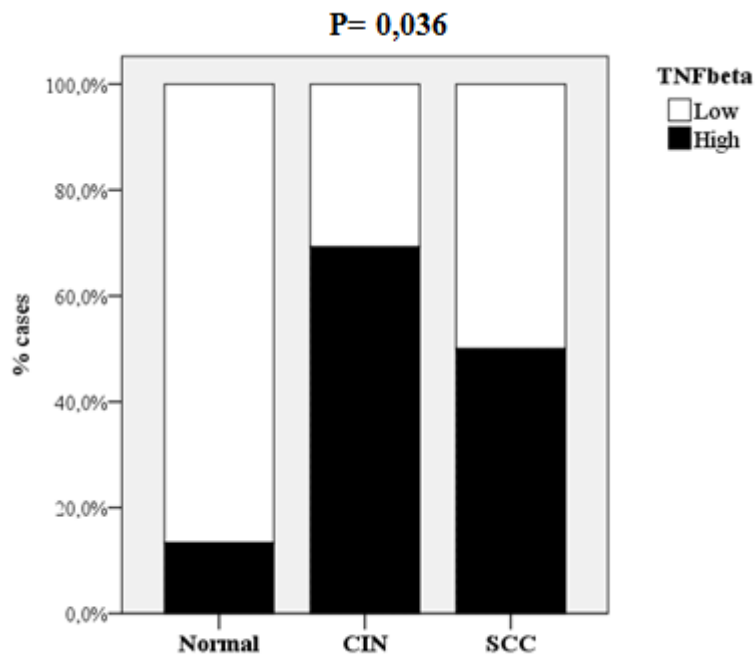
Note that the expression levels of TLR4 in the Immunohistochemical are higher in the CIN and SCC groups when compared with the controls ($P<0.001$). All women in the SCC group and 15.4% in the CIN group had high levels of TLR4 while none of them had in the control group

FIGURE 3:

Expression levels of TNF- α in normal, CIN and cervical cancer tissues:



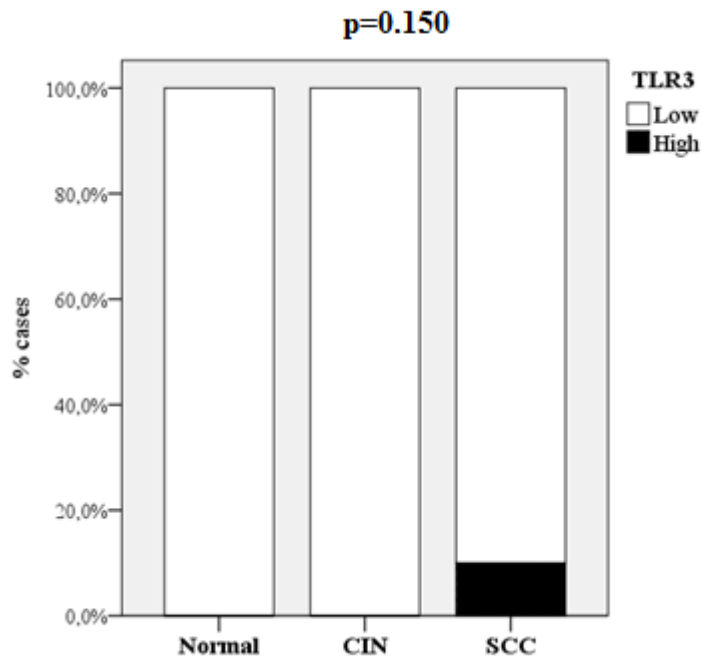
Tissues in the CIN and in the SCC group had, significantly, higher levels of expression of TNF- α in the tissues analyzed when compared with controls. ($p=0.007$). In the control group, 93% of the specimens expressed low levels of TNF- α while 61 in the CIN group and 50% in the SCC group expressed high levels of TNF- α .

FIGURE 4:Expression levels of TNF- β in normal, CIN and cervical cancer tissues

Tissues in the CIN and SCC groups expressed significantly higher levels of TNF- β ($p=0.036$). While 87% of the tissues in the control group expressed low levels of TNF- β , in the CIN and SCC groups expressed 69% and 50% tissues with high levels of TNF- β

FIGURE 5:

Expression levels of TLR3 in normal, CIN and cervical cancer tissues



Note that it wasn't observed any statistical difference between the groups ($p=0.150$). All tissues in the control group and in the CIN group had low levels of TLR3. In the SCC group, 10 % presented high levels of TLR3 but without significance.

References

1. Dunn, G.P., et al., Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*, 2002. 3(11): p. 991-8.
2. Parkin, D.M., et al., Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer*, 2001. 94(2): p. 153-6.
3. Brazil, E.s.o.I.I.d.C.o. 2013: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home+/colo_uterio/definicao.
4. Lages, E.L., et al., Analysis of systemic inflammatory response in the carcinogenic process of uterine cervical neoplasia. *Biomed Pharmacother*, 2011. 65(7): p. 496-9.
5. FERRAZ, E.G., et al., Toll-Like Receptors: regulation of the immune responses. jul-sep 2011, *RGO - Rev Gaúcha Odontol: Porto Alegre Brazil*. p. 483-490.
6. Hasimu, A., et al., Expressions of Toll-like receptors 3, 4, 7 and 9 in cervical lesions and their correlation with HPV 16 infection in Uighur women. 2011, *Chinese Journal of Cancer*. p. 344-350.
7. Crosbie, E.J., et al., Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*, 2013. 382(9895): p. 889-99.
8. Li, M., et al., Tumor Necrosis Factor Alpha rs1800629 Polymorphism and Risk of Cervical Lesions: A Meta-Analysis. *PLoS One*, 2013. 8(8): p. e69201.
9. Diaconu, N.C., et al., Cervical squamous carcinoma cells are resistant to the combined action of tumor necrosis factor-alpha and histamine whereas normal keratinocytes undergo cytolysis. *BMC Cancer*, 2008. 8: p. 46.
10. Wang, N., et al., TNF-alpha rs1800629 polymorphism is not associated with HPV infection or cervical cancer in the Chinese population. *PLoS One*, 2012. 7(9): p. e45246.
11. Lee, D.W., et al., Expression of interleukin-5 and tumor necrosis factor alpha in cervical carcinoma. *Clin Vaccine Immunol*, 2009. 16(6): p. 959-61.
12. Lin, W.J. and W.C. Yeh, Implication of Toll-like receptor and tumor necrosis factor alpha signaling in septic shock. *Shock*, 2005. 24(3): p. 206-9.

13. Xie, P., et al., Expression of toll-like receptor 4, tumor necrosis factor- alpha, matrix metalloproteinase-9 and effects of benazepril in patients with acute coronary syndromes. *Clin Med Insights Cardiol*, 2010. 4: p. 89-93.
14. Covacu, R., et al., TLR activation induces TNF-alpha production from adult neural stem/progenitor cells. *J Immunol*, 2009. 182(11): p. 6889-95.
15. Syed, M.M., N.K. Phulwani, and T. Kielian, Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) regulates Toll-like receptor 2 (TLR2) expression in microglia. *J Neurochem*, 2007. 103(4): p. 1461-71.
16. Werner, J., et al., Expression of integrins and Toll-like receptors in cervical cancer: effect of infectious agents. *Innate Immun*, 2012. 18(1): p. 55-69.
17. Vacchelli, E., et al., Trial Watch: Toll-like receptor agonists for cancer therapy. *Oncoimmunology*, 2013. 2(8): p. e25238.
18. Daud, I.I., et al., Association between toll-like receptor expression and human papillomavirus type 16 persistence. *Int J Cancer*, 2011. 128(4): p. 879-86.
19. Boccardo, E., et al., Expression of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein alters keratinocytes expression profile in response to tumor necrosis factor-alpha. *Carcinogenesis*, 2010. 31(3): p. 521-31.
20. Lee, K., et al., Parkin induces apoptotic cell death in TNF- α -treated cervical cancer cells. *BMB Rep*, 2012. 45(9): p. 526-31.
21. Termini, L., et al., Characterization of global transcription profile of normal and HPV-immortalized keratinocytes and their response to TNF treatment. *BMC Med Genomics*, 2008. 1: p. 29.
22. Deligeoroglou, E., et al., HPV infection: immunological aspects and their utility in future therapy. *Infect Dis Obstet Gynecol*, 2013. 2013: p. 540850.

4-Conclusões

Este estudo permite concluir que:

- Existe uma associação estatística entre os níveis de TLR2 e TLR4 com os níveis de TNF- α e TNF- β nas lesões intraepiteliais cervicais e na neoplasia cervical.
- Os níveis de expressão de TLR2, TLR4, TNF- α e TNF- β estão aumentados nas lesões intraepiteliais cervicais e no câncer de colo uterino quando comparadas ao controle.

5-Referências Bibliográficas

BOCCARDO, E. et al. Expression of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein alters keratinocytes expression profile in response to tumor necrosis factor-alpha. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 3, p. 521-31, Mar 2010. ISSN 1460-2180. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20042637> >.

BRAZIL), E. S. O. I. I. D. C. O. http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home+/colo_uterio/definicao 2013.

COLEY, W. B. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. **Clin Orthop Relat Res**, n. 262, p. 3-11, Jan 1991. ISSN 0009-921X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1984929> >.

COVACU, R. et al. TLR activation induces TNF-alpha production from adult neural stem/progenitor cells. **J Immunol**, v. 182, n. 11, p. 6889-95, Jun 2009. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19454685> >.

CROSBIE, E. J. et al. Human papillomavirus and cervical cancer. **Lancet**, v. 382, n. 9895, p. 889-99, Sep 2013. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23618600> >.

DAUD, I. I. et al. Association between toll-like receptor expression and human papillomavirus type 16 persistence. **Int J Cancer**, v. 128, n. 4, p. 879-86, Feb 2011. ISSN 1097-0215. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20473890> >.

DECARLO, C. A. et al. Toll-like receptor transcriptome in the HPV-positive cervical cancer microenvironment. **Clin Dev Immunol**, v. 2012, p. 785825, 2012. ISSN 1740-2530. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22013487> >.

DEL MARE, S.; SALAH, Z.; AQEILAN, R. I. WWOX: its genomics, partners, and functions. **J Cell Biochem**, v. 108, n. 4, p. 737-45, Nov 2009. ISSN 1097-4644. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19708029> >.

DIACONU, N. C. et al. Cervical squamous carcinoma cells are resistant to the combined action of tumor necrosis factor-alpha and histamine whereas normal keratinocytes undergo cytolysis. **BMC Cancer**, v. 8, p. 46, 2008. ISSN 1471-2407. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18257926> >.

FERENCZY, A.; FRANCO, E. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. **Lancet Oncol**, v. 3, n. 1, p. 11-6, Jan 2002. ISSN 1470-2045. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11905599> >.

GYNECOLOGISTS, A. C. O. O. A. ACOG practice bulletin. Cervical Cytology screening. Number 45, August 2003. **Int J Gynaecol Obstet**, v. 83, n. 2, p. 237-47, Nov 2003. ISSN 0020-7292. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14631934> >.

HARMEY, J. H. et al. Lipopolysaccharide-induced metastatic growth is associated with increased angiogenesis, vascular permeability and tumor cell invasion. **Int J Cancer**, v. 101, n. 5, p. 415-22, Oct 2002. ISSN 0020-7136. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12216068> >.

HASIMU, A. et al. **Expressions of Toll-like receptors 3, 4, 7 and 9 in cervical lesions and their correlation with HPV 16 infection in Uighur women**: Chinese Journal of Cancer. 30: 344-350 p. 2011.

HUA, D. et al. Small interfering RNA-directed targeting of Toll-like receptor 4 inhibits human prostate cancer cell invasion, survival, and tumorigenicity. **Mol Immunol**, v. 46, n. 15, p. 2876-84, Sep 2009. ISSN 1872-9142. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19643479> >.

JINUSHI, M. The role of innate immune signals in antitumor immunity. **Oncoimmunology**, v. 1, n. 2, p. 189-194, Mar 2012. ISSN 2162-4011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22720240> >.

KELLY, M. G. et al. TLR-4 signaling promotes tumor growth and paclitaxel chemoresistance in ovarian cancer. **Cancer Res**, v. 66, n. 7, p. 3859-68, Apr 2006. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16585214> >.

KIKKAWA, F. et al. Randomised study of immunotherapy with OK-432 in uterine cervical carcinoma. **Eur J Cancer**, v. 29A, n. 11, p. 1542-6, 1993. ISSN 0959-8049. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8217359> >.

LAGES, E. L. et al. Analysis of systemic inflammatory response in the carcinogenic process of uterine cervical neoplasia. **Biomed Pharmacother**, v. 65, n. 7, p. 496-9, Oct 2011. ISSN 1950-6007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22004597> >.

LEE, D. W. et al. Expression of interleukin-5 and tumor necrosis factor alpha in cervical carcinoma. **Clin Vaccine Immunol**, v. 16, n. 6, p. 959-61, Jun 2009. ISSN 1556-679X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19369479> >.

LEE, J. W. et al. Increased toll-like receptor 9 expression in cervical neoplasia. **Mol Carcinog**, v. 46, n. 11, p. 941-7, Nov 2007. ISSN 0899-1987. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17440926> >.

LI, M. et al. Tumor Necrosis Factor Alpha rs1800629 Polymorphism and Risk of Cervical Lesions: A Meta-Analysis. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e69201, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24015171> >.

LIN, W. J.; YEH, W. C. Implication of Toll-like receptor and tumor necrosis factor alpha signaling in septic shock. **Shock**, v. 24, n. 3, p. 206-9, Sep 2005. ISSN 1073-2322. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16135957> >.

LUO, J. L. et al. Inhibition of NF-kappaB in cancer cells converts inflammation- induced tumor growth mediated by TNFalpha to TRAIL-mediated tumor regression. **Cancer Cell**, v. 6, n. 3, p. 297-305, Sep 2004. ISSN 1535-6108. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15380520> >.

MAEHARA, Y. et al. Postoperative immunochemotherapy including streptococcal lysate OK-432 is effective for patients with gastric cancer and serosal invasion. **Am J Surg**, v. 168, n. 1, p. 36-40, Jul 1994. ISSN 0002-9610. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8024097> >.

PANDEY, S. et al. Evaluation of Toll-like receptors 3 (c.1377C/T) and 9 (G2848A) gene polymorphisms in cervical cancer susceptibility. **Mol Biol Rep**, v. 38, n. 7, p. 4715-21, Oct 2011. ISSN 1573-4978. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21132533> >.

_____. Impact of Toll-like receptors [TLR] 2 (-196 to -174 del) and TLR 4 (Asp299Gly, Thr399Ile) in cervical cancer susceptibility in North Indian women. **Gynecol Oncol**, v. 114, n. 3, p. 501-5, Sep 2009. ISSN 1095-6859. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19541348> >.

RAKOFF-NAHOUM, S.; MEDZHITOV, R. Regulation of spontaneous intestinal tumorigenesis through the adaptor protein MyD88. **Science**, v. 317, n. 5834, p. 124-7, Jul 2007. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17615359> >.

SILVA-FILHO, A. L. et al. Clinicopathological features influencing pelvic lymph node metastasis and vaginal and parametrial involvement in patients with carcinoma of the cervix. **Gynecol Obstet Invest**, v. 59, n. 2, p. 92-6, 2005. ISSN 0378-7346. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15583463> >.

_____. Expression of p53, Ki-67, and CD31 in the vaginal margins of radical hysterectomy in patients with stage IB carcinoma of the cervix. **Gynecol Oncol**, v. 95, n. 3, p. 646-54, Dec 2004. ISSN 0090-8258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15581977> >.

SPRIGGS, A. I.; BODDINGTON, M. M. Progression and regression of cervical lesions. Review of smears from women followed without initial biopsy or treatment. **J Clin Pathol**, v. 33, n. 6, p. 517-22, Jun 1980. ISSN 0021-9746. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7400354> >.

SYED, M. M.; PHULWANI, N. K.; KIELIAN, T. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) regulates Toll-like receptor 2 (TLR2) expression in microglia. **J Neurochem**, v. 103, n. 4, p. 1461-71, Nov 2007. ISSN 1471-4159. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17961202> >.

SZCZEPANSKI, M. J. et al. Triggering of Toll-like receptor 4 expressed on human head and neck squamous cell carcinoma promotes tumor development and protects the tumor from immune attack. **Cancer Res**, v. 69, n. 7, p. 3105-13, Apr 2009. ISSN 1538-7445. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19318560> >.

TERMINI, L. et al. Characterization of global transcription profile of normal and HPV-immortalized keratinocytes and their response to TNF treatment. **BMC Med Genomics**, v. 1, p. 29, 2008. ISSN 1755-8794. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18588690> >.

WAGGONER, S. E. Cervical cancer. **Lancet**, v. 361, n. 9376, p. 2217-25, Jun 2003. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12842378> >.

XIE, P. et al. Expression of toll-like receptor 4, tumor necrosis factor- alpha, matrix metalloproteinase-9 and effects of benazepril in patients with acute coronary syndromes. **Clin**

Med Insights Cardiol, v. 4, p. 89-93, 2010. ISSN 1179-5468. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20981132> >.

YANG, H. et al. Reduced expression of Toll-like receptor 4 inhibits human breast cancer cells proliferation and inflammatory cytokines secretion. **J Exp Clin Cancer Res**, v. 29, p. 92, 2010. ISSN 1756-9966. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20618976> >.

6-Anexos

ANEXO I: MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais

As amostras teciduais de colo uterino obtidas foram então incluídas no estudo e divididas em 03 grupos:

- **Grupo 1 (controles):** 19 mulheres com diagnóstico de miomatose uterina com indicação de histerectomia acompanhadas no serviço de ginecologia do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas (UFMG).
- **Grupo 2 (lesões pré-invasoras do colo uterino):** 35 mulheres com diagnóstico de lesões pré-invasoras do colo uterino acompanhadas no ambulatório de propedêutica do colo uterino do mesmo hospital.
- **Grupo 3 (câncer do colo do útero):** 10 mulheres com diagnóstico carcinoma de células escamosas (CCE) invasor do colo uterino acompanhadas no serviço de oncoginecologia do mesmo hospital.

3.2 Técnica Cirúrgica

As pacientes com mioma uterino foram submetidas a histerectomia de acordo com a técnica modificada de Heaney.

As pacientes com lesões pré-invasoras do colo uterino foram submetidas a ressecção por cirurgia por alta frequência (CAF) ou conização por bisturi “frio” conforme a indicação do caso.

As pacientes com câncer de colo uterino foram submetidas à laparotomia mediana com realização de inventário da cavidade abdominal, histerectomia radical classe III Rutledge-Piver e linfadenectomia pélvica. A histerectomia radical, base do tratamento cirúrgico para o câncer do colo uterino nesses estádios, consiste na remoção do útero e do tecido peritumoral, constituído pelo paramétrio, paracolpos e margens vaginais. São descritos cinco classes de histerectomias que se diferem no local das ligaduras nas artérias uterinas e vesicais superiores, na dissecação ureteral, e na extensão da ressecção parametrial e vaginal (Piver *et al.* 1974). A ressecção vaginal é variável, podendo ser retirado apenas o seu terço superior (Piver II), metade superior (Piver III) ou 3/4 superiores (Piver IV).

O tratamento cirúrgico foi o primeiro a ser adotado e nenhuma das pacientes foi submetida à radioterapia ou quimioterapia antes da cirurgia.

3.3 Obtenção das amostras

Foram removidos do material cirúrgico 4 amostras medindo 0,5 X 0,5mm, todas retiradas de áreas não necróticas, Em seguida os exemplares foram fixados em formalina neutra tamponada 10% e enviados ao serviço de Anatomia Patológica da UFMG. A avaliação histológica de todas as amostras foi realizada por uma patologista com experiência em oncoginecologia e em imunohistoquímica de acordo com as recomendações da Sociedade Americana de Patologistas. Foi avaliado o tamanho do tumor, a classificação, o grau de diferenciação (G1, G2, G3), a invasão linfovascular, o envolvimento vaginal e parametrial e a presença metástases em linfonodos pélvicos.

3.4 Imunohistoquímica

As amostras retiradas do colo uterino normal e neoplásico foram estudadas através da técnica de imunohistoquímica. Foram avaliadas as expressões das proteínas TLR2, TLR3, TLR4, TNF α e TNF β .

Os cortes das amostras foram desparafinizados em xilol e hidratados em série decrescente de etanol. A seguir, foram mergulhados em solução de EDTA 1mM (pH 8,0), e aquecidos a 96^oC em vaporizador steamer por 30 minutos, para a recuperação antigênica. Após resfriamento e lavagem dos cortes em tampão TRIS, Tris-HCl 0,05M (pH 7,6), eles foram tratados com solução de H₂O₂ a 3%, fundamental na inativação da peroxidase endógena. Nova lavagem com TRIS foi feita para que, em seguida, os cortes fossem incubados com os anticorpos primários. Para controle negativo da imunomarcção, foi utilizado apenas TRIS. Essa incubação durou uma noite e foi mantida a 4^oC em câmara úmida. Após lavagem em TRIS, as secções foram expostas à solução pós-primária, kit NovoLinkTM Max Polymer (Novocastra, Reino Unido). Nova lavagem precedeu a exposição dos cortes ao polímero, kit NovoLinkTM Max Polymer, fundamental para a amplificação da resposta. A imuno-reação foi visualizada usando diaminobenzidina - DAB, kit Liquid DAB + Substrate Chromogen System (DakoCytomation, Estados Unidos), que foi preparado de acordo com as orientações do fabricante. Ao final, os cortes foram contra corados com hematoxilina de Harris, desidratados, diafanizados e montados.

3.5 Análises da imunomarcção de TLR2, TLR3, TLR4, TNF α e TNF β

Todos os cortes foram examinados em um microscópio de luz (Modelo KF2, Zeiss, GE), sob o aumento de 400x para quantificar a intensidade de imunoexpressão das proteínas. As colorações para TLR2, TLR3, TLR4, TNF α e TNF β foram avaliadas por uma

patologista de acordo com o número de células positivas para as proteínas por campo. Ambos desconheciam a história e a evolução clínica das pacientes. Foram consideradas positivas as células que apresentaram citoplasma com coloração castanha, como resultado da precipitação do cromógeno diaminobenzidina, independentemente da intensidade da coloração. Em cada campo avaliado, foram quantificados o número total de células epiteliais e o número de células positivas. A partir dos dados obtidos pela avaliação de todos os campos, foi calculado o índice de marcação através da fórmula:

$$\text{Índice de marcação} = \frac{\text{soma do número de células positivas nos campos}}{\text{soma do número total de células nos campos}} \times 100$$

O índice de marcação indica, portanto, a porcentagem de células positivas sobre o número total de células epiteliais do colo. E serão então classificados em scores, de acordo com a porcentagem de células imunopositivas.

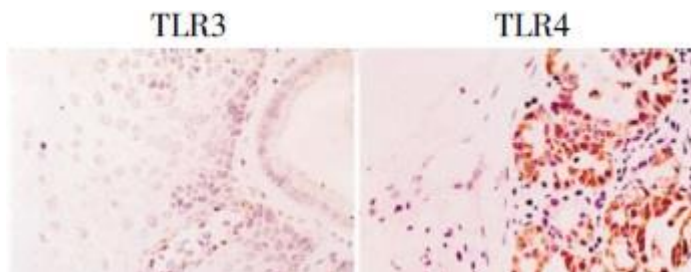
Para as proteínas consideramos os scores:

- Ausência de imunocoração: nenhuma célula imunopositiva
- Escore 1+: 1% a 25% de células imunopositivas;
- Escore 2+. 26% a 50% de células imunopositivas;
- Escore 3+: 51% a 75% de células imunopositivas;
- Escore 4+: 76% a 100% de células imunopositivas

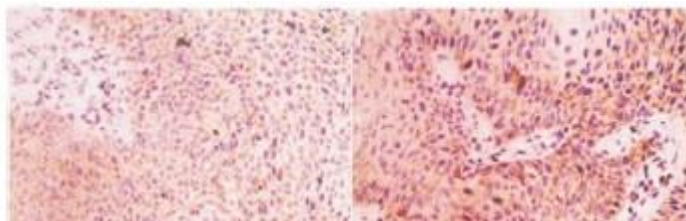
As lâminas foram então reclassificadas como apresentando altos títulos de expressão quando apresentavam escores 3+ ou 4+ ou baixos títulos de expressão quando apresentavam escores 0, 1+ ou 2+ conforme estudos anteriores. **FIGURA 8**

Figura 8:

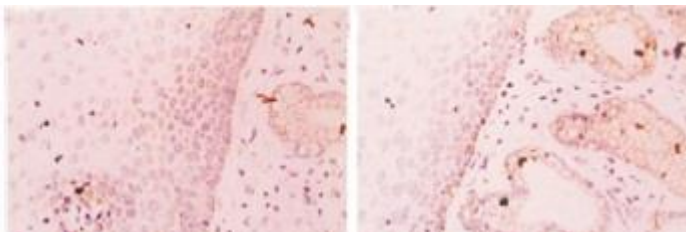
Coloração por imuno-histoquímica dos receptores TLR3 e TLR4 nos grupos controle, NICs e câncer de colo



Controle



NIC



Câncer de colo de útero