

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

RAQUEL RODRIGUES MARTINS

CARACTERIZAÇÃO DO INFLAMASSOMA NLRP3 NA NEOPLASIA INTRAEPITELIAL  
CERVICAL ASSOCIADA À INFECÇÃO PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)

Belo Horizonte

2018

RAQUEL RODRIGUES MARTINS

CARACTERIZAÇÃO DO INFLAMASSOMA NLRP3 NA NEOPLASIA INTRAEPITELIAL  
CERVICAL ASSOCIADA À INFECÇÃO PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Marcelo Antônio Pascoal Xavier.

Belo Horizonte

2018

## **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE: PATOLOGIA**

Reitor: **Jaime Arturo Ramírez**

Vice-Reitora: **Sandra Regina Goulart Almeida**

Pró-Reitora de Pós-Graduação: **Denise Maria Trombert de Oliveira**

Pró-Reitor de Pesquisa: **Ado Jório de Vasconcelos**

Diretor da Faculdade de Medicina: **Tarcizo Afonso Nunes**

Vice-Diretor da Faculdade de Medicina: **Humberto José Alves**

Coordenador Geral do Centro de Pós-Graduação: **Luis Armando Cunha de Marco**

Subcoordenador Geral do Centro de Pós-Graduação: **Selmo Geber**

Chefe do Departamento de Patologia: **Cristiana Buzelin Nunes**

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Patologia: **Wagner Luiz Tafuri**

A vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem.

João Guimarães Rosa

## AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e por se fazer presente em todos os momentos, me guiando e transmitindo a segurança necessária para enfrentar meu caminho.

A toda minha família por serem os alicerces da minha vida, em especial minha mãe e meu pai que sempre me apoiaram e incentivaram.

Ao Wallace, pelo companheirismo, apoio, paciência, compreensão, cumplicidade e amor em todos os momentos.

Ao Prof. Marcelo Antônio Pascoal Xavier, por ter me dado a oportunidade deste aprendizado, pela confiança, dedicação, incentivo e orientação.

À Dra. Paula Vidigal pela amizade, incentivo e apoio.

À Fernanda Césari pela colaboração.

A todas as pacientes que participaram desta pesquisa. Sem vocês este projeto não seria possível.

A equipe do NUPAD que contribuiu com uma valiosa parte deste projeto.

Aos amigos do HC, que estiveram presentes nesta trajetória e que tornaram mais fácil este trabalho. Obrigada pela amizade!

E a todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram para que este trabalho fosse realizado com sucesso.

## RESUMO

O câncer do colo do útero mantém-se como um importante problema de saúde pública em mulheres no mundo e no Brasil. Somente no biênio 2016/2017, ocorreram cerca de 16.340 novos casos de câncer do colo do útero no país. Esse câncer é precedido pela neoplasia intraepitelial cervical (NIC), que se desenvolve, principalmente, a partir da complexa relação entre a infecção persistente por Papilomavírus humano (HPV) e inflamação crônica na mucosa escamosa do colo uterino. No contexto desta relação, o inflamassoma, uma plataforma de sinalização celular que ativa fatores pró-inflamatórios, tem sido associado a infecção viral e desenvolvimento do câncer. Assim, esse trabalho visa caracterizar o inflamassoma na NIC associada à infecção pelo HPV, particularmente no ceratinócito, o que poderá contribuir para a construção de novos conhecimentos e seleção de marcadores com utilidade clínica. Para tanto, realizamos um estudo descritivo da intensidade e do percentual da imunorreatividade imuno-histoquímica (IHQ) dos marcadores NLRP3, caspases-4/5 e 1 e interleucinas (IL) 1 $\beta$  e 18 em 35 biópsias do colo uterino com diagnósticos de cervicite inespecífica (n = 11), NIC1 (n = 14) e NIC2/3 (n = 10) e em 25 blocos celulares oriundos de citologia em meio líquido do colo uterino e com diagnósticos de inflamação (n = 12) e lesões intraepiteliais escamosas de baixo (LSIL; n = 7) e alto (HSIL; n = 6). A detecção do HPV foi realizada por IHQ e reação em cadeia da polimerase (PCR). As expressões epiteliais de NLRP3 e caspase-1, inflamatória de IL-18 e endotelial de caspases-4/5 foram fortes ou elevadas no NIC2/3. O marcador IL-1 $\beta$  apresentou uma fraca expressão no epitélio, no infiltrado inflamatório e no endotélio. Foi encontrada uma forte correlação na hiperexpressão do marcador NLRP3 nas amostras de NIC2/3 das biópsias e nas amostras de HSIL dos blocos de células. Além disso, a expressão epitelial de NLRP3 se associou com o HPV. Em conjunto, esses resultados evidenciam a associação do HPV com alteração do inflamassoma NLRP3 na neoplasia intraepitelial do colo uterino.

Palavras-chave: Câncer do colo do útero; HPV; Inflamassoma; NLRP3; Caspases.

## ABSTRACT

Cervical cancer remains an important public health problem in women worldwide and in Brazil. In the 2016/2017 biennium alone, there were about 16,340 new cases of cervical cancer in the country. This cancer is preceded by cervical intraepithelial neoplasia (CIN), which develops mainly from the complex relationship between persistent Human papillomavirus (HPV) infection and chronic inflammation in the squamous mucosa of the uterine cervix. In the context of this relationship, inflammasoma, a cellular signaling platform that activates pro-inflammatory factors, has been associated with viral infection and cancer development. However, the involvement of inflammasoma in cervical carcinogenesis is unknown. Thus, this work aims to characterize the inflammasoma in the CIN associated with HPV infection, particularly in keratinocytes, which may contribute to the construction of new knowledge and selection of biomarkers with clinical utility. A descriptive study of the immunohistochemical immunoreactivity (IHC) of the biomarkers NLRP3, caspases-4/5 and 1 and interleukins (IL) 1 $\beta$  and 18 in 35 biopsies of the uterine cervix with diagnoses of non-specific cervicitis (n = 11), CIN1 (n = 14) and CIN2 / 3 (n = 10), and in 25 cell blocks from cytology in the uterine cervix and diagnosed with inflammation (n = 12) and low squamous intraepithelial lesions (LSIL; n = 7) and high (HSIL; n = 6). HPV detection was performed by IHC and polymerase chain reaction (PCR). The NLRP3 and caspases-4/5 expressions were strong or elevated in CIN2/3 and weak or basal in CIN1. In addition, NLRP3 epithelial expression was associated with HPV. Taken together, these results evidence the relationship of HPV with NLRP3 inflammasoma in intraepithelial neoplasia of the cervix.

**Keywords:** Cervical cancer; HPV; Inflammasome; NLRP3; Caspases.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Nomenclatura citopatológica e histopatológica	3
FIGURA 2 - Características histopatológica e citopatológica da mucosa ectocervical normal e com lesões intraepiteliais	5
FIGURA 3 - Incidência estimada de novos casos de câncer do colo do útero, no mundo, em 2012	6
FIGURA 4 - Incidência de neoplasia maligna do colo do útero, estimadas para o ano de 2016 no Brasil	7
FIGURA 5 - Esquema da infecção por HPV	8
FIGURA 6 - História natural da infecção genital por HPV	11
FIGURA 7 - Ativação dos Inflamassomas	13
FIGURA 8 - Parâmetros para análise qualitativa da reatividade imuno-histoquímica	19
FIGURA 9 - Parâmetros para análise semi-quantitativa da imuno-histoquímica	19
FIGURA 10 - Imunorreatividade do marcador NLRP3	23
FIGURA 11 - Percentual da imunorreatividade do marcador NLRP3	26
FIGURA 12 - Imunorreatividade do marcador caspases-4/5	27
FIGURA 13 - Percentual da imunorreatividade do marcador caspases-4/5	30
FIGURA 14 - Imunorreatividade do marcador caspase-1	31
FIGURA 15 - Percentual da imunorreatividade do marcador caspase-1	34
FIGURA 16 - Imunorreatividade do marcador IL-1 $\beta$	35
FIGURA 17 - Percentual da imunorreatividade do marcador IL-1 $\beta$	37
FIGURA 18 - Imunorreatividade do marcador IL-18	38
FIGURA 19 - Percentual da imunorreatividade do marcador IL-18	41
FIGURA 20 - Gráficos de radar da intensidade e do percentual da imunorreatividade dos marcadores NLRP3, Caspases-4/5 e 1, IL-1 $\beta$ e IL-18	42
FIGURA 21 - Gráficos de barras para comparação da expressão entre os escores elevado (1) e basal (0) dos marcadores NLRP3, Caspases- 4/5 e 1 e IL-18.	48
FIGURA 22 - Imunorreatividade do marcador NLRP3 nos ceratinócitos	51
FIGURA 23 - Imunorreatividade do marcador Caspases-4/5 nos ceratinócitos	52
FIGURA 24 - Imunorreatividade do marcador caspase-1 nos ceratinócitos	53
FIGURA 25 - Imunorreatividade do marcador IL-1 $\beta$ nos ceratinócitos	54
FIGURA 26 - Imunorreatividade do marcador IL-18 nos ceratinócitos	55
FIGURA 27 - Gráfico de barras da detecção e genotipagem do HPV	57
FIGURA 28 - Mecanismo hipotético de interação inflamassoma NLRP3 com HPV	64





## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Intensidade e percentual de imunorreatividade dos marcadores NLRP3, Caspases-4/5 e 1, IL-1 $\beta$ e IL-18 nas amostras do controle externo	22
TABELA 2 - Intensidade da imunorreatividade do marcador NLRP3	24
TABELA 3 - Intensidade da imunorreatividade do marcador caspases-4/5	28
TABELA 4 - Intensidade da imunorreatividade do marcador caspase-1	32
TABELA 5 - Intensidade da imunorreatividade do marcador IL-1 $\beta$	36
TABELA 6 - Intensidade da imunorreatividade do maador IL-18	39
TABELA 7 - Escores da expressão imuno-histoquímica do marcador NLRP3	43
TABELA 8 - Escores da expressão imuno-histoquímica do marcador caspases-4/5	44
TABELA 9 - Escores da expressão imuno-histoquímica do marcador caspase-1	45
TABELA 10 - Escores da expressão imuno-histoquímica do marcador IL-1 $\beta$	46
TABELA 11 - Escores da expressão imuno-histoquímica do marcador IL-18	47
TABELA 12 - Intensidade da imunorreatividade do marcador NLRP3	51
TABELA 13 - Intensidade da imunorreatividade do marcador caspases-4/5	52
TABELA 14 - Intensidade da imunorreatividade do marcador caspase-1	53
TABELA 15 - Intensidade da imunorreatividade do marcador IL-1 $\beta$	54
TABELA 16 - Intensidade da imunorreatividade do marcador IL-18	55
TABELA 17 - Correlação dos escores da expressão imuno-histoquímica dos marcadores do inflamassoma NLRP3 e de p16	56
TABELA 18 - Correlação dos escores da expressão imuno-histoquímica dos marcadores do inflamassoma NLRP3 e da presença do HPV	58
TABELA 19 - Coeficientes estimados, erros, escores e P-valor dos modelos de regressão logística binária dos marcadores do inflamassoma NLRP3 em relação ao HPV	59
TABELA 20 - Predição da expressão dos marcadores do inflamassoma NLRP3 em relação ao HPV	59

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- APC - Células apresentadoras de antígenos
- AIM2 - Receptor de padrão nuclear
- ASC - Proteína adaptadora de *CARD*
- ASC-H - ASC não podendo excluir Lesão intraepitelial escamosa de alto grau
- ASC-US - Células escamosas atípicas de significado indeterminado
- ATP - Trifosfato de adenosina
- CARD - Domínio de recrutamento da caspase
- CCE - Carcinoma de células escamosas
- CD - Grupamentos de diferenciação de linfócitos
- C/EBP - Receptor de crescimento do tipo I
- DAMPs - Padrões moleculares associados a patógenos
- DNA - Ácido desoxirribonucléico
- E1a E7 - Proteínas não estruturais da região precoce (E) do HPV
- HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana
- HPV - Papilomavírus humano
- HR-HPV - Papilomavírus humano de alto risco
- HSIL - Lesão intraepitelial escamosa de alto grau
- IFN - Interferon
- IHQ - Imuno-histoquímica
- IL - Interleucina
- INCA - Instituto Nacional do Câncer
- INF - Inflamatório
- L1 e L2 - Proteínas do capsídeo da região tardia (L) do HPV
- LPS - Lipopolissacarídeo
- LSIL - Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau
- MHC - complexo principal de histocompatibilidade
- NFκb - Fator de transcrição nuclear
- NIC - Neoplasia intraepitelial cervical
- NK - Células *natural killer*
- NLRP3 - *NLR family pyrin domain containing 3*
- NLRs - Receptor do tipo NOD
- NOD - *Nucleotide-binding oligomerization*

NUPAD - Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico

PAMPs - Padrões moleculares associados a patógenos

p16 - Proteína do gene 16

PCR - Reação em cadeia de polimerase

RNA - Ácido ribonucléico

ROS - Espécies de oxigênio reativo

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1	Neoplasia intraepitelial e câncer do colo uterino: aspectos conceituais	3
2.2	Epidemiologia do câncer do colo do útero	6
2.3	Etiologia da neoplasia intraepitelial e do câncer do colo uterino	7
2.4	Resposta imune à infecção genital por HPV	9
2.5	Progressão da infecção por HPV para neoplasia intraepitelial cervical	11
2.6	Inflamassoma	12
3	OBJETIVOS	15
3.1	Objetivo geral	15
3.2	Objetivos específicos	15
4	MATERIAIS E MÉTODOS	16
4.1	Considerações éticas	16
4.2	Delineamento e estratégias de estudo	16
4.3	Critérios de seleção, inclusão e exclusão	17
4.4	Blocos celulares ( <i>cellblock</i> )	17
4.5	Imuno-histoquímica	18
4.6	Detecção e genotipagem do HPV	20
4.7	Análises estatísticas	20
5	RESULTADOS	21
5.1	NLRP3	22
5.2	Caspases-4/5	26
5.3	Caspase-1	30
5.4	IL-1 $\beta$	34
5.5	IL-18	38
5.6	Escore da expressão imuno-histoquímica	43
5.7	Imuno-histoquímica dos blocos celulares	50
5.8	Associação dos marcadores do inflamassoma NLRP3 à infecção por HPV	56
5.9	Efeito do inflamassoma NLRP3 na progressão da neoplasia intraepitelial escamosa	58
6	DISCUSSÃO	60
7	CONCLUSÃO	64
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

9	ANEXO	69
9.1	Artigo científico	69

## 1 - INTRODUÇÃO

O câncer cervical ou câncer do colo do útero, especificamente o carcinoma de células escamosas (CCE), é a quarta neoplasia mais comum em mulheres no mundo, com mais de 85% dos casos ocorrendo em países subdesenvolvidos (Tornesello *et al.*, 2013), apesar da ampla disponibilidade de métodos para rastreamento da sua principal lesão precursora, a neoplasia intraepitelial cervical (NIC) e do seu principal fator etiológico, o Papilomavírus Humano (HPV). No biênio 2016/2017 ocorreram cerca de 16.340 novos casos de câncer do colo do útero no Brasil, uma estimativa de 15,85 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2015).

A maioria das infecções por HPV são transitórias e resolvem-se espontaneamente. Presumivelmente, elas são controladas completamente pelo sistema imune mediado por células ou estão em um estado de latência, caracterizado por uma expressão restrita das proteínas precoces virais E1 e E2. Uma infecção persistente, com altos níveis de replicação de HPV, é estabelecida se há falha imunológica no controle do vírus (Ferenczy *et al.*, 2002; Schiffman *et al.*, 2003).

Na ausência de eliminação ou regressão da infecção pelo HPV, as lesões intraepiteliais precursoras do câncer podem progredir para o CCE. A persistência do HPV na mucosa cervical é crucial para o desenvolvimento da neoplasia intraepitelial cervical, que é subdividida histo e citologicamente em 3 categorias: NIC1 ou lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL), NIC2 e NIC3, conhecidas como lesões intraepiteliais de alto grau (HSIL) (Schiffman *et al.*, 2003; Doorbar, 2005). As lesões cervicais de baixo grau relembram infecções produtivas causadas por HPV, enquanto as lesões de alto grau têm uma fase proliferativa com ruptura ao nível do gene da proteína E2, integração do DNA do vírus no genoma celular e desregulação na expressão das proteínas transformantes E6 e E7, que leva ao aumento da proliferação celular do epitélio (Thomison III *et al.*, 2009; zurHausen, 2002; Doorbar, 2005).

Esse processo da carcinogênese cervical é complexo e influenciado pelo microambiente inflamatório do colo uterino, visto que a progressão da NIC está relacionada diretamente com o aumento da displasia epitelial e aumento intenso do infiltrado inflamatório estromal, principalmente por células mononucleadas, que caracterizam inflamação crônica. A inflamação crônica pode favorecer desequilíbrio imune e o microambiente inflamatório pode favorecer a carcinogênese. Entretanto, os mecanismos subjacentes à ativação ou inativação da

imunidade inata no colo uterino e ao recrutamento de células inflamatórias permanecem obscuros (Smola, 2017).

Nesse contexto de interações entre infecção, inflamação crônica e o desenvolvimento do câncer, papel atual e muito relevante é atribuído aos inflamassomas, especialmente ao inflamassoma NLRP3, o melhor estudado até o presente. Inflamassomas são complexos multiprotéicos que consistem da associação de receptores do tipo NOD, como o NLRP3, do receptor ASC (proteína associada a apoptose contendo um domínio CARD) e da caspase-1 (Takano *et al.*, 2016) e funcionam como uma plataforma de sinalização celular para ativação de fatores pró-inflamatórios, tais como interleucinas e caspases (Latz *et al.*, 2013; Vanaja *et al.*, 2014).

Recentes estudos demonstraram que certos tipos de vírus têm a capacidade de ativar inflamassomas, o que contribui, de um lado, para a resposta antiviral e, de outro, para o estabelecimento da inflamação crônica (Shrivastava *et al.*, 2016). Em relação à infecção pelo HPV e o desenvolvimento da NIC, essas interações ainda apresentam resultados incertos. Poucos estudos demonstraram que o HPV ativa os inflamassomas AIM2 e NLRP3, com favorecimento da progressão da NIC para CCE (Reinholz *et al.*, 2013; Pontillo *et al.*, 2016) enquanto outro demonstrou que a oncoproteína E6 do HPV inibiu a secreção de IL-1 $\beta$ , um dos produtos da ativação do inflamassoma (Niebler *et al.*, 2013).

Considerando as particularidades da resposta imune contra o HPV e a possível participação do inflamassoma na carcinogênese cervical, o direcionamento desse estudo para a análise da influência do microambiente inflamatório na infecção pelo HPV e progressão da NIC será importante para a produção de novos conhecimentos e para a identificação de novos marcadores capazes de estabelecer a relação entre a infecção persistente pelo HPV e o desenvolvimento do câncer cervical, assumindo assim os desafios de ampliar o diagnóstico e tratamento deste relevante e importante problema de saúde pública.



## 2 - REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 - Neoplasia intraepitelial e câncer do colo uterino: aspectos conceituais

Em 1988, um grupo de indivíduos com experiência em citopatologia e histopatologia, se reuniu em Bethesda, Maryland (EUA) para abordarem problemas relacionados à ampla variabilidade dos resultados da citologia cervical. O objetivo era estabelecer uma terminologia que proporcionaria limiares claros para o gerenciamento e diminuiria a variabilidade interobservador. Esta terminologia e o processo que criou tiveram um impacto profundo na prática da citologia cervical. As conferências de Bethesda e a sua produção subsequente também estabeleceram o cenário para padronização da terminologia em vários sistemas de órgãos, incluindo citologia e histologia (FIGURA 1) (Nayaret *al.*, 2014).

Classificação citológica de Papanicolaou (1941)	Classificação histológica da OMS (1952)	Classificação histológica de Richart (1967)	Sistema Bethesda (2001)	Nomenclatura Citológica Brasileira (2006)
Classe I	-	-	-	-
Classe II	-	-	Alterações benignas Atipias de significado indeterminado	Alterações benignas Atipias de significado indeterminado
Classe III	Displasia leve	NIC I	Lesão intraepitelial de baixo grau (LSIL)	Lesão intraepitelial de baixo grau (LSIL)
	Displasia moderada e acentuada	NIC II e NICIII	Lesão intraepitelial de alto grau (HSIL)	Lesão intraepitelial de alto grau (HSIL)
Classe IV	Carcinoma <i>in situ</i>	NIC III	Lesão intraepitelial de alto grau (HSIL)  Adenocarcinoma <i>in situ</i>	Lesão intraepitelial de altograu (HSIL)  Adenocarcinoma <i>in situ</i>
Classe V	Carcinoma invasor	Carcinoma invasor	Carcinoma invasor	Carcinoma invasor

FIGURA 1: Nomenclatura citopatológica e histopatológica utilizada desde o início do uso do exame citopatológico para o diagnóstico das lesões cervicais escamosas e suas equivalências. Fonte: Diretrizes para o rastreamento do câncer do colo do útero/INCA, 2016.

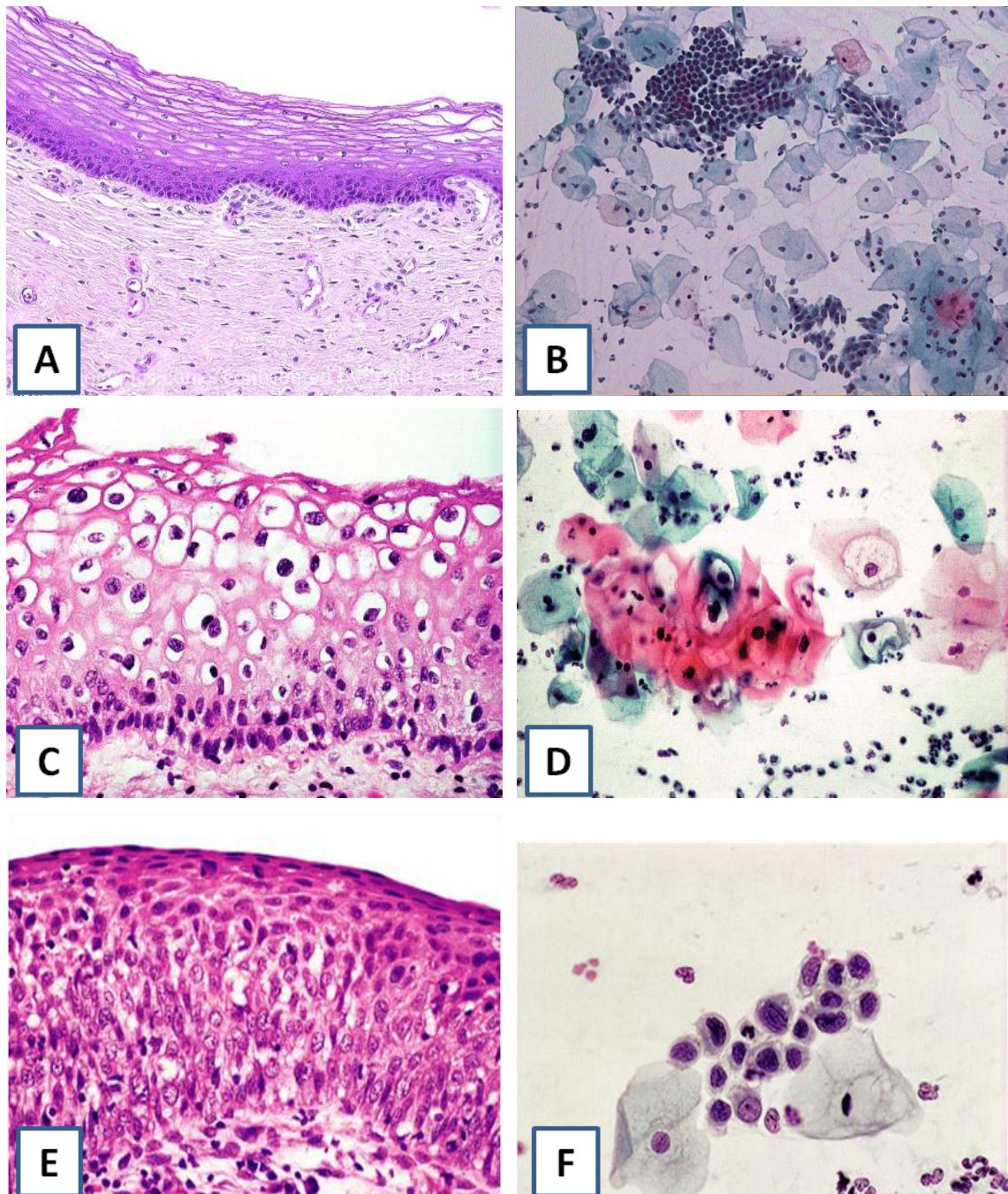
A categoria de diagnóstico citológico ASC foi criada pelo Sistema Bethesda e se refere a alterações citológicas sugestivas de SIL (lesão intraepitelial escamosa), que são qualitativas ou quantitativamente insuficientes para uma interpretação definitiva, porém, mais significativas do que as encontradas em processos inflamatórios. Essa classificação foi revista e reclassificada, posteriormente, em ASC-US – células escamosas atípicas de significado indeterminado e ASC-H – células escamosas atípicas de significado indeterminado quando não se pode excluir lesão intraepitelial de alto grau (Solomon; Nayar, 2005, p. 69).

A lesão intraepitelial escamosa abrange as anormalidades epiteliais, cervicais, escamosas e não invasivas associadas ao HPV, e vão desde alterações celulares associadas a uma infecção transitória do HPV até alterações que representam precursores de alto grau para um câncer invasivo. O Sistema Bethesda divide esse grupo nas categorias de baixo grau e de alto grau. As lesões de baixo grau abrangem as alterações celulares chamadas de “efeito citopático do HPV” e uma displasia fraca ou neoplasia intraepitelial cervical (NIC1). As lesões de alto grau abrangem displasia moderada, grave e carcinoma in situ ou neoplasia intraepitelial cervical (NIC2/3) (Solomon; Nayar, 2005, p. 89).

As anormalidades intraepiteliais cervicais são classificadas como NIC1, NIC2 e NIC3, dependendo no grau de diferenciação. O diagnóstico de NIC depende de características histológicas de diferenciação, maturação e estratificação de células e anormalidades nucleares (Martin *et al.*, 2011).

Além disso, a proporção da espessura do epitélio e células diferenciadas é usada para classificar NIC. Graus mais graves de NIC são os que apresentam um epitélio mais espesso, composto de células indiferenciadas com uma camada estreita de células maduras indiferenciadas na superfície. Anormalidades nucleares, como núcleos aumentados de tamanho, hipercromasia e figuras de mitose também são avaliadas. A infecção por HPV também é comum na NIC e é caracterizada pela presença de coilócitos (Martin *et al.*, 2011).

Na NIC1, as células indiferenciadas são confinadas à camada inferior do epitélio. As alterações nucleares são discretas e com poucas características mitóticas. Na NIC2, as alterações celulares displásicas são restritas à metade inferior do epitélio. Tendem a ter alterações nucleares mais fortes e mais figuras de mitose. Na NIC3, a diferenciação e a estratificação podem ser totalmente ausentes ou apenas presente no quarto superior do epitélio. Anormalidades nucleares podem ser vistas ao longo de todo o epitélio. Figuras de mitose estão presentes em todas as células e, geralmente com perda de polaridade (Martin *et al.*, 2011). Essas lesões estão representadas na FIGURA 2:



**FIGURA 2:** Mucosa ectocervical normal e com lesões intraepiteliais. A – mucosa ectocervical com camadas basal e superficiais sem alterações. B – esfregaço citológico com células superficiais, intermediárias, metaplásicas e colunares sem alterações. C e D – características histopatológica e citopatológica da infecção produtiva por HPV, representadas por coilocitos nas camadas superficiais do epitélio e nas células superficiais e intermediárias esfoliadas. Os coilocitos apresentam cariomegalia, hiper Cromasia nuclear, irregularidade do contorno da carioteca e halo claro citoplasmático perinuclear com reforço periférico. Presença também de células inflamatórias. E - atipias das células epiteliais em 2/3 terços do epitélio e representadas por cariomegalia, cromatina heterogênea e figura atípica de mitose. Observam-se linfócitos intraepiteliais. F - agrupamento de células com cariomegalia, cromatina heterogênea, nucléolos inconspícuos e aumento da relação núcleo/citoplasma (A e C/E : HE aumento 200X e 400X; B e D/F: Papanicolaou aumento 200X e 400X). Fonte: Pascoal-Xavier, 2011.

Além das lesões intraepiteliais descritas acima, foco do estudo, são reconhecidas duas principais categorias de carcinomas invasores do colo uterino: o carcinoma de células escamosas (CCE), que representa cerca de 80% dos casos; e o adenocarcinoma, que representa cerca de 10% dos casos. O CCE apresenta-se como área endurecida ou ulcerada e pode, microscopicamente, ser classificado como bem, moderadamente ou pouco diferenciado.

## 2.2 - Epidemiologia do câncer do colo uterino

O câncer do colo uterino é considerado um importante problema de saúde pública mundial (FIGURA 3). Foi estimada a ocorrência de 527 mil casos novos em mulheres, no mundo, em 2012, considerando assim, o quarto tipo de câncer mais comum nessa população. Cerca de 70% dos casos ocorrem em regiões menos desenvolvidas. De acordo com a última estimativa mundial, essa neoplasia foi responsável por 265 mil óbitos em mulheres em 2012, sendo que 87% desses óbitos ocorreram em países em desenvolvimento (INCA, 2015).

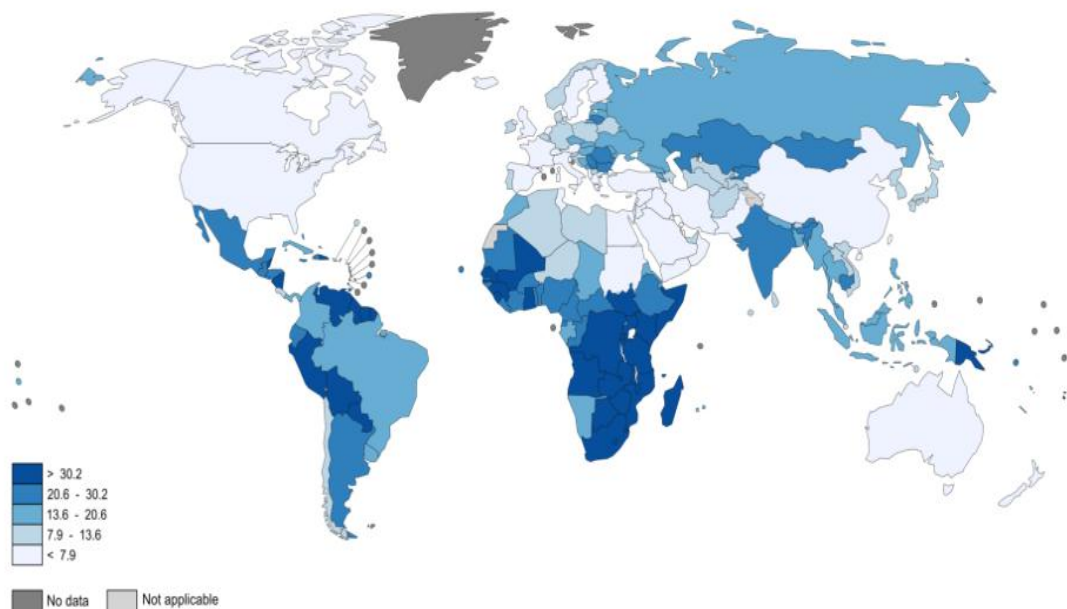


FIGURA 3– Incidência estimada de novos casos de câncer uterino, por 100.000 habitantes, no mundo, em 2012. De acordo com a legenda quanto mais forte a intensidade da cor azul, maior o número de casos encontrados na região. O mapa indica maiores incidências na África, América do Sul e Ásia. Fonte: <http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/cervix-new.asp>

As estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA), para o biênio 2016/2017, são de 16.340 novos casos de câncer de colo uterino no Brasil, uma estimativa de 15,85 casos a cada 100.000 mulheres (FIGURA 4). O câncer de colo do útero é o mais incidente na região Norte (23,97/100 mil). Nas Regiões Centro-Oeste (20,72/100 mil) e Nordeste (19,49/100 mil), ocupa a segunda posição; na Região Sudeste (11,30/100 mil), a terceira; e, na Região Sul (15,17 /100 mil), a quarta posição. Minas Gerais tem uma taxa estimada de 9,63 casos para cada mil mulheres. A última informação para mortalidade no Brasil aponta que ocorreram 5.430 mortes por câncer do colo do útero em mulheres, em 2013 (INCA, 2015).

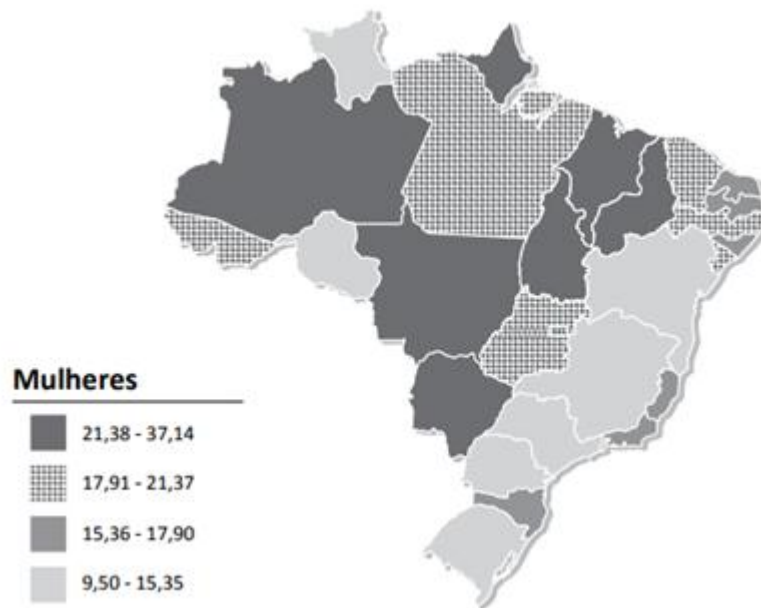


FIGURA 4 – Representação das taxas brutas de incidência de neoplasia maligna do colo uterino, estimadas para o ano de 2016 no Brasil, por 100.000 mulheres. De acordo com a legenda quanto mais forte a intensidade da cor cinza, maior o número de casos encontrados na região. As maiores incidências são encontradas na Região Norte. Fonte: Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil – INCA, 2015.

### 2.3 - Etiologia da neoplasia intraepitelial e do câncer do colo uterino

O HPV é o agente causal mais importante na patogênese do câncer cervical e nas lesões do colo uterino (Martin *et al.*, 2011). Cerca de 13 tipos de HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68) estão associados ao risco de desenvolver câncer cervical (Tornesello *et al.*, 2013) e são definidos como tipos virais "carcinogênicos", dos quais os HPVs 16, 18, 31 e 45 representam 80% dos casos de câncer cervical (Martin *et al.*, 2011). O

HPV-16 é o genótipo mais prevalente em ambos os carcinomas de células escamosas (59,3%) e adenocarcinoma (36,3%) em todo o mundo. O HPV-18 é o segundo genótipo mais comum, encontrado em maior proporção no adenocarcinoma (36,8%) em comparação com CCE (13,2%). Outros tipos de HPVs têm uma prevalência mais baixa, mas ainda contribuem para uma fração significativa do câncer cervical (Tornesello *et al.*, 2013).

O ciclo de vida do HPV é caracterizado pela infecção de células da camada basal do epitélio. A diferenciação de células epiteliais, positivas para HPV, é acompanhada por replicação do DNA viral e ativação da fase produtiva do ciclo de vida viral. Os genes virais E6 e E7, expressos nas células basais mantêm a progressão do ciclo celular e retardam a diferenciação terminal do epitélio. As proteínas tardias L1 e L2 estão expressas nas camadas superiores do tecido infectado e são responsáveis pela montagem do capsômero e síntese da partícula viral. Embora as proteínas E6 e E7 estejam frequentemente expressas em lesões escamosas intraepiteliais, apenas um subconjunto de lesões neoplásicas irão persistir e progredir para câncer invasivo, sugerindo que outros eventos moleculares estão envolvidos na progressão do câncer (Tornesello *et al.*, 2013). A FIGURA 5 mostra o esquema da infecção por HPV.

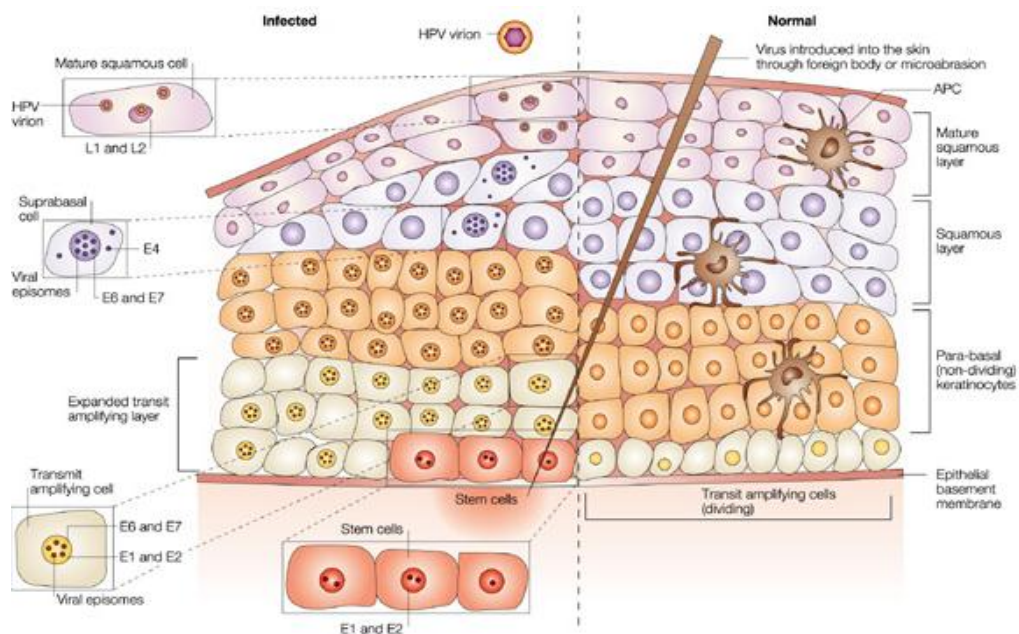


FIGURA 5 – Esquema da infecção por HPV, mostrando a expressão dos genes virais nas diferentes camadas do epitélio. Ao longo da camada basal as células filhas se dividem e seu processo de maturação é acompanhado da migração em direção à superfície. Observa-se síntese das proteínas de replicação, montagem e empacotamento do vírus nas camadas mais diferenciadas do epitélio. As células, repletas de partículas virais, são descamadas para a superfície. Fonte: Adaptado de Frazer, 2004.

A infecção por HPV é mais comum em mulheres mais jovens, atingindo um pico de cerca de 20% entre mulheres com idade entre 20 e 24 anos, e declinando entre as mulheres com mais de 30 anos de idade. A infecção com o vírus HPV é um fenômeno frequente, com 80% das mulheres mostrando evidência de infecção em algum estágio em suas vidas. A maioria dessas infecções é transitória, no entanto, em uma pequena proporção, o HPV se integra no genoma do hospedeiro causando uma infecção persistente. O risco de progressão e regressão de lesões pré-cancerosas é muito influenciado pela persistência de tipos específicos de HPV de alto risco. Mulheres em que o vírus HPV se integra são mais propensas a desenvolver displasia grave e malignidade do que aqueles em que as infecções são transitórias (Martin *et al.*, 2011).

Segundo o Centers for Disease Control and Prevention, alguns fatores de risco que predisõem ou potencializam a persistência do HPV e o risco do desenvolvimento do câncer cervical são:

- a) Imunossupressão: HIV, uso de altas doses de esteróides;
- b) História de neoplasia do trato genital inferior (vaginal, vulvar ou anal);
- c) Aumento do número de parceiros sexuais ao longo da vida (aumento do risco de aquisição de HPV);
- d) Idade precoce da atividade sexual (aumenta o risco de aquisição de HPV);
- e) Tabagismo: aumenta o risco de carcinoma de células escamosas cervicais;
- f) Uso de contraceptivos orais: uso prolongado (maior que 10 anos) aumenta o risco de carcinoma epidermóide cervical.

## **2.4 - Resposta imune à infecção genital por HPV**

A infecção pelo HPV e a multiplicação viral no epitélio escamoso são dependentes da diferenciação do ceratinócito. Durante a replicação natural, as proteínas antigênicas do capsídeo são expressas nas camadas mais superficiais do epitélio, onde a vigilância imune não pode reconhecê-las. Não existe citólise ou morte citopática como consequência da replicação, montagem ou liberação da partícula viral. Somam-se a estes, os mecanismos de evasão da resposta imune inata determinados pela atividade repressora das oncoproteínas E6 e E7, das sinalizações pelo interferon (IFN) e fator nuclear kB (NFkB), além da resistência das células infectadas pelo HPV às células *natural killer* (NK) (Stanley, 2010).

A soroconversão com anticorpos contra tipos de HPV pode levar de 6 meses a 1 ano, desde o início da infecção. A soroconversão contra proteínas do capsídeo é lenta, mas os níveis de anticorpos se mantêm estáveis por 10-15 anos. A produção de anticorpos é importante porque evita a disseminação da infecção e reinfecção (Scheurer *et al.*, 2005).

Entretanto, as evidências atuais mostram que a regressão da infecção está associada a uma forte resposta imune celular do tipo 1. Esta resposta envolve a interação de células apresentadoras de antígeno (APC), linfócitos T CD4+, linfócitos T CD8+ e citocinas co-estimuladoras. Exames histológicos de lesões em regressão mostram grande infiltrado de linfócitos T CD4+ e CD8+ expressando marcadores de ativação celular e moléculas de adesão requeridas para o tráfego de linfócitos no endotélio (Stanley, 2010).

O HPV tem mecanismos eficientes que evitam uma apresentação efetiva de antígenos pelas APC aos linfócitos através de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). As proteínas E5 e E7 reprimem a atividade da cadeia pesada das moléculas da classe I do MHC e suprimem a apresentação de antígeno pelas moléculas da classe II do MHC. As oncoproteínas do HPV podem evitar a atividade dos IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$  e de citocinas, como a interleucina-18, necessários para a resposta imune celular (Stanley, 2010).

A maioria das infecções por HPV são transitórias e resolvem-se espontaneamente, tornando-se indetectável entre um a dois anos, incluindo os tipos de alto risco. Presumivelmente, elas são controladas completamente pelo sistema imune mediado por células ou estão em um estado de latência caracterizado por uma expressão restrita das proteínas precoces virais E1 e E2. Uma infecção persistente, com altos níveis de replicação de HPV, é estabelecida se há falha imunológica no controle do vírus (Ferenczy *et al.*, 2002; Schiffman *et al.*, 2003).

A persistência da infecção pelo HPV, caracterizada por uma infecção detectável de longa duração, é incomum quando comparada ao *clearance* viral. De um ponto de vista prático, a persistência pode ser definida como a detecção do mesmo tipo de HPV duas ou mais vezes por um período de tempo. Não existe consenso deste tempo de detecção, e sim uma tendência de se considerar 18 meses, de acordo com o curso natural da infecção genital por HR-HPV (FIGURA 6) (Schiffman *et al.*, 2003; Stanley, 2010).



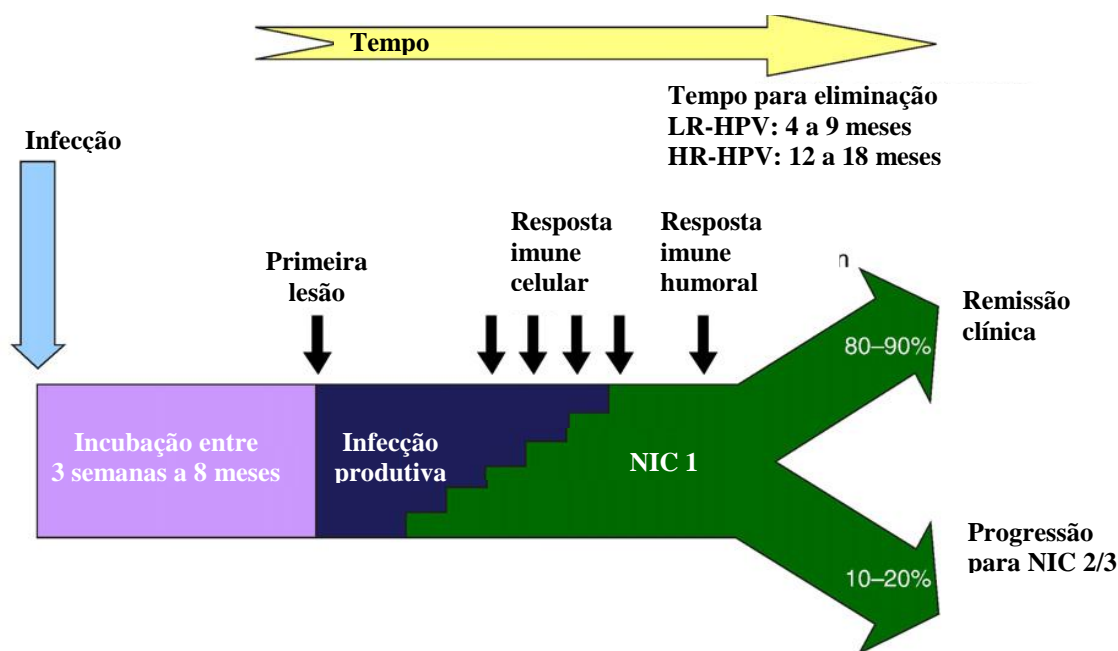


FIGURA 6: História natural da infecção genital por HPV. HPV é altamente infeccioso, com período de incubação de 3 semanas a 8 meses após a infecção. Então, o vírus estabelece infecção produtiva e NIC1. A eliminação do vírus é associada com resposta imune celular. Entretanto, infecção subclínica pode persistir por tempo indeterminado. Infecções persistentes podem progredir para NIC2, NIC3 e, posteriormente, câncer cervical invasor. Fonte: Adaptado de Stanley, 2010.

## 2.5 - Progressão da infecção por HPV para neoplasia intraepitelial cervical

Na ausência de regressão, as lesões intraepiteliais podem persistir e podem, em alguns casos, progredir para câncer cervical invasor. A persistência do HPV na mucosa cervical é crucial para o desenvolvimento da neoplasia intraepitelial cervical e do câncer cervical invasor (Schiffman *et al.*, 2003; Doorbar, 2005). As lesões cervicais de baixo grau (NIC1) relembram infecções produtivas causadas por HPV, enquanto as lesões de alto grau (NIC2 e NIC3) têm uma fase proliferativa com ruptura do gene da proteína E2 e integração do DNA do vírus no genoma celular (Thomison III *et al.*, 2009). A integração neste ponto preserva as regiões dos genes das oncoproteínas E6 e E7 e elimina a modulação negativa da proteína E2. Assim, os eventos mais importantes na progressão da lesão produtiva para uma neoplasia de alto grau podem ser resultado de uma desregulação na expressão das proteínas transformantes E6 e E7. A progressão de NIC3 para câncer cervical invasor usualmente ocorre nas lesões que contêm cópias múltiplas do genoma viral integrado ao genoma celular, com consequente expressão elevada de E7, e instabilidade genômica celular (zurHausen, 2002; Doorbar, 2005).

A determinação de fatores virais que desempenham papel na patogênese da neoplasia cervical é importante para distinguir mulheres com alto risco de persistência da infecção pelo HPV e de progressão para carcinoma invasor. Dentre os fatores virais, os mais importantes são o tipo de HPV, a quantificação da carga viral por ferramentas da biologia molecular e a determinação da integração do DNA viral no genoma da célula hospedeira (zurHausen, 2002; Scheurer *et al.*, 2005).

Esse processo da carcinogênese cervical é complexo e influenciado pelo microambiente inflamatório do colo uterino porque a progressão da NIC está relacionada diretamente com o aumento do grau da displasia epitelial e aumento intenso do infiltrado inflamatório estromal, principalmente por células mononucleadas, que caracterizam inflamação crônica. A inflamação crônica pode favorecer desequilíbrio imune e o microambiente inflamatório pode favorecer a carcinogênese. Há evidências que a infecção produtiva pelo HPV bloqueie a sinalização inflamatória dependente de NFkB e C/EBP nos ceratinócitos, inibindo, nas lesões persistentes de baixo grau, a inflamação aguda. No entanto, com a progressão da displasia, observa-se intenso aumento do infiltrado inflamatório estromal no colo uterino, fortalecendo a participação da inflamação crônica no processo neoplásico. Entretanto, os mecanismos subjacentes à ativação ou inativação da imunidade inata no colo uterino e ao recrutamento de células inflamatórias permanecem obscuros (Smola, 2017).

Os marcadores de proteínas celulares como o marcador p16 (p16INK4A) estão atualmente disponíveis como marcadores indiretos de integração viral do HPV no genoma do hospedeiro. (Thomison III *et al.*, 2008)

Nesse contexto de interações entre infecção, inflamação crônica e o desenvolvimento do câncer, papel atual e muito relevante é atribuído aos inflamassomas, especialmente ao inflamassoma NLRP3.

## **2.6 - Inflamassoma**

Inflamassomas são complexos multiproteicos intracelulares formados em resposta a sinais de perigo e que desencadeiam mecanismos de defesa da imunidade inata (Vanaja *et al.*, 2015; He *et al.*, 2016). Consistem da associação de receptores NLRP3, do receptor ASC e da caspase-1 (Takano *et al.*, 2016) e funcionam como uma plataforma de sinalização celular para ativação de fatores pró-inflamatórios, tais como interleucinas e caspases (Latz *et al.*, 2013; Vanaja *et al.*, 2014). São ativados por padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs),

como DNA ou RNA viral e padrões moleculares associados a danos (DAMPs) (FIGURA 7) (Takano *et al.*, 2016).

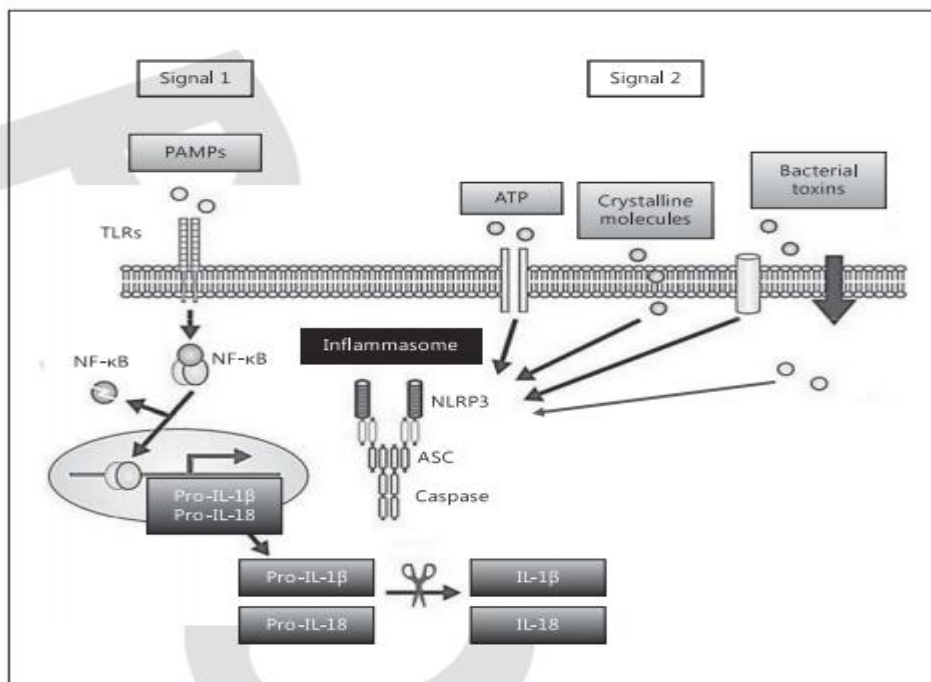


FIGURA 7 – Inflamassomas são ativados por PAMPs e DAMPs. PAMPs incluem DNA viral ou RNA, e DAMPs incluem ATP extracelular e ROS (espécies de oxigênio reativo). O inflamassoma consiste da associação de receptores NLRP3, do receptor ASC e da caspase-1. O inflamassoma NLRP3 requer dois sinais de ativação. O primeiro sinal é a ativação do fator de transcrição NFκB e o segundo requer fatores citoplasmáticos associados à presença de microorganismos e/ou dano de organelas celulares. Transcrito e ativado, o NLRP3 converte a pró caspase-1 inativa em caspase-1 ativa. A caspase-1 converte os precursores de pro-IL-1β e pro-IL-18 em IL-1β e IL-18. Fonte: Adaptado de Takano *et al.*, 2016.

O inflamassoma NLRP3 é capaz de reconhecer uma grande variedade de estímulos exógenos e endógenos, como agonistas microbianos, ATP e partículas. O inflamassoma NLRP3 requer dois sinais de ativação. O primeiro sinal é a ativação do fator de transcrição NFκB e o segundo requer fatores citoplasmáticos associados à presença de microorganismos e/ou dano de organelas celulares, como efluxo de potássio, aumento da concentração de cálcio ou dano mitocondrial (Zhong *et al.*, 2011). Outros inflamassomas são conhecidos como o AIM2 (*Aim2-like receptor* – ALR) que difere do NLRP3 pela formação do inflamassoma com diferentes receptores. (Lamkanfiet *et al.*, 2014)

Transcrito e ativado, o NLRP3 converte a pró caspase-1 inativa em caspase-1 ativa. A caspase-1 converte os precursores de pro-IL-1 $\beta$  e pro-IL-18 em IL-1 $\beta$  biologicamente ativa e IL-18, respectivamente. A IL-1 $\beta$  ativa é um poderoso mediador pró-inflamatório que é gerado em locais de lesão e atua em muitas reações imunes, incluindo o recrutamento de células imunes inatas para o local de infecção (Heet *al.*, 2016). A IL-18, na sua forma biologicamente ativa, induz a imunidade mediada por células. Em resposta a IL-18, há uma intensa produção de IFN- $\gamma$  pelos linfócitos T helper, os quais ativam macrófagos e outras células do sistema imune desenvolvendo um elo entre a imunidade inata e adaptativa. (Fernández *et al.*, 2018)

Caspases são enzimas da família cisteína-aspartato proteases que iniciam ou executam programas celulares, levando a inflamação ou morte celular. As caspases pró-inflamatórias são constituídas por caspase-1 e caspase-11 em camundongos, e homólogos 4/5 em humanos (Schroder *et al.*, 2010). Estudos recentes demonstraram que a caspase-11 em resposta a algumas bactérias promove ativação do inflamassoma NLRP3, levando à ativação de caspase-1, IL-1 $\beta$  e IL-18. O inflamassoma foi chamado de inflamassoma não canônico. (Kayagaki *et al.*, 2013)

Nos últimos anos, vários estudos demonstraram que certos vírus têm a capacidade de ativar inflamassomas, o que contribui para respostas antivirais. Além disso, estudos recentes contribuíram para uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes à evasão imune do hospedeiro por patógenos virais, bem como os papéis de NLRs e inflamassomas na montagem de respostas de hospedeiros antivirais (Shrivastava *et al.*, 2016).

Em relação à infecção pelo HPV e o desenvolvimento da NIC, essas interações ainda apresentam resultados incertos. Poucos estudos demonstraram que o HPV ativa os inflamassomas AIM2 e NLRP3, com favorecimento da progressão da NIC para CCE (Reinholz *et al.*, 2013; Pontillo *et al.*, 2016) enquanto outro demonstrou que a oncoproteína E6 do HPV inibiu a secreção de IL-1 $\beta$ , um dos produtos da ativação do inflamassoma (Niebler *et al.*, 2013).

### **3 - OBJETIVOS**

#### **3.1 - Objetivo geral**

Caracterizar o inflamassoma NLRP3 na neoplasia intraepitelial cervical associada à infecção pelo HPV.

#### **3.2 - Objetivos específicos**

- a) Descrever a expressão imuno-histoquímica dos marcadores NLRP3, caspases-4/5 e 1 e interleucinas IL-1 $\beta$  e 18 em biópsias e blocos de células do colo uterino;
- b) Reproduzir os escores imuno-histoquímicos de Takano e colaboradores (2016) para os marcadores NLRP3, caspases-4/5 e 1 e interleucinas IL-1 $\beta$  e 18 dos compartimentos epitelial, inflamatório e endotelial de biópsias do colo uterino;
- c) Comparar a expressão imuno-histoquímica dos marcadores NLRP3, caspases-4/5 e 1 e interleucinas IL-1 $\beta$  e 18 entre os grupos com e sem neoplasia intraepitelial cervical;
- d) Associar a expressão imuno-histoquímica dos marcadores NLRP3, caspases-4/5 e 1 e interleucinas IL-1 $\beta$  e 18 à infecção por HPV;
- e) Estimar o efeito da expressão imuno-histoquímica dos marcadores NLRP3, caspases-4/5 e 1 e interleucinas IL-1 $\beta$  e 18 na infecção pelo HPV;

## **4 - MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 - Considerações éticas**

O projeto adotou todas as normas de pesquisas envolvendo seres humanos contidas na Resolução 466 / 2012 do Conselho Nacional de Saúde, para salvaguardar os direitos e o bem-estar das pessoas estudadas. Este projeto foi encaminhado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP) sob o parecer nº CAAE 61117616.0000.5149.

### **4.2 - Delineamento e estratégias de estudo**

Trata-se de estudo observacional, transversal e comparativo dos aspectos de marcação imuno-histoquímica em amostras de biópsias do colo uterino, oriundas do Serviço de Anatomia Patológica e Citopatologia do Hospital das Clínicas da UFMG e blocos celulares de citologia em meio líquido do colo uterino, provenientes do NUPAD (Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico) da Faculdade de Medicina da UFMG.

Considerando a classificação convencional (vide Classificação Citológica Brasileira na Figura 1) das amostras de biópsias do colo uterino, foram definidos os seguintes grupos para estudo das biópsias:

- Grupo INF: amostras com diagnóstico histopatológico de cervicite ou inflamação inespecífica do colo uterino;
- Grupo NIC1: amostras com diagnóstico histopatológico de neoplasia intraepitelial cervical grau 1;
- Grupo NIC 2/3: amostras com diagnóstico histopatológico de neoplasia intraepitelial cervical grau 2/3.

As amostras de citologia em meio líquido do colo uterino foram agrupadas nos seguintes conjuntos para estudo dos ceratinócitos:

- Grupo INF: amostras com diagnóstico citopatológico de inflamação ou negativas para lesão intraepitelial ou neoplasia;
- Grupo LSIL: amostras de citologia com diagnóstico citopatológico de lesão intraepitelial escamosa de baixo grau/infecção por HPV.
- Grupo HSIL: amostras de citologia com diagnóstico citopatológico de lesão intraepitelial escamosa de alto grau.

### 4.3 - Critérios de seleção, inclusão e exclusão

Os critérios para seleção das amostras foram:

- Blocos de parafina armazenados no Serviço de Anatomia Patológica e Citopatologia do Hospital das Clínicas da UFMG, coletados no período de 2015 a 2017, com tamanho do fragmento maior que 5 mm;
- Amostras de citologia em meio líquido do colo uterino processadas no NUPAD da UFMG, coletadas no período de 2016 a 2017, com quantidade satisfatória de células;
- Concordância entre a observação original e classificação histopatológica/citopatológica padronizadas realizadas pelos patologistas pesquisadores do estudo.

Foram incluídas as amostras que preencheram os seguintes critérios:

- Concordância entre diagnósticos;
- Amostras com quantidade de tecido/células suficiente.

Foram excluídas as amostras que preencheram o seguinte critério:

- Casos com diagnóstico discordante;
- Amostras insuficientes;
- Amostras com artefatos por processamento.

### 4.4 - Blocos celulares (*cellblock*)

A preparação do bloco de células (*cellblock*), a partir das amostras de citologia em meio líquido presentes na solução *ClearPrep®* (*ResolutionBiomedical, Inc.*, Tustin, CA), foi realizada com etapa inicial de centrifugação de 10 mL da suspensão celular por 10 minutos a 400 x g a temperatura ambiente, em tubo Falcon de 50 mL (rotor 6441, centrífuga Sorvall RT Legend). O sobrenadante foi cuidadosamente desprezado e, em seguida, o sedimento de células foi ressuscitado em 3 a 5 gotas de plasma humano. Imediatamente após, foram adicionados 25 a 75 µL de trombina (*Thrombinfrombovine plasma*; Sigma-Aldrich, T7513-100UN), Após 5 a 10 minutos, a temperatura ambiente, ocorreu à formação do coágulo.

O coágulo contendo as células cervicais, devidamente identificado, foi transferido para um cassete de histologia e armazenado em solução de formaldeído a 10% (Synth). As amostras foram processadas utilizando o processador de tecidos (modelo PT 05, LUPETEC®,

Brasil), de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente, os blocos celulares foram incluídos em parafina (L: 108080, Synth).

#### 4.5 - Imuno-histoquímica

Lâminas histológicas contendo cortes seriados de 5  $\mu\text{m}$  das amostras parafinadas (biópsias e blocos celulares) foram incubadas em estufa, a 56°C. Posteriormente, as amostras foram submetidas a etapas de desparafinação e reidratação, com três lavagens em xilol, por cinco minutos cada, e três lavagens em álcool etílico (PA), por cinco minutos. Após a reidratação, foi realizada a recuperação antigênica induzida pelo calor, em solução de citrato de sódio, a 0,01 M (pH 6,0) a 90°C por 20 minutos no vapor e resfriadas a temperatura ambiente por 20 minutos. A peroxidase endógena dos tecidos e as proteínas inespecíficas foram bloqueadas nas diferentes etapas.

A marcação para imuno-histoquímica foi feita separadamente com os seguintes anticorpos primários: anti-NLRP3 (Cryopyrin-H-66: sc-66846, Santa Cruz Biotechnology, INC), anti-CASP1 (Caspase-1-14F468: sc-56036, Santa Cruz Biotechnology, INC); anti-CASP4/5 (Caspase-11 p20-A2: sc-374615, Santa Cruz Biotechnology, INC); anti-IL-18 (IL 18-H173: sc-7954, Santa Cruz Biotechnology, INC); e anti-IL-1 $\beta$  (IL 1 $\beta$ -2H12: sc-130323, Santa Cruz Biotechnology, INC). Após padronização desses anticorpos primários no Laboratório de Patologia Molecular, foram definidas as diluições de 1:500 para os anticorpos primários anti-NLRP3, anti-CASP1 e anti-IL  $\beta$ ; 1:300 para os anticorpos primários anti-CASP4/5 e anti-IL-18, feitas com solução diluidora para anticorpos (Erviagas). Para detecção dos anticorpos primários, foi utilizado o kit *NovoLink Max PolymerDetection Novocastra TM* (Leica Microsystems). Incubação 60 minutos.

Os cortes foram incubados com o sistema universal de detecção por polímeros do kit NovoLink por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  da solução reveladora fornecida pelo kit contendo o cromógeno diamino-benzidina 3,3 (DAB) e a reação incubada a temperatura ambiente por cinco minutos. A contra coloração foi realizada mergulhando as lâminas em solução de hematoxilina de Harris (Cód. 248, Vetec) por 30 segundo.

As lâminas foram analisadas utilizando-se o microscópio óptico Olympus BX. As análises qualitativa e semi-quantitativa foram realizadas em campos em aumento do microscópio (40x) em áreas aleatórias e adequadas à interpretação dos dois observadores. As classificações finais foram obtidas por consenso entre os dois observadores. Os controles



externo e interno (intralâmina) e o monitoramento da qualidade das reações imuno-histoquímicas foram realizadas amostras pele saudável, provenientes de procedimentos de mamoplastia e doadas ao Laboratório de Patologia Molecular.

As análises qualitativas da intensidade e do percentual da reatividade imuno-histoquímica dos marcadores indicados acima nos compartimentos epitelial, inflamatório e endotelial, foram realizadas de acordo com a categorização dos parâmetros indicados na FIGURA 8:

<b>Intensidade</b>		<b>Percentual</b>	
Parâmetro	Descrição	Parâmetro	Descrição
0	Ausente	0	0%
1	Fraca ou uma cruz (+)	1	1% a 50%
2	Moderada ou duas cruces (++)	2	51% a 75%
3	Forte ou três cruces (+++)	3	76% a 100%

FIGURA 8 - Parâmetros para análise qualitativa da reatividade imuno-histoquímica.

Para as análises semi-quantitativas, foi estabelecido um escore da expressão imuno-histoquímica dos marcadores selecionados, de acordo com Takano e colaboradores (2016). Para cada marcador, foi feita a multiplicação da categoria da intensidade pela categoria do percentual da reatividade imuno-histoquímica no epitélio, no infiltrado inflamatório e no endotélio. De acordo com o produto dessa multiplicação, a expressão imuno-histoquímica dos marcadores foi classificada em dois grupos: “expressão elevada e forte” (1) ou “expressão basal e fraca” (0). A FIGURA 9 apresenta esse escore semi-quantitativo da imuno-histoquímica, destacando produtos maiores ou iguais a 4 (destaque vermelho) como “expressão elevada” e produtos menores ou iguais a 3 (destaque azul) como “expressão basal”.

	PERCENTUAL			
INTENSIDADE	0	1	2	3
0	0	0	0	0
1	0	1	2	3
2	0	2	4	6
3	0	3	6	9

FIGURA 9 - Parâmetros para análise semi-quantitativa da imuno-histoquímica.

#### 4.6 - Detecção e genotipagem do HPV

As detecções substitutiva e direta do HPV nas amostras de biópsia e de citologia em meio líquido, respectivamente, foram realizadas por metodologias distintas. A imuno-histoquímica para o marcador p16 (p16INK4A) foi utilizada para detecção substitutiva do HPV nas biópsias do colo uterino, de acordo com Takano e colaboradores (2016).

Todas as etapas da imuno-histoquímica para p16 foram similares às descritas no tópico Imuno-histoquímica acima, exceto pelo uso do anticorpo primário anti-p16 (Anti-p16INK4: 550834, BD Biosciences, INC), na diluição de 1:50. A positividade da reação imuno-histoquímica foi considerada indicativa da presença do HPV no epitélio da mucosa cervical.

A detecção e genotipagem do HPV nas amostras de citologia em meio líquido foram realizadas por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real, no NUPAD, utilizando o *High RiskAbbott Real Time Kit*, de acordo com as recomendações do fabricante. O referido teste (*High RiskAbbott Real Time Kit*) detecta 14 genótipos de HPV de alto risco (16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,66 e 68), destacando os tipos 16 e 18 de HPV.

#### 4.7 - Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram armazenados em planilhas eletrônicas usando o programa EXCEL e submetidos à análise estatística através dos programas R (versão 3.1.2) e MINITAB 17 (versão 17). Para análises descritivas, as variáveis categóricas das abordagens qualitativa e semi-quantitativa foram apresentadas como números e porcentagens. Para análise comparativa da diferença entre os grupos, utilizou-se o teste t de Student. As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando  $p < 0.05$ . Para o estabelecimento de modelos estatísticos preditivos da relação entre os marcadores e os estágios da neoplasia cervical, foi utilizada a análise de regressão logística multinomial no programa VGAM do software estatístico R (Versão 2.15.3; <http://www.r-project.org>) e MINITAB 17.

## 5 - RESULTADOS

Os resultados das análises qualitativas e semi-quantitativas da imunorreatividade dos marcadores NLRP3, Caspases-4/5, Caspase-1, IL-1 $\beta$  e IL-18, nesta ordem, estão descritos nas biópsias e depois nos blocos celulares, na forma de tópicos, de acordo com a seguinte sequência de ilustrações:

- Fotomicrografias com os resultados obtidos nas reações de imuno-histoquímica. Cada figura apresenta os detalhes da imunorreatividade no epitélio, infiltrado inflamatório e endotélio.
- Tabelas com a classificação da intensidade da imunorreatividade para epitélio, infiltrado inflamatório e endotélio. Cada nível de intensidade descreve o número de amostras (n) e o percentual desse n em relação aos demais grupos (% linha).
- Gráficos de barras com os percentuais da imunorreatividade de cada marcador para o epitélio, infiltrado inflamatório e endotélio. A classificação da intensidade e os gráficos de barras seguiram os critérios definidos para análise qualitativa da reatividade imuno-histoquímica na FIGURA 8 (Vide Página 19).
- Escores para comparação dos marcadores entre os grupos do estudo. As tabelas apresentadas mostram os resultados dos escores da expressão imuno-histoquímica dos marcadores de acordo com os parâmetros para análise semi-quantitativa da imuno-histoquímica definidos na FIGURA 9 (Vide Página 19), categorizados em expressão elevada (1) e basal (0).

Antes, porém, são apresentados os resultados das amostras do controle externo de qualidade das reações imuno-histoquímicas utilizados no estudo. A TABELA 1 apresenta, para cada local ou compartimento selecionado, o nível ou categoria das variáveis intensidade e percentual de imunorreatividade dos marcadores NLRP3, Caspases-4/5, Caspases-1, IL-1 $\beta$  e IL-18.

TABELA 1 – Variáveis intensidade e percentual de imunorreatividade dos marcadores NLRP3, Caspases-4/5, Caspase-1, IL-1 $\beta$  e IL-18 nas amostras do controle externo de qualidade.

LOCAL	VARIÁVEL	NÍVEL	NLRP3	Caspases 4/5	Caspase 1	IL1 $\beta$	IL18	
			n %	n %	n %	n %	n %	
Epitélio	Intensidade	1	5 100	5 100	5 100	5 100	5 100	
		1	5 100	0 0	5 100	5 100	5 100	
	Percentual	2	0 0	5 100	0 0	0 0	0 0	
		0	5 100	5 100	5 100	5 100	5 100	
	Infiltrado inflamatório	Intensidade	0	5 100	5 100	5 100	5 100	5 100
			0	5 100	5 100	5 100	5 100	5 100
Endotélio	Intensidade	0	5 100	5 100	5 100	5 100	5 100	
		1	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	
	Percentual	0	5 100	5 100	5 100	5 100	5 100	
		1	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	

As amostras do controle externo de qualidade demonstraram fraca intensidade epitelial de imunorreatividade para todos os marcadores, sendo essa reatividade restrita a camada basal do epitélio nos marcadores NLRP3, Caspase-1, IL-1 $\beta$  e IL-18 e atingindo dois terços do epitélio no marcador Caspases-4/5. No infiltrado inflamatório e no endotélio não houve reatividade de nenhuma amostra.

### 5.1 - NLRP3

A FIGURA 10 e a TABELA 2 apresentam os resultados da intensidade da imunorreatividade do marcador NLRP3 no epitélio, infiltrado inflamatório e endotélio das biópsias dos grupos INF, NIC1 e NIC2/3.

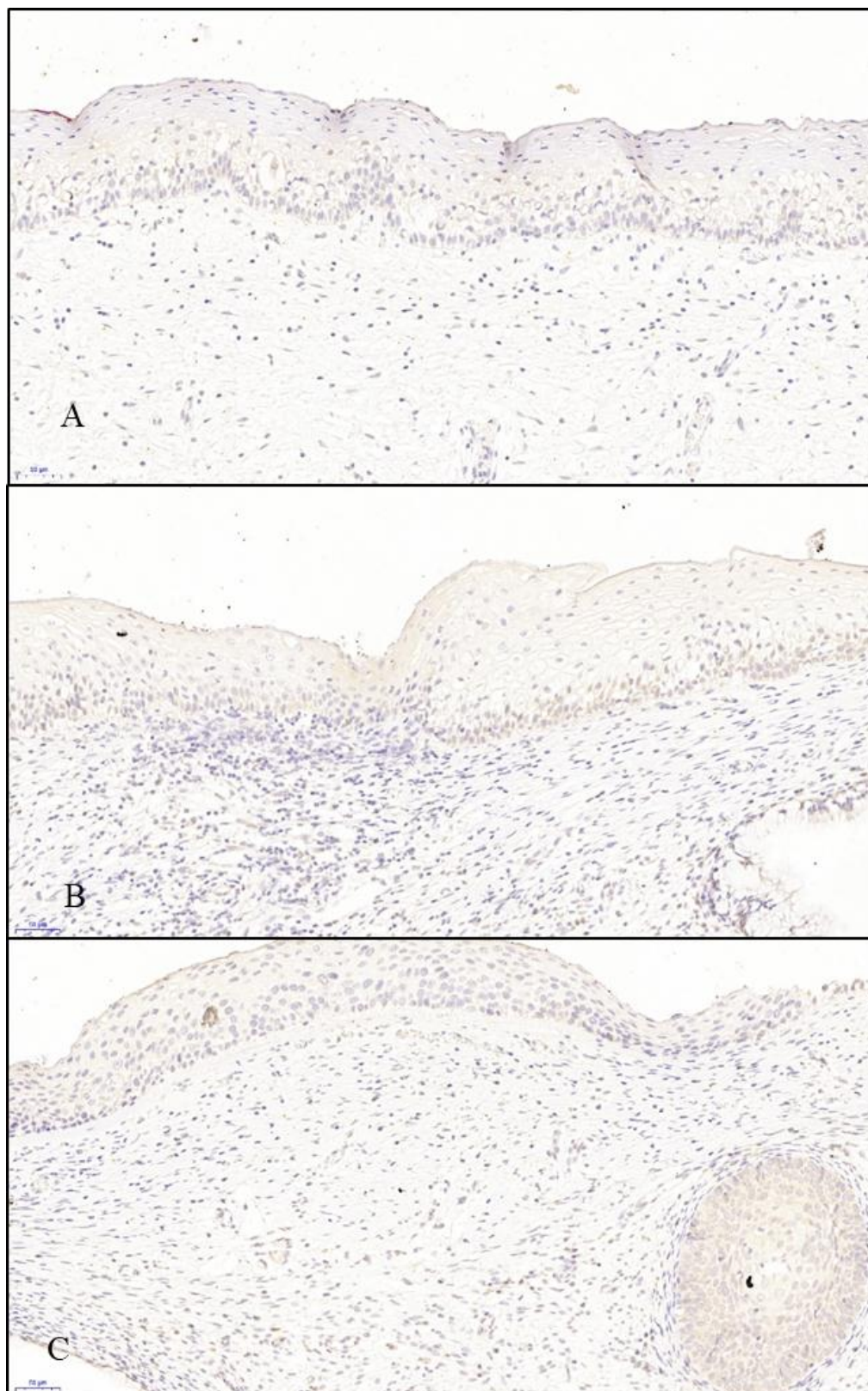


FIGURA 10- Imunorreatividade do marcador NLRP3 nos compartimentos epitelial, inflamatório e endotelial das biópsias dos grupos INF, NIC1 e NIC2/3 do colo uterino. A- Presença de imunorreatividade fraca nos compartimentos epitelial, inflamatório e endotelial da mucosa escamosa inflamada (INF); B e C- Presença de imunorreatividade moderada nos compartimentos epitelial, inflamatório e endotelial da mucosa escamosa com neoplasias intraepiteliais de graus 1 e 2/3 (NIC1 e NIC2/3), respectivamente.

TABELA 2 – Intensidade da imunorreatividade do marcador NLRP3 nos compartimentos epitelial, inflamatório e endotelial das biópsias dos grupos INF, NIC1 e NIC2/3 do colo uterino

LOCAL	INTENSIDADE	GRUPO			
		INF	NIC1	NIC2/3	TOTAL
		n % linha	n % linha	n % linha	n % linha
<b>Epitélio</b>	0	1 100	0 0	0 0	1 100
	1	10 33,33	14 46,67	6 20	30 100
	2	0 0	0 0	4 100	4 100
	3	0 0	0 0	0 0	0 0
	Total	11 31,43	14 40	10 28,57	35 100
	0	4 66,67	2 33,33	0 0	6 100
	1	5 25	9 45	6 30	20 100
<b>Infiltrado inflamatório</b>	2	2 22,22	3 33,33	4 44,44	9 100
3	0 0	0 0	0 0	0 0	
Total	11 31,43	14 40	10 28,57	35 100	
<b>Endotélio</b>	0	4 66,67	2 33,33	0 0	6 100
	1	7 25,93	11 40,74	9 33,33	27 100
	2	0 0	1 50	1 50	2 100
	3	0 0	0 0	0 0	0 0
	Total	11 31,43	14 40	10 28,57	35 100

\* INF: denominação do grupo cervicite inespecífica; NIC: neoplasia intraepitelial cervical

A TABELA 2 mostra apenas um caso com intensidade ausente e dez amostras com intensidade fraca no compartimento epitelial do grupo INF. No grupo NIC1, todas as

amostras exibiram epitélio com imunorreatividade com intensidade fraca, e no grupo NIC2/3 60% das amostras apresentaram intensidade fraca e 40% intensidade moderada.

De acordo com o infiltrado inflamatório, no grupo INF, quatro amostras apresentaram intensidade ausente, cinco com intensidade fraca e duas com intensidade moderada. No grupo NIC1, duas amostras apresentaram intensidade ausente, nove amostras com intensidade fraca e três com intensidade moderada. No grupo NIC2/3, 60% das amostras apresentaram intensidade fraca e 40% intensidade moderada.

O compartimento endotelial apresentou, para o grupo INF, quatro amostras com intensidade ausente e sete com intensidade fraca. No grupo NIC1, duas amostras apresentaram intensidade ausente, onze com intensidade fraca e uma com intensidade moderada, e no grupo NIC2/3, 90% das amostras apresentaram intensidade fraca e 10% intensidade moderada.

Destaque, de acordo com a TABELA 2, para a presença de imunorreatividade de NLRP3 com intensidade moderada no epitélio de parte relevante das amostras (4 casos) do grupo NIC2/3, representando as únicas amostras de todos os grupos com essa intensidade de reatividade. No infiltrado inflamatório e no endotélio, todos os grupos apresentaram proporções próximas de amostras com intensidade moderada e fraca, respectivamente. Nenhuma amostra dos três grupos do estudo apresentou intensidade forte nos compartimentos epitelial, inflamatório e endotelial.

O percentual da imunorreatividade do marcador NLRP3, apresentado no gráfico de barras (FIGURA 11), também destaca a reatividade desse marcador no epitélio, infiltrado inflamatório e endotélio das biópsias do grupo NIC 2/3, indicando a proporção das células marcadas em cada compartimento dos grupos do estudo.

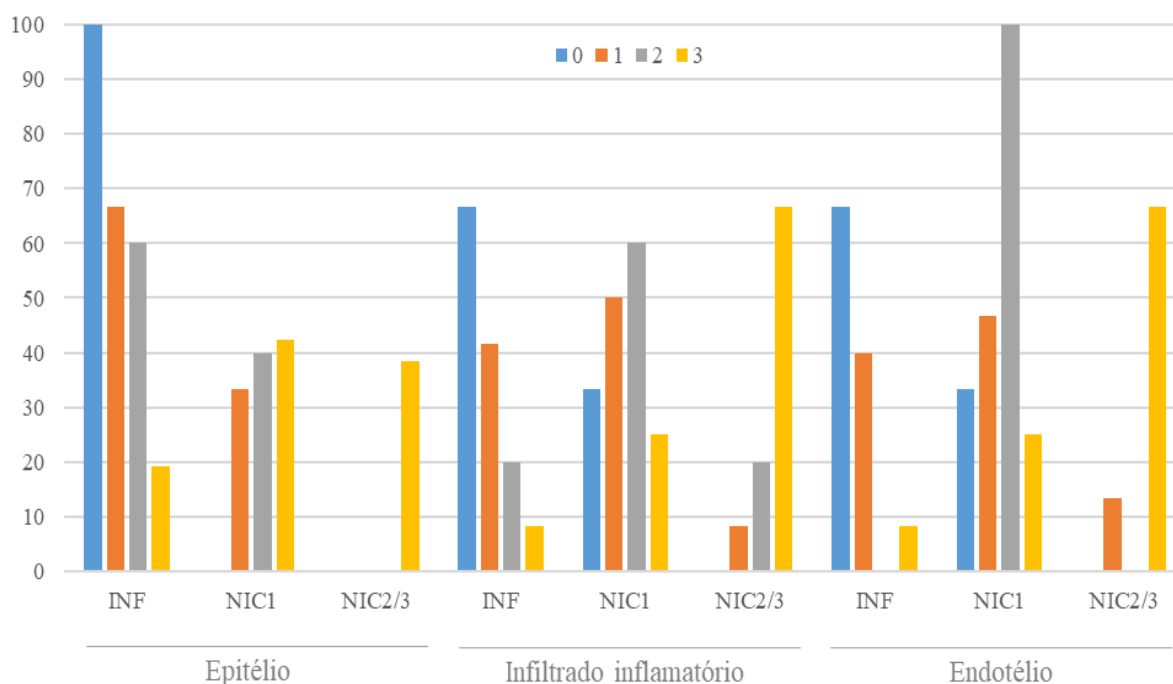


FIGURA 11 – Percentual da imunorreatividade do marcador NLRP3 nos compartimentos epitelial, inflamatório e endotelial das biópsias dos grupos INF, NIC1 e NIC2/3 do colo uterino

A FIGURA 11 mostra que há, no compartimento epitelial do grupo INF, um predomínio de ausência de marcação. No grupo NIC1 há marcação nas camadas basal, intermediária e superficial do epitélio e no grupo NIC2/3 marcação predominante de todo o epitélio. No infiltrado inflamatório e no compartimento endotelial, a FIGURA 11 mostra que há um percentual de marcação variável em todos os grupos, com um predomínio de percentual de marcação acima de 75% nas amostras do grupo NIC2/3.

## 5.2 - Caspases-4/5

A FIGURA 12 e a TABELA 3 apresentam os resultados da intensidade da imunorreatividade do marcador Caspases-4/5 no epitélio, infiltrado inflamatório e endotélio das amostras dos grupos INF, NIC1 e NIC2/3.



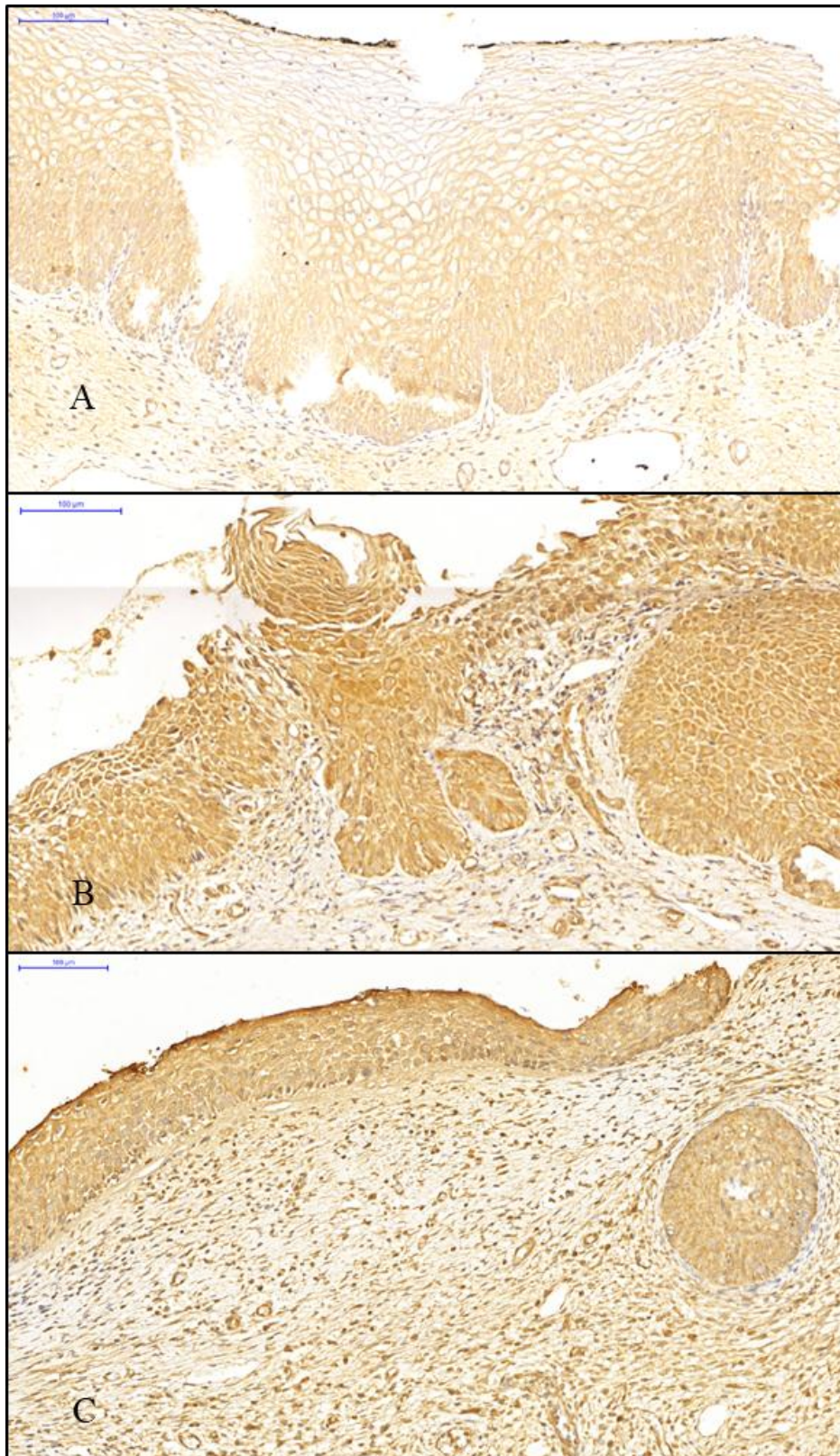


FIGURA 12 - Imunorreatividade do marcador Caspases-4/5 nos compartimentos epitelial, inflamatório e endotelial das biópsias dos grupos INF, NIC1 e NIC2/3 do colo uterino. A- Presença de imunorreatividade fraca nos compartimentos epitelial, inflamatório e endotelial da mucosa escamosa inflamada (INF); B e C- Presença de imunorreatividade forte nos compartimentos epitelial, inflamatório e endotelial da mucosa escamosa com neoplasias intraepiteliais de graus 1 e 2/3 (NIC1 e NIC2/3), respectivamente.

TABELA 3 – Intensidade da imunorreatividade do marcador Caspases-4/5 nos compartimentos epitelial, inflamatório e endotelial das biópsias dos grupos INF, NIC1 e NIC2/3 do colo uterino

LOCAL	INTENSIDADE	GRUPO			
		INF	NIC1	NIC2/3	TOTAL
		n % linha	n % linha	n % linha	n % linha
<b>Epitélio</b>	0	0 0	0 0	0 0	0 0
	1	1 50	1 50	0 0	2 100
	2	10 33,33	12 40	8 26,67	30 100
	3	0 0	1 33,33	2 66,67	3 100
	Total	11 31,43	14 40	10 28,57	35 100
	0	0 0	0 0	0 0	0 0
	1	3 25	9 75	0 0	12 100
<b>Infiltrado inflamatório</b>	2	7 50	4 28,57	3 21,43	14 100
	3	1 11,11	1 11,11	7 77,78	9 100
	Total	11 31,43	14 40	10 28,57	35 100
	0	0 0	0 0	0 0	0 0
<b>Endotélio</b>	1	3 30	7 70	0 0	10 100
	2	6 31,58	6 31,58	7 36,84	19 100
	3	2 33,33	1 16,67	3 50	6 100
	Total	11 31,43	14 40	10 28,57	35 100

\* INF: denominação do grupo cervicite inespecífica; NIC: neoplasia intraepitelial cervical

A TABELA 3 mostra que no compartimento epitelial do grupo INF, um caso apresentou intensidade fraca e dez casos intensidade moderada. No grupo NIC1, um caso apresentou intensidade fraca, doze casos intensidade moderada e um caso intensidade forte, e no grupo NIC2/3 80% das amostras apresentaram intensidade moderada e 20% intensidade forte.

De acordo com o infiltrado inflamatório, no grupo INF, três casos apresentaram intensidade fraca, sete casos com intensidade moderada e um caso com intensidade forte. No grupo NIC1, nove amostras apresentaram intensidade fraca, quatro com intensidade moderada e um com intensidade forte, e no grupo NIC2/3, 30% das amostras apresentaram intensidade moderada e 70% intensidade forte.

O compartimento endotelial demonstrou que nenhuma amostra apresentou intensidade ausente, para o grupo INF, três com intensidade fraca, seis com intensidade moderada e dois com intensidade forte. No grupo NIC1, sete com intensidade fraca, seis com intensidade moderada e um com intensidade forte, e no grupo NIC2/3, 70% das amostras apresentaram intensidade moderada e 30% intensidade forte.

Destaque, de acordo com a TABELA 3, para a presença de imunorreatividade de Caspases-4/5 com intensidade moderada e forte na maioria das amostras dos grupos NIC1 e NIC2/3. Detalhadamente, os três grupos apresentaram intensidade moderada nos compartimentos epitelial e endotelial da maioria das amostras dos grupos. No infiltrado inflamatório, intensidade majoritariamente moderada e forte, respectivamente, ocorreu nos grupos INF e NIC2/3. Surpreendentemente, a maioria das amostras do grupo NIC1 apresentou intensidade fraca no infiltrado inflamatório. Adicionalmente, todas as amostras do controle externo de qualidade apresentaram intensidade de imunorreatividade do marcador Caspases-4/5 ausente, no infiltrado inflamatório e endotélio.

O percentual da imunorreatividade do marcador Caspases-4/5 apresentado no gráfico de barras abaixo (FIGURA 13) que demonstra o percentual de células marcadas para a Caspases-4/5 no epitélio, infiltrado inflamatório e endotélio.

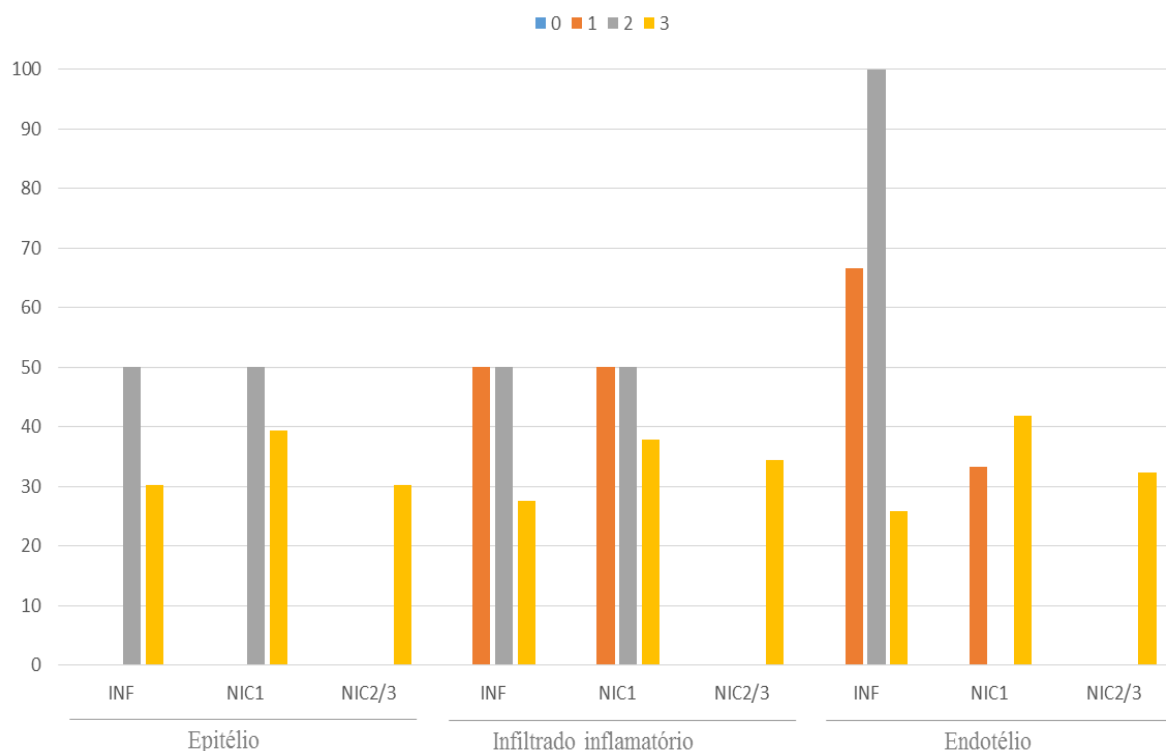


FIGURA 13 – Percentual da imunorreatividade do marcador Caspases-4/5 nos compartimentos epitelial, inflamatório e endotelial das biópsias dos grupos INF, NIC1 e NIC2/3 do colo uterino

Na FIGURA 13, o compartimento epitelial apresenta um percentual de marcação acima de 50%, em todas as células do compartimento, para todos os grupos estudados. O infiltrado inflamatório e o endotélio demonstram percentual de marcação de todas as células, com destaque para as amostras do grupo NIC2/3, onde todas as amostras possuem percentual de marcação acima de 75%.

### 5.3 - Caspase-1

A FIGURA 14 e a TABELA 4 apresentam os resultados da intensidade da imunorreatividade do marcador Caspase-1 no epitélio, infiltrado inflamatório e endotélio das amostras dos grupos INF, NIC1 e NIC2/3.

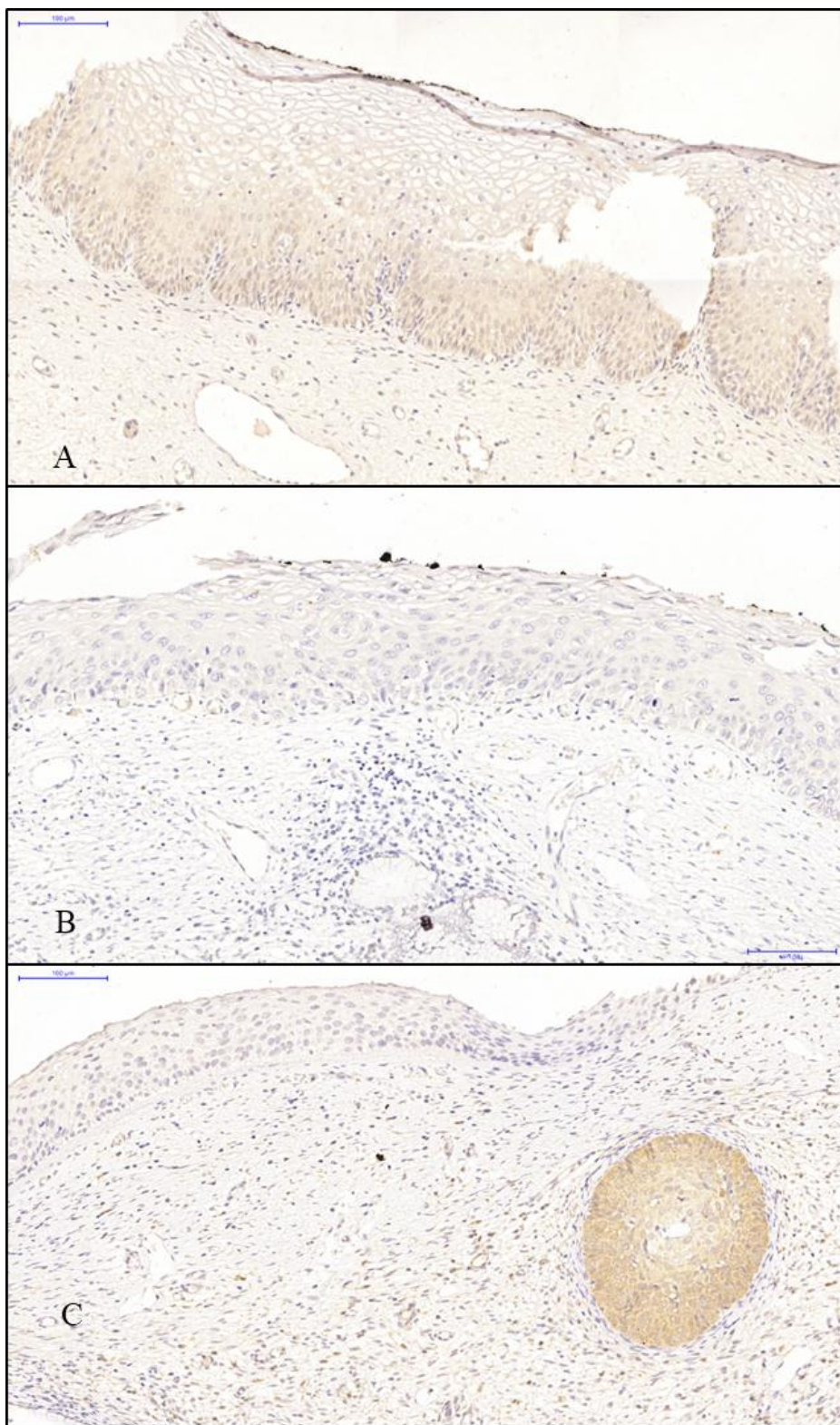


FIGURA 14 - Imunorreatividade do marcador caspase-1 nos compartimentos epitelial, inflamatório e endotelial das biópsias dos grupos INF e NIC1 do colo uterino. A- Presença de imunorreatividade fraca nos compartimentos epitelial, inflamatório e endotelial da mucosa escamosa inflamada (INF); B - Presença de imunorreatividade forte nos compartimentos epitelial, inflamatório e endotelial da mucosa escamosa com neoplasia intraepitelial de grau 1 (NIC1); C- Presença de imunorreatividade forte nos compartimentos epitelial e inflamatório da mucosa escamosa com neoplasia intraepitelial de grau 2/3 (NIC2/3).

TABELA 4 – Intensidade da imunorreatividade do marcador caspase-1 nos compartimentos epitelial, inflamatório e endotelial das biópsias dos grupos INF, NIC1 e NIC2/3 do colo uterino.

LOCAL	INTENSIDADE	GRUPO			
		INF	NIC1	NIC2/3	TOTAL
		n % linha	n % linha	n % linha	n % linha
<b>Epitélio</b>	0	4	3	0	7
		57,14	42,86	0	100
	1	5	9	4	18
		27,78	50	22,22	100
	2	2	2	6	10
		20	20	60	100
3	0	0	0	0	
Total		11	14	10	35
		31,43	40	28,57	100
<b>Infiltrado inflamatório</b>	0	6	7	0	13
		46,15	53,85	0	100
	1	4	3	6	13
		30,77	23,08	46,15	100
	2	1	4	4	9
		11,11	44,44	44,44	100
3	0	0	0	0	
Total		11	14	10	35
		31,43	40	28,57	100
<b>Endotélio</b>	0	4	2	0	6
		66,67	33,33	0	100
	1	7	11	9	27
		25,93	40,74	33,33	100
	2	0	1	1	2
		0	50	50	100
3	0	0	0	0	
Total		11	14	10	35
		31,43	40	28,57	100

\* INF: denominação do grupo cervicite inespecífica; NIC: neoplasia intraepitelial cervical

A TABELA 4 mostra que no compartimento epitelial do grupo INF, quatro casos apresentaram intensidade ausente, cinco casos intensidade fraca e dois casos intensidade moderada. No grupo NIC1, sete casos apresentaram intensidade ausente, três casos intensidade fraca e quatro casos intensidade moderada, e no grupo NIC2/3 40% das amostras apresentaram intensidade fraca e 60% intensidade moderada.

De acordo com o infiltrado inflamatório, no grupo INF, seis amostras apresentaram intensidade ausente, quatro intensidade fraca e uma intensidade moderada. No grupo NIC1, duas amostras apresentaram intensidade ausente, nove com intensidade fraca e três intensidade moderada, e no grupo NIC2/3, 60% das amostras apresentaram intensidade fraca e 40% intensidade moderada. Destaque, de acordo com a TABELA 4, para a presença de imunorreatividade de caspase-1 com intensidade moderada nos compartimentos epitelial e inflamatório na maioria das amostras do grupo NIC2/3.

O compartimento endotelial demonstrou, para o grupo INF, quatro amostras que apresentaram intensidade ausente e sete com intensidade fraca. No grupo NIC1, duas amostras apresentaram intensidade ausente, onze com intensidade fraca e uma intensidade moderada, e no grupo NIC2/3, 90% das amostras apresentaram intensidade fraca e 10% intensidade moderada.

Destaque, de acordo com a TABELA 4, para a presença de imunorreatividade de caspase-1 com intensidade epitelial predominantemente moderada na maioria das amostras do grupo NIC2/3, e intensidade fraca no compartimento endotelial na maioria das amostras deste grupo. A intensidade foi fraca nos compartimentos epitelial e endotelial da maioria das amostras dos grupos INF e NIC1. No infiltrado inflamatório, intensidade predominantemente fraca ocorreu no grupo NIC2/3, ausente no grupo INF e no grupo NIC1 se dividiu com 50% ausente e os outros 50% entre fraca e moderada.

O percentual da imunorreatividade do marcador caspase-1 está apresentado no gráfico de barras abaixo (Figura 15), que demonstra o percentual de células marcadas para a Caspase-1 no epitélio, infiltrado inflamatório e endotélio.

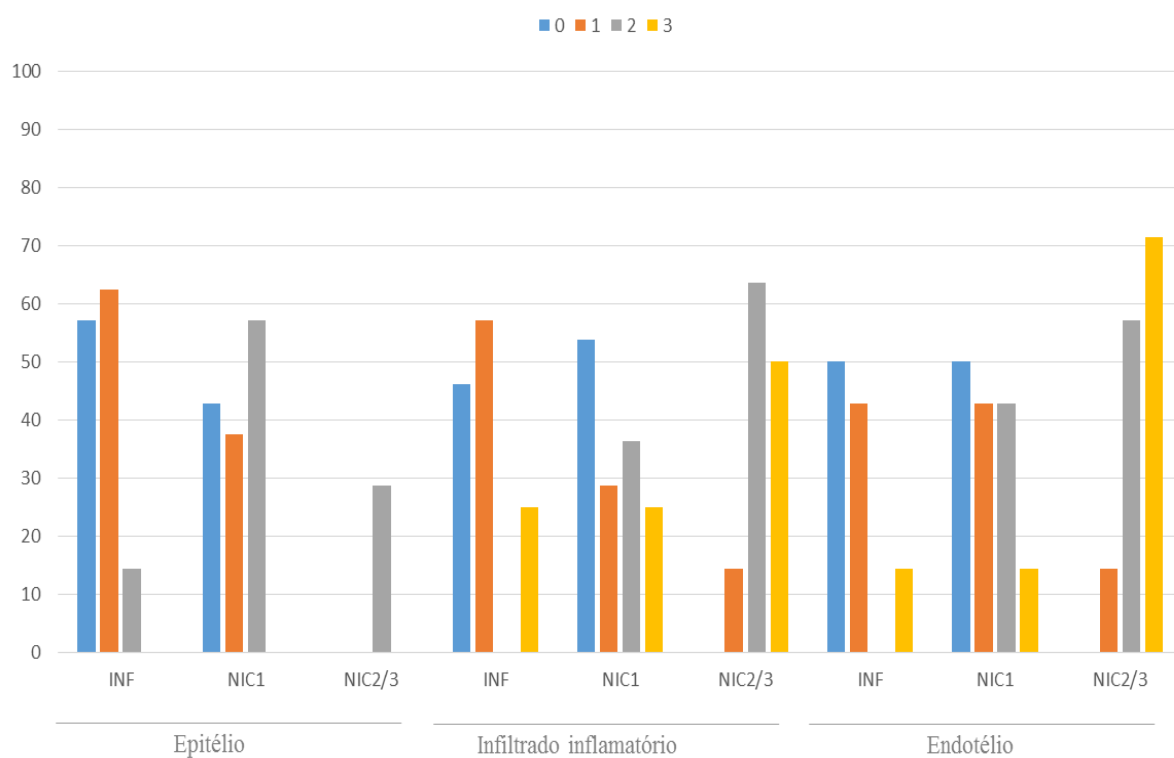


FIGURA 15 – Percentual da imunorreatividade do marcador caspase-1 nos compartimentos epitelial, inflamatório e endotelial das biópsias dos grupos INF, NIC1 e NIC2/3 do colo uterino.

A FIGURA 15 destaca um aumento progressivo no percentual de marcação nos compartimentos epitelial, inflamatório e endotelial do grupo INF para o grupo NIC1 e deste para o grupo NIC2/3, onde a marcação atinge um percentual majoritário acima de 50%.

#### 5.4 - IL-1 $\beta$

A FIGURA 16 e a TABELA 5 apresentam os resultados da intensidade da imunorreatividade do marcador IL-1 $\beta$  no epitélio, infiltrado inflamatório e endotélio das amostras dos grupos INF, NIC1 e NIC2/3.



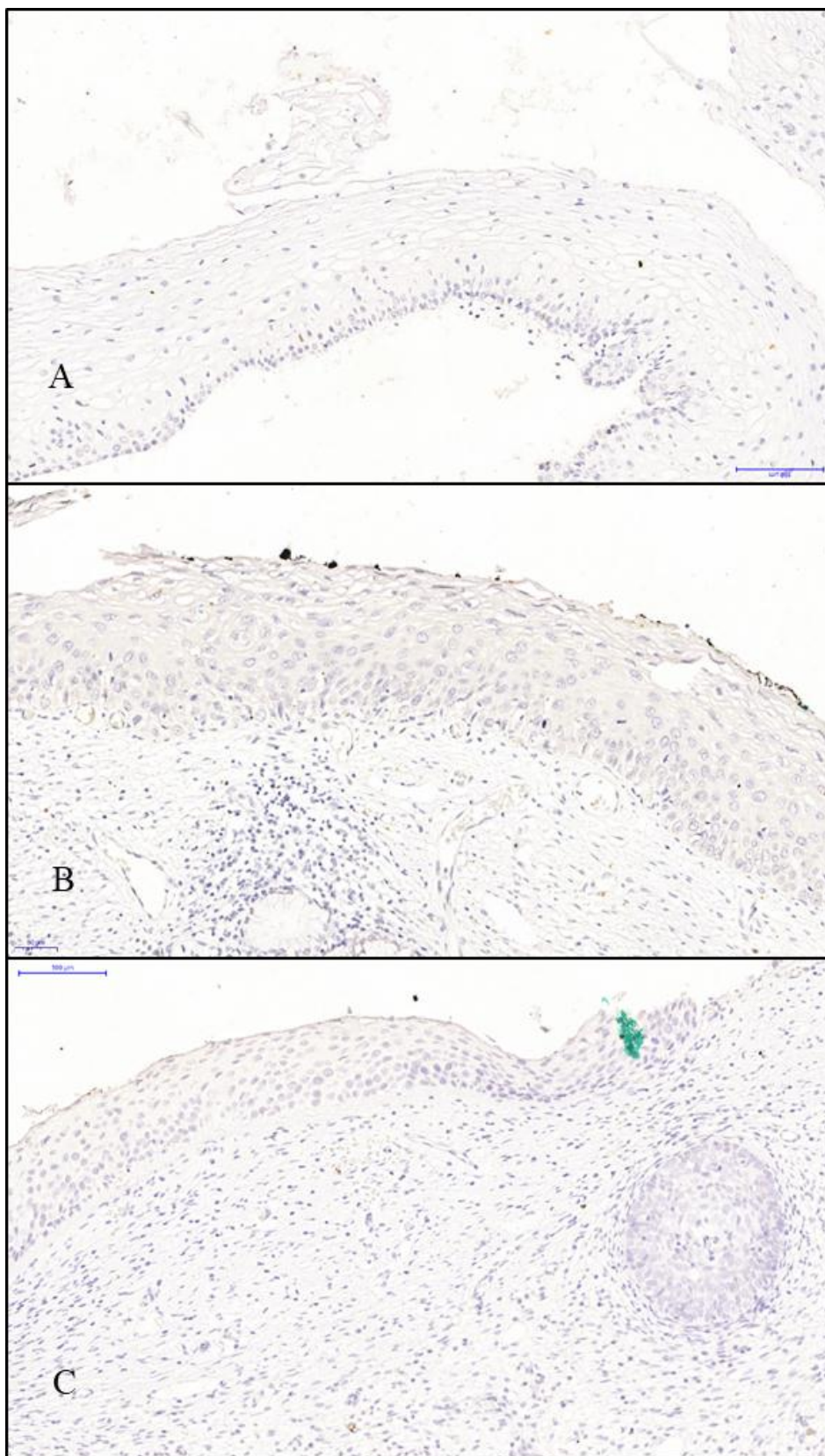


FIGURA 16 - Imunorreatividade do marcador IL-1 $\beta$  nos compartimentos epitelial, inflamatório e endotelial das biópsias dos grupos INF e NIC1 do colo uterino. A, B e C- Presença de imunorreatividade fraca nos compartimentos epitelial, inflamatório e endotelial da mucosa escamosa inflamada (INF) e com neoplasias intraepiteliais de graus 1 e 2 (NIC1 e NIC2/3).

TABELA 5 – Intensidade da imunorreatividade do marcador IL-1 $\beta$  nos compartimentos epitelial, inflamatório e endotelial das biópsias dos grupos INF, NIC1 e NIC2/3 do colo uterino.

LOCAL	INTENSIDADE	GRUPO			
		INF	NIC1	NIC2/3	TOTAL
		n % linha	n % linha	n % linha	n % linha
<b>Epitélio</b>	0	10 62,5	6 37,5	0 0	16 100
	1	1 5,26	8 42,11	10 52,63	19 100
	2	0 0	0 0	0 0	0 0
	3	0 0	0 0	0 0	0 0
	Total	11 31,43	14 40	10 28,57	35 100
	0	10 31,25	12 37,5	10 31,25	32 100
<b>Infiltrado inflamatório</b>	1	1 50	1 50	0 0	2 100
	2	0 0	1 100	0 0	1 100
	3	0 0	0 0	0 0	0 0
	Total	11 31,43	14 40	10 28,57	35 100
	0	10 32,26	11 35,48	10 32,26	31 100
<b>Endotélio</b>	1	1 25	3 75	0 0	4 100
	2	0 0	0 0	0 0	0 0
	3	0 0	0 0	0 0	0 0
	Total	11 31,43	14 40	10 28,57	35 100

\* INF: denominação do grupo cervicite inespecífica; NIC: neoplasia intraepitelial cervical

A TABELA 5 mostra que no compartimento epitelial do grupo INF, dez casos apresentaram intensidade ausente e um caso intensidade fraca. No grupo NIC1, seis casos apresentaram intensidade ausente e oito casos intensidade fraca, e no grupo NIC2/3 todas as amostras apresentaram intensidade fraca.

De acordo com o infiltrado inflamatório, no grupo INF, dez amostras apresentaram intensidade ausente e somente uma apresentou intensidade fraca. No grupo NIC1, doze amostras apresentaram intensidade ausente, uma intensidade fraca e uma intensidade moderada, e no grupo NIC2/3, todas as amostras apresentaram intensidade fraca.

O compartimento endotelial demonstrou, para o grupo INF, dez amostras que apresentaram intensidade ausente e uma com intensidade fraca. No grupo NIC1, onze amostras apresentaram intensidade ausente e três intensidade fraca, e no grupo NIC2/3, todas as amostras apresentaram intensidade ausente.

O percentual da imunorreatividade do marcador IL-1 $\beta$  apresentado no gráfico de barras (FIGURA 17) que demonstra o percentual de células marcadas para a IL-1 $\beta$  no epitélio, infiltrado inflamatório e endotélio.

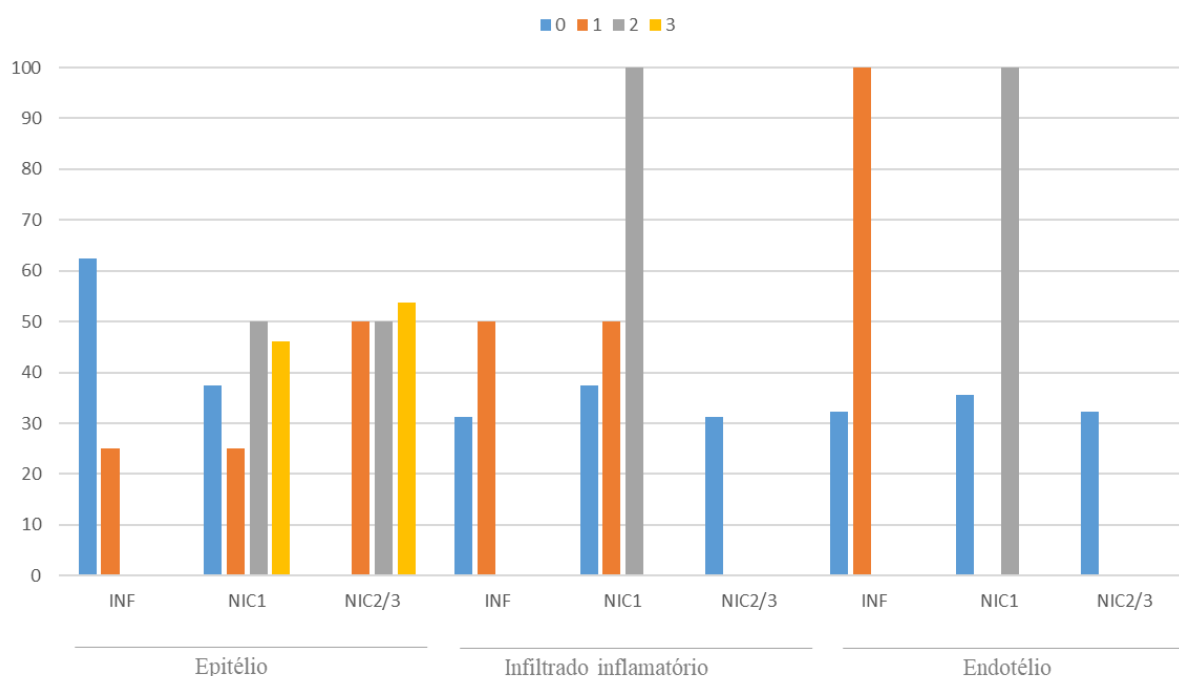


FIGURA 17 - Percentual da imunorreatividade do marcador IL-1 $\beta$  nos compartimentos epitelial, inflamatório e endotelial das biópsias dos grupos INF, NIC1 e NIC2/3 do colo uterino.

Considerando o compartimento epitelial, o grupo INF apresenta percentual de marcação ausente na maioria das amostras, no grupo NIC1 as amostras apresentam marcação variada do epitélio, assim como no grupo NIC2/3, com predomínio em ambos os grupos de percentual de marcação celular acima de 50%. No infiltrado inflamatório e no compartimento endotelial, destaque para ausência de marcação nas amostras do grupo NIC2/3.

### 5.5 - IL-18

A FIGURA 18 e a TABELA 6 apresentam os resultados da intensidade da imunorreatividade do marcador IL-18 no epitélio, infiltrado inflamatório e endotélio das amostras dos grupos INF, NIC1 e NIC2/3.

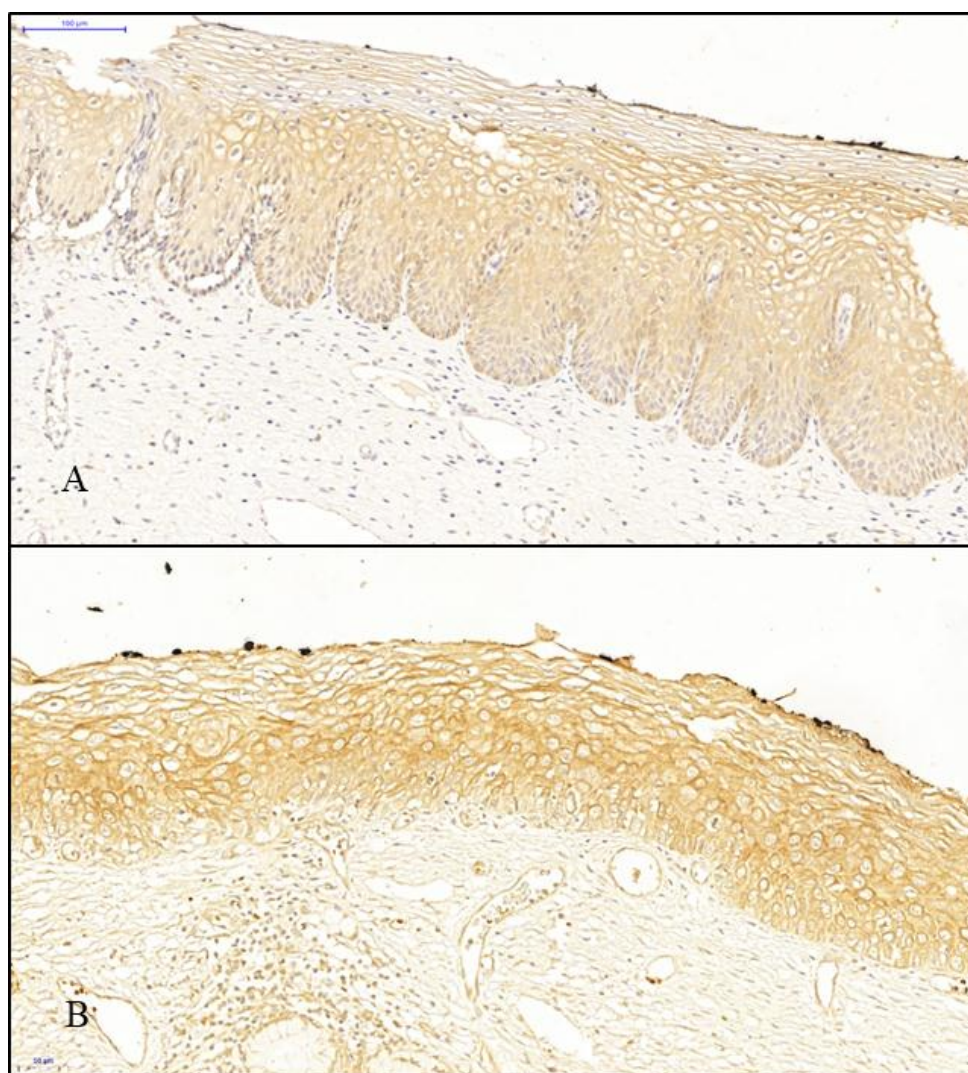


FIGURA 18 - Imunorreatividade do marcador IL-18 nos compartimentos epitelial, inflamatório e endotelial das biópsias dos grupos INF, NIC1 e NIC2/3 do colo uterino.



FIGURA 18 - Imunorreatividade do marcador IL-18 nos compartimentos epitelial, inflamatório e endotelial das biópsias dos grupos INF, NIC1 e NIC2/3 do colo uterino. A, B e C – Imunorreatividade forte para IL18 em todos compartimentos das mucosas escamosas dos grupos INF, NIC1 e NIC2/3, respectivamente.

TABELA 6 – Intensidade da imunorreatividade do marcador IL-18 nos compartimentos epitelial, inflamatório e endotelial das biópsias dos grupos INF, NIC1 e NIC2/3 do colo uterino.

LOCAL	INTENSIDADE	GRUPO			
		INF	NIC1	NIC2/3	TOTAL
		n % linha	n % linha	n % linha	n % linha
Epitélio	0	0	0	0	0
		0	0	0	0
	1	5	5	0	10
		50	50	0	100
	2	6	9	9	24
		25	37,5	37,5	100
	3	0	0	1	1
0		0	100	100	
Total	11	14	10	35	
		31,43	40	28,57	100
Infiltrado inflamatório	0	2	2	0	4
		50	50	0	100
	1	7	8	1	16
		43,75	50	6,25	100
	2	2	3	9	14
		14,29	21,43	64,29	100
	3	0	1	0	1
0		100	0	100	
Total	11	14	10	35	

TABELA 6 – Intensidade da imunorreatividade do marcador IL-18 nos compartimentos epitelial, inflamatório e endotelial das biópsias dos grupos INF, NIC1 e NIC2/3 do colo uterino (Continuação)

LOCAL	INTENSIDADE	GRUPO			
		INF	NIC1	NIC2/3	TOTAL
		n % linha	n % linha	n % linha	n % linha
Endotélio	0	2	3	0	5
		40	60	0	100
	1	8	9	7	24
		33,33	37,5	29,17	100
	2	1	1	3	5
		20	20	60	100
	3	0	1	0	1
		0	100	0	100
	Total	11	14	10	35
			31,43	40	28,57

A TABELA 6 mostra que no compartimento epitelial dos grupos INF e NIC1, todas as amostras apresentaram intensidade de marcação fraca e moderada. No grupo NIC2/3, 90% das amostras exibiram epitélio com intensidade moderada de imunorreatividade de marcação.

No infiltrado inflamatório a maioria das amostras dos grupos INF e NIC1 tiveram intensidade de marcação fraca e no grupo NIC2/3 intensidade moderada. No compartimento endotelial, todos os grupos apresentaram na maioria das amostras marcação fraca.

Destaque, de acordo com a TABELA 6, para a presença de imunorreatividade de IL-18 com intensidade epitelial moderada na maioria das amostras de todos os grupos e, exceto pela imunorreatividade moderada no compartimento inflamatório do grupo NIC2/3, a presença de intensidade fraca nos compartimentos inflamatório e endotelial da maioria das amostras dos grupos INF e NIC1.

Foi avaliado, ainda, o percentual da imunorreatividade do marcador IL-18, apresentado no gráfico de barras (FIGURA 19) que demonstra o percentual de células marcadas para a IL-18 no epitélio, infiltrado inflamatório e endotélio.

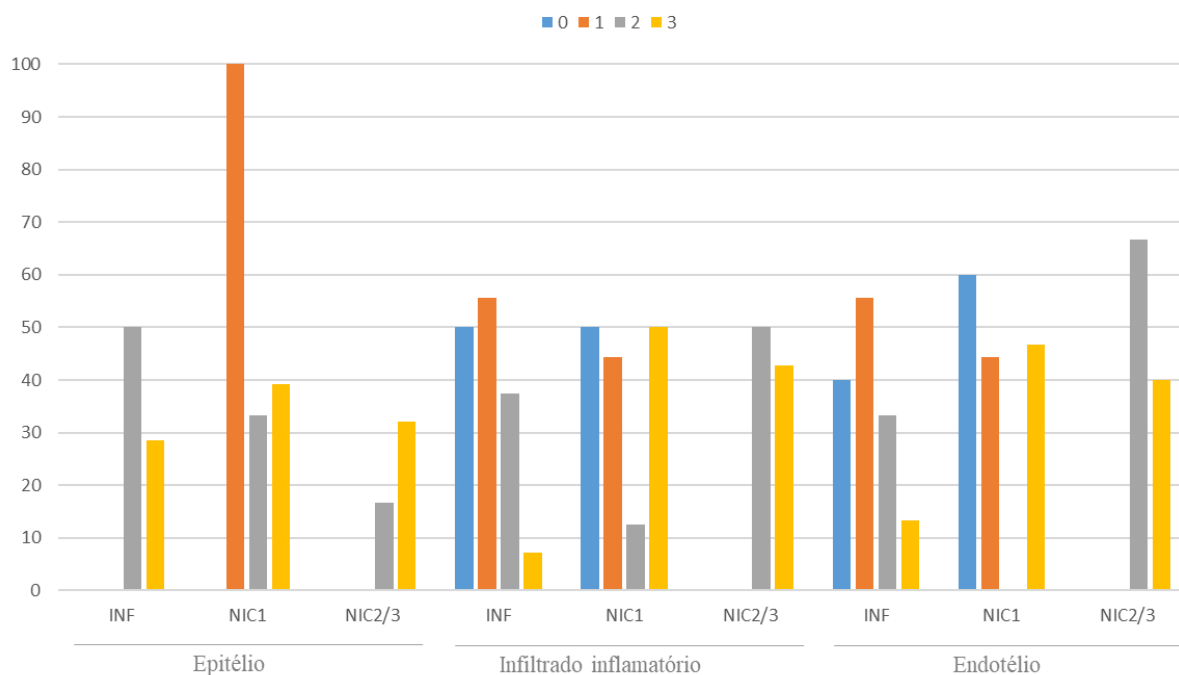


FIGURA 19 – Percentual da imunorreatividade do marcador IL-18 nos compartimentos epitelial, inflamatório e endotelial das biópsias dos grupos INF, NIC1 e NIC2/3 do colo uterino.

Considerando o compartimento epitelial, todos os grupos apresentam percentual de marcação no mínimo basal. A maioria das amostras dos grupos INF, NIC1 e NIC2/3 apresentam marcação nos terços basal, basal e médio e em todo epitélio, respectivamente. No infiltrado inflamatório e no compartimento endotelial, a FIGURA 19 mostra que há um percentual de marcação variável nos grupos INF e NIC1 e um predomínio de percentual de marcação acima de 50% nas amostras do grupo NIC2/3.

Em conjunto, todas as descrições acima dos integrantes do inflamassoma NLRP3 nos compartimentos epitelial, inflamatório e endotelial dos grupos INF, NIC1 e NIC2/3, são visualizadas na FIGURA 20, que mostra, simultaneamente, os gráficos de radar das proporções da intensidade e do percentual da imunorreatividade dos marcadores NLRP3, Caspases-4/5, Caspase-1, IL-1 $\beta$  e IL-18.

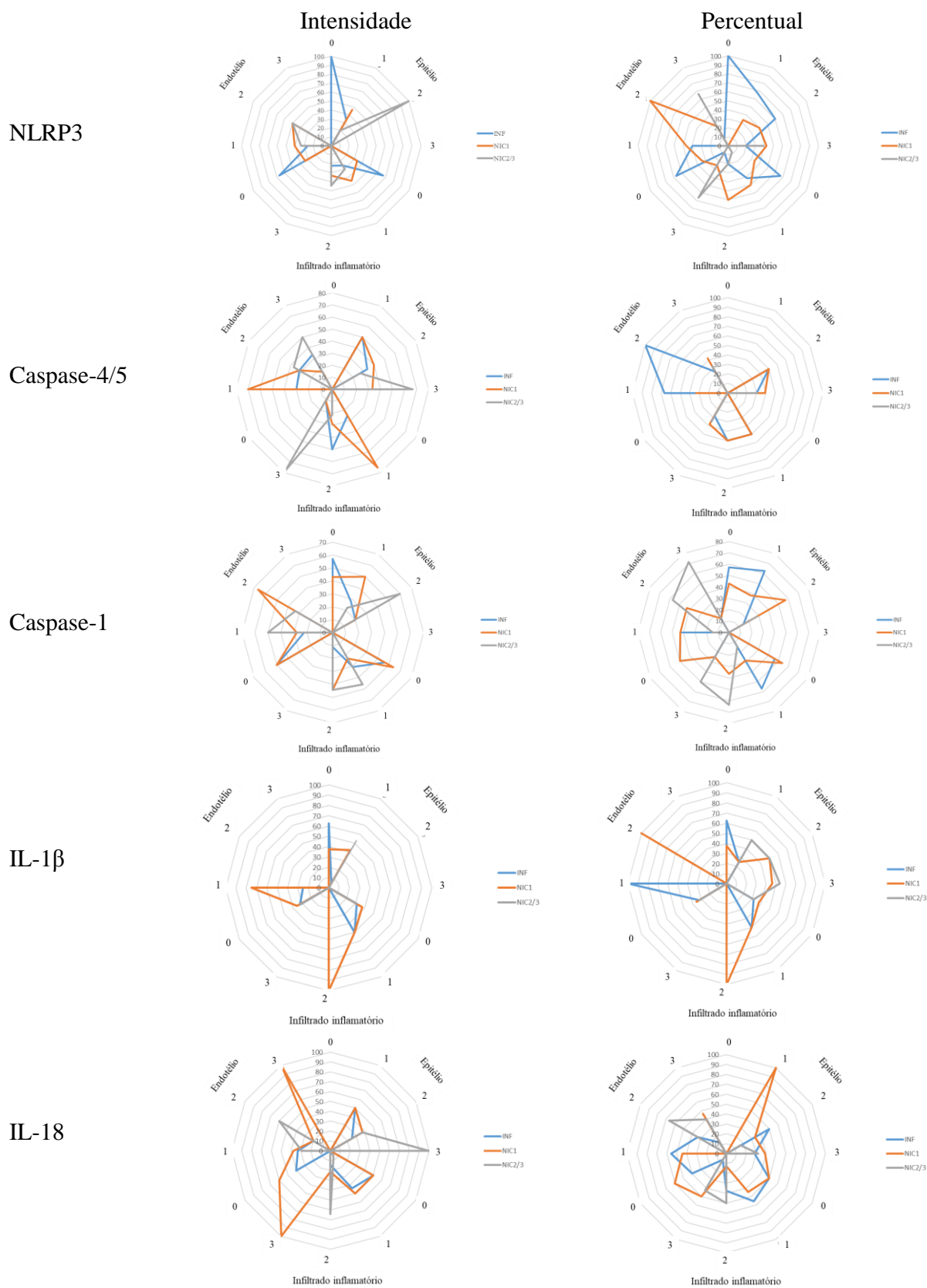


FIGURA 20 – Gráficos de radar da intensidade e do percentual da imunorreatividade dos marcadores NLRP3, Caspases-4/5, Caspase-1, IL-1 $\beta$  e IL-18 nos grupos INF, NIC1 e NIC2/3



## 5.6 - Escore da expressão imuno-histoquímica

Os escores da expressão imuno-histoquímica, para comparação da expressão imuno-histoquímica dos marcadores entre os grupos de estudo, foram definidos como elevado (1) e basal (0), conforme previamente demonstrado na FIGURA 9 (Vide pág. 19).

As tabelas 7 a 11 abaixo apresentam os escores da expressão imuno-histoquímica dos marcadores NLRP3, Caspases-4/5, Caspase-1, IL-1 $\beta$  e IL-18 nos compartimentos epitelial, inflamatório e endotelial dos grupos INF, NIC1 e NIC2/3.

TABELA 7 - Escores da expressão imuno-histoquímica do marcador NLRP3 nos compartimentos epitelial, inflamatório e endotelial dos grupos INF, NIC1 e NIC2/3.

LOCAL	ESCORE	GRUPO			
		INF	NIC1	NIC2/3	TOTAL
		n % linha	n % linha	n % linha	n % linha
<b>Epitélio</b>	0	11	14	6	31
		35,48	45,16	19,35	100
	1	0	0	4	4
		0	0	100	100
Total	11	14	10	35	
		31,43	40	28,57	100
<b>Infiltrado inflamatório</b>	0	9	11	6	26
		34,62	42,31	23,08	100
	1	2	3	4	9
		22,22	33,33	44,44	100
Total	11	14	10	35	
		31,43	40	28,57	100
<b>Endotélio</b>	0	11	13	9	33
		33,33	39,39	27,27	100
	1	0	1	1	2
		0	50	50	100
Total	11	14	10	35	
		31,43	40	28,57	100

De acordo com os valores da TABELA 7, em 40% das amostras de NIC2/3, nos compartimentos epitelial e inflamatório, a expressão do marcador NLRP3 foi elevada, com diferenças estatisticamente significativas observadas entre os grupos INF e NIC2/3 ( $p = 0,003$ ) e os grupos NIC1 e NIC2/3 ( $p = 0,003$ ) somente no compartimento epitelial. No compartimento inflamatório, não foram observadas diferenças significativas. O

compartimento endotelial apresentou quase totalidade de expressão basal nos três grupos do estudo.

A tabela 8 apresenta os escores da expressão imuno-histoquímica do marcador Caspases-4/5 nos compartimentos epitelial, inflamatório e endotelial dos grupos INF, NIC1 e NIC2/3.

TABELA 8 - Escores da expressão imuno-histoquímica do marcador Caspases-4/5 nos compartimentos epitelial, inflamatório e endotelial dos grupos INF, NIC1 e NIC2/3.

LOCAL	ESCORE	GRUPO			
		INF	NIC1	NIC2/3	TOTAL
		n % linha	n % linha	n % linha	n % linha
<b>Epitélio</b>	0	1	1	0	2
		50	50	0	100
	1	10	13	10	33
		30,3	39,39	30,3	100
	Total	11	14	10	35
		31,43	40	28,57	100
<b>Infiltrado inflamatório</b>	0	3	9	0	12
		25	75	0	100
	1	8	5	10	23
		34,78	21,74	43,48	100
	Total	11	14	10	35
		31,43	40	28,57	100
<b>Endotélio</b>	0	3	7	0	10
		30	70	0	100
	1	8	7	10	25
		32	28	40	100
	Total	11	14	10	35
		31,43	40	28,57	100

De acordo com os valores da TABELA 8 acima, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na imunorreatividade epitelial de Caspases-4/5 entre os grupos INF, NIC1 e NIC2/3. Todos os grupos apresentaram o mesmo padrão imuno-histoquímico ou expressão elevada de Caspases-4/5. Entretanto, nos compartimentos infiltrado inflamatório ( $p = 0,001$ ) e endotelial ( $p = 0,008$ ) foram observadas diferenças significativas entre o grupo NIC1 e os grupos INF e NIC2/3.

A tabela 9 apresenta os escores da expressão imuno-histoquímica do marcador caspase-1 nos compartimentos epitelial, inflamatório e endotelial dos grupos INF, NIC1 e NIC2/3.

TABELA 9 - Escores da expressão imuno-histoquímica do marcador caspase-1 nos compartimentos epitelial, inflamatório e endotelial dos grupos INF, NIC1 e NIC2/3.

LOCAL	ESCORE	GRUPO			
		INF	NIC1	NIC2/3	TOTAL
		n % linha	n % linha	n % linha	n % linha
<b>Epitélio</b>	0	10	12	4	26
		38,46	46,15	15,38	100
	1	1	2	6	9
		11,11	22,22	66,67	100
Total	11	14	10	35	
		31,43	40	28,57	100
<b>Infiltrado inflamatório</b>	0	10	10	6	26
		38,46	38,46	23,08	100
	1	1	4	4	9
		11,11	44,44	44,44	100
Total	11	14	10	35	
		31,43	40	28,57	100
<b>Endotélio</b>	0	11	12	9	32
		34,38	37,5	28,13	100
	1	0	2	1	3
		0	66,67	33,33	100
Total	11	14	10	35	
		31,43	40	28,57	100

De acordo com os valores da TABELA 9, em 60% das amostras de NIC2/3, no compartimento epitelial, a expressão do marcador Caspase-1 foi elevada, os demais grupos apresentaram a maioria das amostras com expressão basal. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas, entre os grupos INF e NIC2/3 ( $p = 0,016$ ) e os grupos NIC1 e NIC2/3 ( $p = 0,016$ ). No infiltrado inflamatório e no compartimento endotelial não foram observadas diferenças significativas.

A tabela 10 apresenta os escores da expressão imuno-histoquímica do marcador IL-1 $\beta$  nos compartimentos epitelial, inflamatório e endotelial dos grupos INF, NIC1 e NIC2/3.

TABELA 10 - Escores da expressão imuno-histoquímica do marcador IL-1 $\beta$  nos compartimentos epitelial, inflamatório e endotelial dos grupos INF, NIC1 e NIC2/3.

LOCAL	ESCORE	GRUPO			
		INF	NIC1	NIC2/3	TOTAL
		n % linha	n % linha	n % linha	n % linha
<b>Epitélio</b>	0	11	14	10	10
		31,43	40	28,57	100
	1	0	0	0	0
		0	0	0	0
	Total	11 31,43	14 40	10 28,57	35 100
<b>Infiltrado inflamatório</b>	0	11	14	10	21
		31,43	40	28,57	100
	1	0	0	0	0
		0	0	0	0
	Total	11 31,43	14 40	10 28,57	35 100
<b>Endotélio</b>	0	11	14	10	35
		31,43	40	28,57	100
	1	0	0	0	0
		0	0	0	0
	Total	11 31,43	14 40	10 28,57	35 100

De acordo com os valores da TABELA 10, em 100% das amostras dos grupos INF, NIC e NIC2/3, no compartimento epitelial, a expressão do marcador IL-1 $\beta$  foi basal e não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Nos compartimentos infiltrado inflamatório e endotelial, em 100% das amostras dos grupos INF, NIC1 e NIC2/3, no compartimento epitelial, a expressão do marcador IL-1 $\beta$  também foi basal e não foram observadas diferenças significativas entre os grupos.

A tabela 11 apresenta os escores da expressão imuno-histoquímica do marcador IL-18 nos compartimentos epitelial, inflamatório e endotelial dos grupos INF, NIC1 e NIC2/3.

TABELA 11 - Escores da expressão imuno-histoquímica do marcador IL-18 nos compartimentos epitelial, inflamatório e endotelial dos grupos INF, NIC1 e NIC2/3.

LOCAL	ESCORE	GRUPO			
		INF	NIC1	NIC2/3	TOTAL
		n % linha	n % linha	n % linha	n % linha
<b>Epitélio</b>	0	5	5	0	10
		50	50	100	100
	1	6	9	10	25
		24	36	40	100
Total	11	14	10	35	
		31,43	40	28,57	100
<b>Infiltrado inflamatório</b>	0	9	11	1	21
		42,86	52,38	4,76	100
	1	2	3	9	14
		14,29	21,43	64,29	100
Total	11	14	10	35	
		31,43	40	28,57	100
<b>Endotélio</b>	0	10	12	7	29
		34,48	41,38	24,14	100
	1	1	2	3	6
		16,67	33,33	50	100
Total	11	14	10	35	
		31,43	40	28,57	100

De acordo com os valores da TABELA 11, foram observadas diferenças estatisticamente significativas, para o compartimento epitelial entre os grupos INF, NIC1 e NIC2/3 ( $p = 0,014$ ) e para o infiltrado inflamatório ( $p = 0,000$ ). Observando-se a predominância de expressão elevada de IL18 no grupo NIC2/3. No compartimento endotelial ( $p = 0,434$ ) não houve diferenças significativas. Todos os grupos apresentaram o mesmo padrão imuno-histoquímico ou expressão fraca de IL18.

Em conjunto, a FIGURA 21 abaixo demonstra as comparações entre os escores da expressão imuno-histoquímica dos marcadores NLRP3, Caspases-4/5, Caspases-1 e IL-18 dos grupos INF, NIC1 e NIC2/3. Os resultados dos escores do marcador IL-1 $\beta$  não permitiram a construção do seu gráfico de barras ilustrativo.

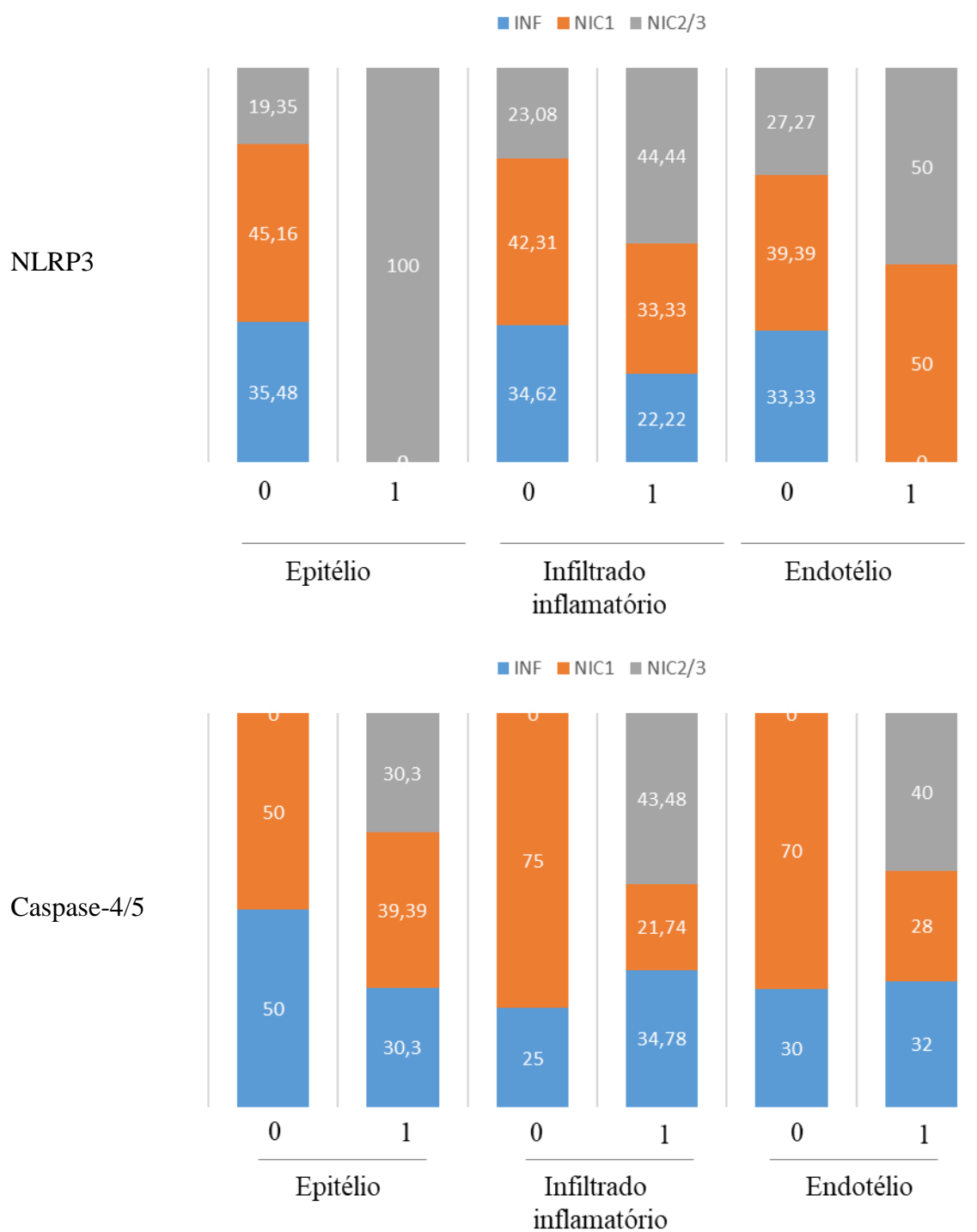


FIGURA 21 – Gráficos de barras para comparação da expressão entre os escores elevado (1) e basal (0) dos marcadores NLRP3, Caspases-4/5, Caspase-1 e IL-18 nos compartimentos epitelial, inflamatório e endotelial dos grupos INF, NIC1 e NIC2/3.

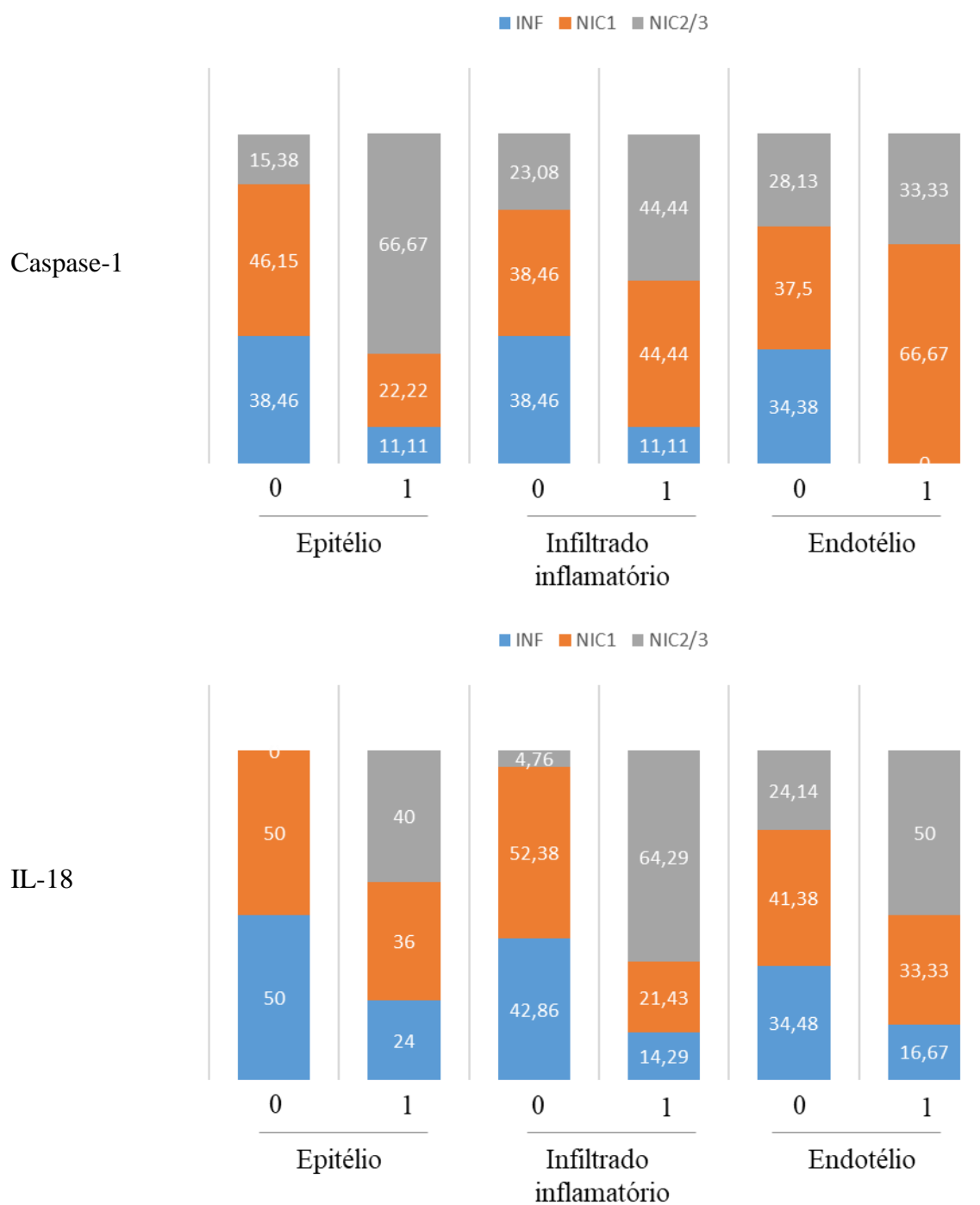


FIGURA 21 – Gráficos de barras para comparação da expressão entre os escores elevado (1) e basal (0) dos marcadores NLRP3, Caspases-4/5, Caspase-1 e IL-18 nos compartimentos epitelial, inflamatório e endotelial dos grupos INF, NIC1 e NIC2/3 (CONTINUAÇÃO).

Os gráficos de barra da FIGURA 21 acima demonstram a hiperexpressão epitelial do marcador NLRP3 nas amostras do grupo NIC2/3 no compartimento epitelial. O mesmo

podendo ser observado, porém com uma expressão menor no infiltrado inflamatório e do compartimento endotelial. As amostras do grupo INF demonstram uma expressão, do marcador NLRP3, na maioria das amostras basal, em todos os compartimentos. Para o grupo NIC1 no compartimento epitelial observamos uma expressão basal das amostras, no infiltrado inflamatório com predomínio basal e no compartimento endotelial com predomínio elevado para o marcador NLRP3.

Os gráficos da FIGURA 21 demonstram, ainda, para os marcadores Caspases-4/5, no infiltrado inflamatório, destaque para a expressão basal no grupo NIC1. O grupo NIC2/3 apresentou expressão elevada para os marcadores Caspases-4/5 em todos os compartimentos. O INF apresentou no epitélio a maioria das amostras com expressão basal e no infiltrado inflamatório e endotélio a maioria com expressão elevada.

O marcador Caspase-1 apresentou, de acordo com a FIGURA 21, expressão mais elevada na maioria das amostras, em todos os compartimentos analisados, para o grupo NIC2/3. No grupo NIC1, no infiltrado inflamatório e no endotélio a expressão foi mais elevada na maioria das amostras, e no epitélio a expressão basal que predominou nas amostras. No grupo INF a expressão basal predominou em todos os compartimentos.

Em relação ao marcador IL-18 os gráficos de barras da FIGURA 21 mostram expressão elevada na maioria das amostras, em todos os compartimentos analisados, para o grupo NIC2/3. Nos grupos INF e NIC1 a expressão é basal na maioria das amostras, em todos os compartimentos.

## **5.7 - Imuno-histoquímica dos blocos celulares**

Agora, são descritos os resultados das análises qualitativas da imunorreatividade dos marcadores NLRP3, Caspases-4/5, Caspase-1, IL-1 $\beta$  e IL-18, nesta ordem, nos blocos celulares dos grupos INF (cervicite morfológica inespecífica, equivalente ao grupo INF das biópsias), LSIL (lesão intraepitelial de baixo grau, equivalente ao grupo NIC1 das biópsias) e HSIL (lesão intraepitelial de alto grau, equivalente ao grupo NIC2/3 das biópsias), de acordo com a seguinte sequência de ilustrações:

- Fotomicrografias com os resultados obtidos nas reações de imuno-histoquímica. Cada figura apresenta os detalhes da imunorreatividade nos ceratinócitos de cada grupo do estudo.



- Tabelas com a classificação da intensidade da imunorreatividade. Cada nível de intensidade descreve o número de amostras (n) e o percentual desse n em relação aos demais grupos (% linha).

O marcador NLRP3, que nas biópsias apresentou padrão de expressão bastante distinto entre os grupos INF, NIC1 e NIC2/3, demonstra nos ceratinócitos este mesmo padrão distinto da sua expressão entre os grupos INF, LSIL e HSIL. A Figura 22 abaixo apresenta a expressão de NLRP3 nos ceratinócitos dos grupos INF, LSIL e HSIL.

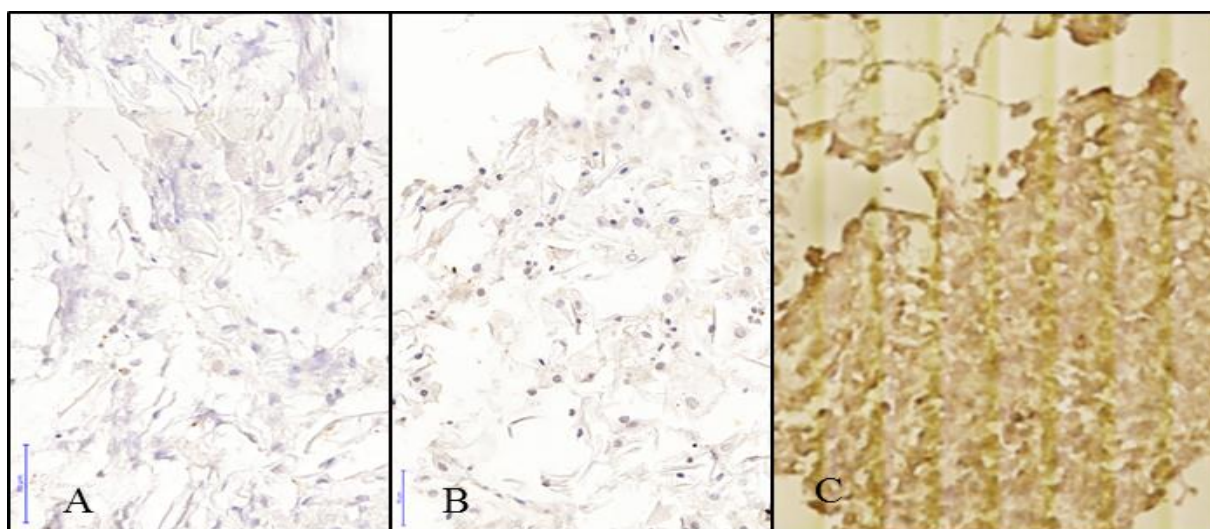


FIGURA 22 - Imunorreatividade do marcador NLRP3 nos ceratinócitos dos grupos INF (A), LSIL (B) e HSIL (C).

TABELA 12 – Intensidade da imunorreatividade do marcador NLRP3 nos ceratinócitos dos grupos INF, LSIL e HSIL.

MARCADOR	INTENSIDADE	INF	LSIL	HSIL	TOTAL
		n % linha	n % linha	n % linha	n % linha
<b>NLRP3</b>	0	4	1	0	5
		80	20	0	100
	1	8	6	4	18
		44,44	33,33	22,22	100
	2	0	0	2	2
		0	0	100	100
	3	0	0	0	0
0		0	0	0	
Total		12	7	6	25
		48	28	24	100

O marcador NLRP3 apresenta, no grupo INF, quatro casos com intensidade ausente e oito casos com intensidade fraca. No grupo LSIL, um caso apresenta intensidade ausente e seis casos intensidade fraca, e no grupo HSIL quatro casos apresentaram intensidade fraca e dois casos com intensidade moderada.

O marcador Caspases-4/5, que nas biópsias apresentou padrão de expressão similar entre os grupos INF, NIC1 e NIC2/3, demonstra nos ceratinócitos similaridades da sua expressão nos grupos INF e LSIL e relevante diferença no grupo HSIL. A Figura 23 abaixo apresenta a expressão de Caspases-4/5 nos ceratinócitos dos grupos INF, LSIL e HSIL.

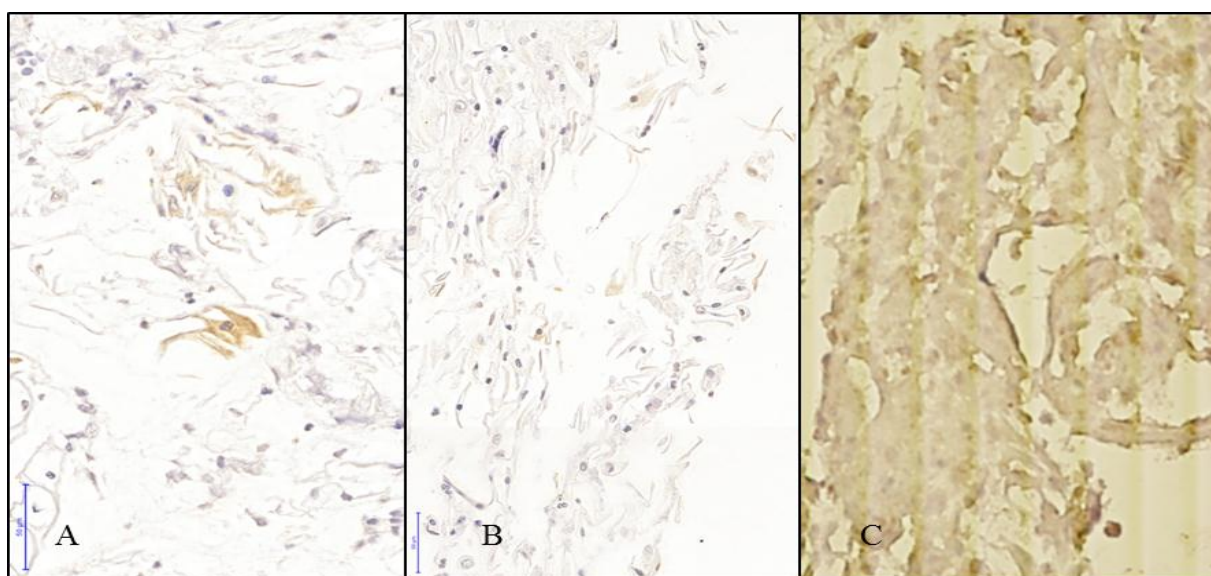


FIGURA 23 - Imunorreatividade do marcador Caspases-4/5 nos ceratinócitos dos grupos INF (A), LSIL (B) e HSIL (C).

TABELA 13 – Intensidade da imunorreatividade do marcador Caspases-4/5 nos ceratinócitos dos grupos INF, LSIL e HSIL.

MARCADOR	INTENSIDADE	INF	LSIL	HSIL	TOTAL
		n % linha	n % linha	n % linha	n % linha
Caspases-4/5	0	2	1	0	3
		66,67	33,33	0	100
	1	8	6	0	14
		57,14	42,86	0	100
	2	2	0	6	8
		25	0	75	100
3	0	0	0	0	
Total		12	7	6	25
		48	28	24	100

O marcador Caspases-4/5 apresenta, no grupo INF, dois casos com intensidade ausente, oito casos com intensidade fraca e dois casos com intensidade moderada. No grupo LSIL, um caso apresenta intensidade ausente, e seis casos com intensidade fraca e no grupo HSIL seis casos apresentaram intensidade moderada.

O marcador caspase-1, que nas biópsias apresentou padrão de expressão relativamente distinto entre os grupos INF, NIC1 e NIC2/3, demonstra nos ceratinócitos similaridades da sua expressão nos grupos INF, LSIL e HSIL, apesar de caso único com moderada intensidade. A Figura 24 abaixo apresenta a expressão de caspase-1 nos ceratinócitos dos grupos INF, LSIL e HSIL.

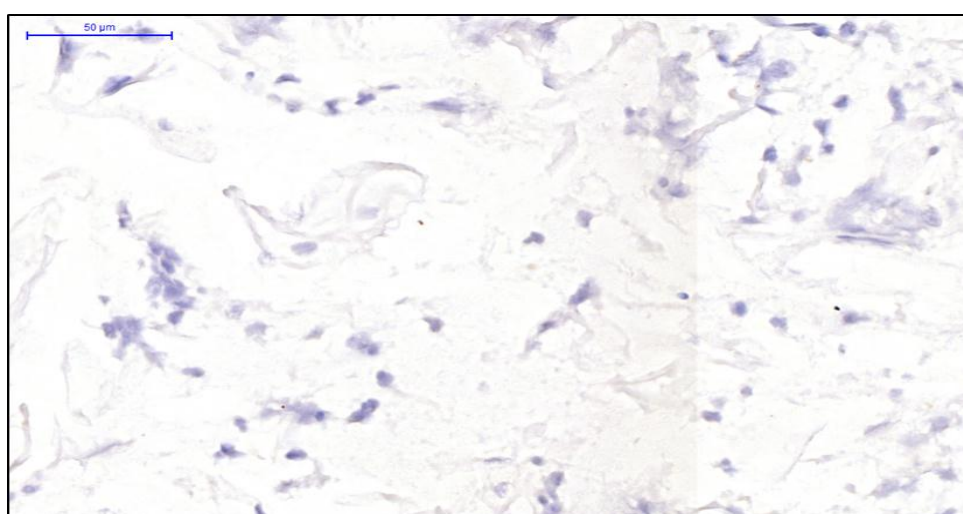


FIGURA 24 - Imunorreatividade do marcador caspase-1 nos ceratinócitos do grupo LSIL.

TABELA 14 – Intensidade da imunorreatividade do marcador caspase-1 nos ceratinócitos dos grupos INF, LSIL e HSIL.

MARCADOR	INTENSIDADE	INF	LSIL	HSIL	TOTAL
		n % linha	n % linha	n % linha	n % linha
Caspase-1	0	12	7	3	22
		54,55	31,82	13,64	100
	1	0	0	2	2
		0	0	100	100
	2	0	0	1	1
		0	0	100	100
	3	0	0	0	0
0		0	0	0	
Total		12	7	6	25
		48	28	24	100

O marcador Caspase-1 apresenta, no grupo INF, os doze casos apresentaram intensidade ausente. No grupo LSIL, um caso apresenta intensidade ausente e seis casos intensidade fraca, e no grupo HSIL três casos apresentaram intensidade ausente, dois casos com intensidade fraca e um caso intensidade moderada.

O marcador IL-1 $\beta$ , que nas biópsias apresentou padrão de expressão muito similar nos grupos INF, NIC1 e NIC2/3, repete nos ceratinócitos a predominância de ausência de expressão nos grupos INF, LSIL e HSIL. A Figura 25 abaixo apresenta a expressão de IL-1 $\beta$  nos ceratinócitos dos grupos INF, LSIL e HSIL.

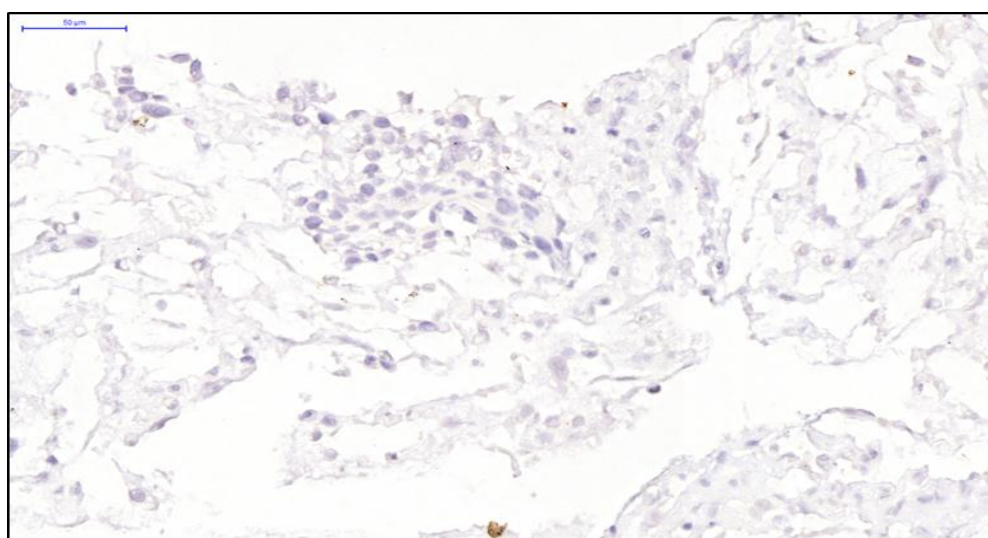


FIGURA 25 - Imunorreatividade do marcador IL-1 $\beta$  nos ceratinócitos do grupo HSIL.

TABELA 15 – Intensidade da imunorreatividade do marcador IL-1 $\beta$  nos ceratinócitos dos grupos INF, LSIL e HSIL.

MARCADOR	INTENSIDADE	INF	LSIL	HSIL	TOTAL
		n % linha	n % linha	n % linha	n % linha
IL-1 $\beta$	0	12	7	5	24
		50	29,17	20,83	100
	1	0	0	1	1
		0	0	100	100
	2	0	0	0	0
		0	0	0	0
	3	0	0	0	0
0		0	0	0	
Total		12	7	6	25
		48	28	24	100

O marcador IL-1 $\beta$  apresenta todos os casos dos grupos INF e LSIL com intensidade ausente, e no grupo HSIL cinco casos apresentaram intensidade ausente e apenas um caso com intensidade fraca.

O marcador IL-18, que nas biópsias apresentou padrão de expressão distinto do grupo NIC2/3 em relação aos grupos INF e NIC1, apresenta nos ceratinócitos expressão predominantemente similar nos grupos INF, LSIL e HSIL. A Figura 26 abaixo apresenta a expressão de IL-18 nos ceratinócitos dos grupos INF, LSIL e HSIL.

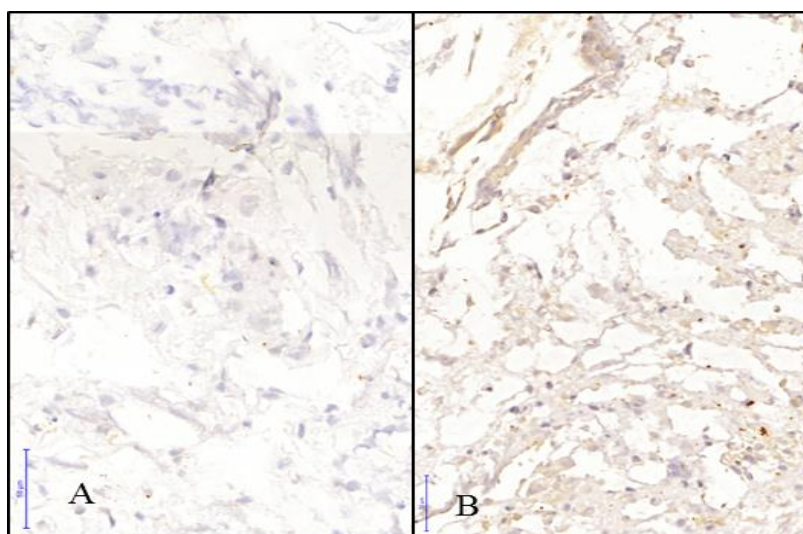


FIGURA 26 - Imunorreatividade do marcador IL-18 nos ceratinócitos dos grupos INF (A) e LSIL (B).

TABELA 16 – Intensidade da imunorreatividade do marcador IL-18 nos ceratinócitos dos grupos INF, LSIL e HSIL.

MARCADOR	INTENSIDADE	INF	LSIL	HSIL	TOTAL
		n % linha	n % linha	n % linha	n % linha
IL-18	0	2	2	1	5
		40	40	20	100
	1	7	3	2	12
		58,33	25	16,67	100
	2	3	2	2	7
		42,86	28,57	28,57	100
3	0	0	1	1	
Total		0	0	100	100
		12	7	6	25
		48	28	24	100

O marcador IL-18 apresenta, no grupo INF, quatro casos com intensidade ausente e oito casos com intensidade fraca. No grupo LSIL, um caso apresenta intensidade ausente e seis casos intensidade fraca, e no grupo HSIL um caso apresenta intensidade ausente, dois casos apresentaram intensidade fraca, dois casos intensidade moderada e um caso intensidade forte.

### 5.8 - Associação dos marcadores do inflamassoma NLRP3 à infecção por HPV

Considerando o delineamento do estudo, a detecção do HPV nas amostras de biópsia foi substitutiva e realizada por imuno-histoquímica para o marcador p16 (p16INK4A). A TABELA 17 abaixo demonstra a correlação dos escores da expressão imuno-histoquímica dos marcadores do inflamassoma NLRP3 em relação à detecção substitutiva do HPV.

TABELA 17 - Correlação dos escores da expressão imuno-histoquímica dos marcadores do inflamassoma NLRP3 e de p16 no epitélio das biópsias do colo uterino.

Marcador	Expressão	Imuno-histoquímica para p16	
		Negativa	Positiva
NLRP3	0	11	0
	1	20	4
Caspases-4/5	0	2	9
	1	0	24
Caspase-1	0	10	1
	1	16	8
IL-1 $\beta$	0	5	6
	1	5	19
IL-18	0	11	0
	1	24	0

Observa-se forte tendência de associação do marcador NLRP3 à presença do HPV, neste caso determinada pela positividade do marcador substituto p16 ( $p = 0,071$ ). Demais marcadores não apresentaram teste do qui-quadrado com valores próximos da significância estatística. Consequentemente, não apresentaram tendência de associação com a presença do HPV no epitélio.

Nas amostras de citologia em meio líquido, a detecção e genotipagem do HPV foram realizadas por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real, permitindo a pesquisa dos 14 genótipos mais relevantes de HPV de alto risco (16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,66 e 68), com destaque para os tipos 16 e 18 de HPV. A FIGURA 27 abaixo apresenta a contagem dos tipos de HPV detectados e genotipados nas amostras de citologia em meio líquido.

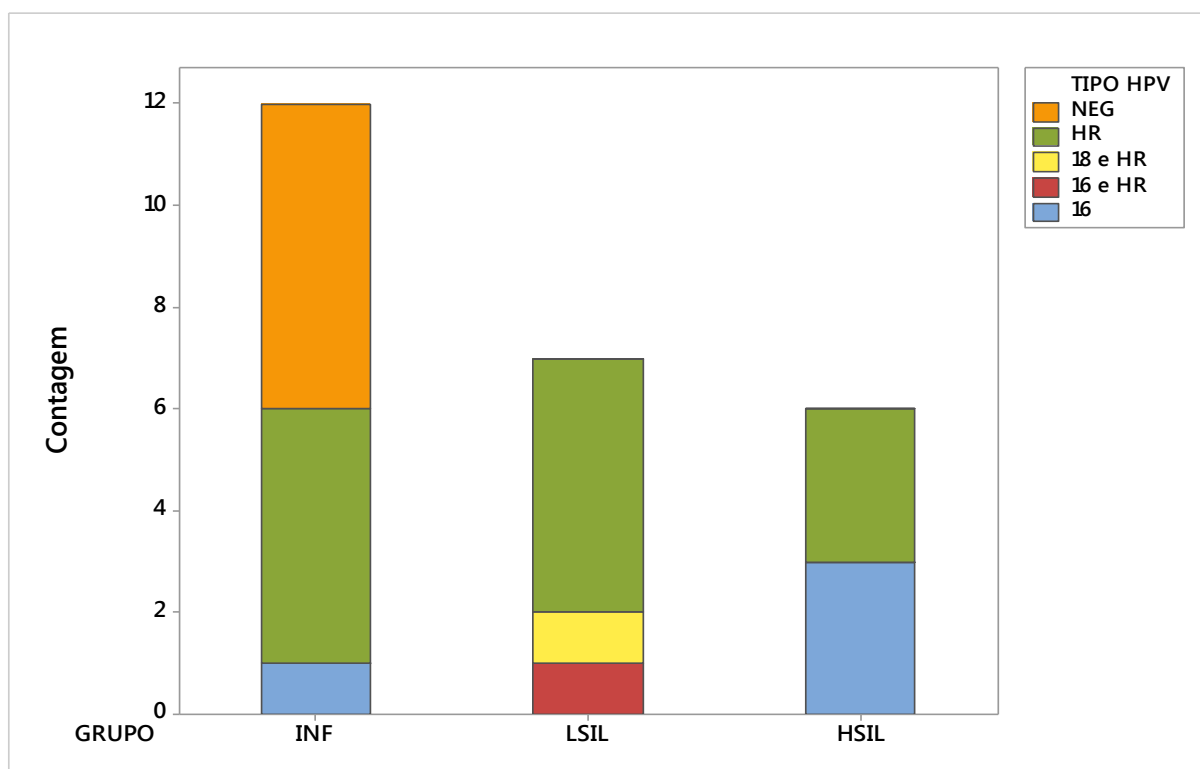


FIGURA 27 – Gráfico de barras da detecção e genotipagem do HPV nas amostras de citologia em meio líquido dos grupos INF, LSIL e HSIL. A presença dos tipos de HPV de alto risco (HR) está agrupada nas barras de cor verde e, estabelecendo co-infecções com os tipos 18 e 16, nas barras de cores amarela e vermelha, respectivamente. A barra de cor azul representa infecções somente pelo HPV-16. A barra alaranjada representa pesquisa negativa (NEG) para HPV de alto risco.

Como observado na FIGURA 27 acima, destaque, no nosso meio, para a presença relevante de infecções por tipos de HPV de alto risco distintas das infecções dos tipos 16 e 18, geralmente mais prevalentes, em todos os grupos do estudo e em especial nos grupos INF e LSIL. O grupo HSIL apresenta predomínio do HPV-16. Adicionalmente, a TABELA 18 abaixo demonstra a correlação dos escores da expressão imuno-histoquímica dos marcadores do inflamassoma NLRP3 nos blocos celulares em relação à detecção direta do HPV por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real.

TABELA 18 - Correlação dos escores da expressão imuno-histoquímica dos marcadores do inflamassoma NLRP3 e da presença do HPV nas citologias em meio líquido.

Marcador	Expressão	PCR em Tempo Real para HPV	
		Negativa	Positiva
NLRP3	0	4	2
	1	1	18
Caspases-4/5	0	2	4
	1	1	18
Caspase-1	0	6	0
	1	16	3
IL-1 $\beta$	0	6	0
	1	18	1
IL-18	0	2	4
	1	3	16

O teste Qui-Quadrado, para associação entre a expressão dos marcadores do inflamassoma NLRP3 e a presença do HPV, apresentou resultado estatisticamente significativo para o marcador NLRP3 (P-valor = 0,001). Os demais marcadores não apresentaram resultados significativos.

### 5.9 - Efeito do inflamassoma NLRP3 na infecção pelo HPV

Corroborando os resultados acima, da associação dos marcadores do inflamassoma NLRP3 à infecção por HPV, as análises de regressão logística binária realizadas para cada marcador nas amostras de citologia em meio líquido do colo uterino, demonstraram influência do HPV em relação à expressão do marcador NLRP3.

As TABELAS 19 e 20 abaixo sumarizam os resultados das análises de regressão logística dos marcadores do inflamassoma NLRP3 em relação ao HPV.



TABELA 19 – Coeficientes estimados, erros, escores e P-valor dos modelos de regressão logística binária dos marcadores do inflamassoma NLRP3 em relação ao HPV

<b>Coeficiente</b>	<b>Estimativa</b>	<b>Erro</b>	<b>P-valor</b>
$\beta_{NLRP3}$	-0,693	0,866	0,002
$\beta_{Caspase-4/5}$	0,693	0,866	0,090
$\beta_{Caspase-1}$	--	--	--
$\beta_{IL-1\beta}$	0,693	0,866	0,369
$\beta_{IL-18}$	--	--	--

Dentre os modelos de regressão logística realizados, o marcador NLRP3 apresentou modelo com coeficiente estatisticamente significativo (P-valor = 0,002) e valor de  $R^2$  de 38,16%, com  $R^2$  ajustado de 34,16%. Os demais marcadores não apresentaram coeficientes com significância estatística.

Complementarmente, as análises de regressão logística permitiram o cálculo das *Oddsratios* (OR) ou razões de chances de cada marcador predizer a infecção pelo HPV. A TABELA 20 sumariza essas relações entre o inflamassoma NLRP3 e o HPV.

TABELA 20 – Predição da expressão dos marcadores do inflamassoma NLRP3 em relação ao HPV

<b>Marcador</b>	<b>Presença do HPV</b>	
	<b>OR</b>	<b>IC 95%</b>
NLRP3	36,0	(2,58;501,26)
Caspases-4/5	9,0	(0,64;125,31)
Caspase-1	--	--
IL-1 $\beta$	2,66	(0,32;21,73)
IL18	--	--

O marcador NLRP3 do inflamassoma NLRP3 apresenta razão de chances (OR = 36) com significância estatística (IC 95%: 2,58;501,26), indicando que NLRP3 está com expressão elevada ou hiperexpressão trinta e seis vezes mais naquelas participantes com HPV positivo do que naquelas com HPV negativo.

Em conjunto, esses resultados evidenciam a associação do HPV com o inflamassoma NLRP3 na neoplasia intraepitelial do colo uterino.

## 6 - DISCUSSÃO

O presente estudo encontrou resultados importantes e originais para aprofundamento do conhecimento sobre a participação de marcadores do inflamassoma na história natural do câncer do colo uterino.

O estudo seguiu técnicas dos fabricantes de insumos e protocolos padronizados no Laboratório de Patologia Molecular da Faculdade de medicina da UFMG e utilizou amostras oriundas do Serviço de Anatomia Patológica e Citopatologia do Hospital das Clínicas da UFMG e do NUPAD, centros regionais de referências técnicas na Saúde da Mulher.

Para mitigar ou controlar o risco da variabilidade interobservador na interpretação da imuno-histoquímica, o principal risco de viés na produção dos resultados, os seguintes cuidados foram adotados: 1) análise qualitativa das reações de imuno-histoquímica por duas variáveis independentes (intensidade e percentual de reatividade); 2) Adoção de escores da expressão imuno-histoquímica na análise semi-quantitativa conforme publicação de Takano e colaboradores (2016); 3) Concordância de dois observadores na classificação das reações imuno-histoquímicas.

Foram usadas amostras de biópsias do colo uterino e bloco de células (*cellblock*), a partir das amostras de citologia em meio líquido, para estudo prioritário do epitélio da mucosa escamosa cervical, sede da infecção pelo HPV e local de origem da NIC, além do infiltrado inflamatório e endotélio, participantes relevantes do processo inflamatório que ficam localizados no estroma da mucosa e influenciam a fisiopatologia epitelial.

De acordo com trabalhos anteriores do nosso grupo de estudo, o processo de construção de blocos de células ou blocos celulares, feitos a partir de células de citologia em meio líquido, conforme descrito no Item 4.4, pag. 17, se mostra promissor para análise de células escamosas cervicais. O método é capaz de conservar características celulares como tamanho do núcleo, relação núcleo/citoplasma, preservação das características morfológicas, dentre outras, além de deter a vantagem de se trabalhar exclusivamente com epitélio, sem interferências do estroma (Figueiredo *et al.*, 2015).

No desenvolvimento do estudo encontramos algumas limitações como o número relativamente pequeno de pacientes e a quantidade reduzida de células em algumas amostras de blocos celulares. Isso se deve, em parte, ao fato de que várias amostras de citologia em meio líquido, que seriam usadas no trabalho, ficaram armazenadas sob refrigeração, por um longo período, e a preservação celular não possibilitou o uso.

Em conjunto, porém, quando se compara os resultados finais obtidos pelos blocos de células com os resultados das biópsias encontramos uma forte correlação na hiperexpressão do marcador NLRP3 nas amostras de NIC2/3 das biópsias e nas amostras de HSIL dos blocos de células. Demonstrando a viabilidade do uso deste método.

O papel da interação HPV/hospedeiro e da ativação do inflamassoma NLRP3 neste processo tem sido investigado e um estudo feito por Takano e colaboradores (2016) em amostras, com e sem HPV, de pacientes com carcinoma de células escamosas da orofaringe mostra a correlação entre a expressão de moléculas associadas ao inflamassoma e a infecção pelo HPV. As proteínas associadas ao inflamassoma NLRP3 são altamente expressas em amostras com HPV quando comparadas a amostras normais.

De acordo com essas evidências de Takano e colaboradores (2016) a hiperexpressão do marcador NLRP3 nas amostras de NIC2/3 das biópsias e nas amostras de HSIL dos blocos de células seriam uma consequência direta da ação do HPV na ativação do inflamassoma NLRP3. Nestes grupos o DNA do vírus se integra ao genoma celular e ocorre uma desregulação na expressão das proteínas transformantes E6 e E7, que estariam envolvidas nesta ativação do inflamassoma NLRP3. Nas amostras de NIC1 as proteínas E6 e E7 estão expressas nas células basais em baixos níveis.

No compartimento endotelial um achado relevante foi a fraca expressão do marcador caspases-4/5, no grupo NIC1. Pesquisas sugerem uma participação da família de receptores NLRP3 na geração de um inflamassoma induzido por caspase-11 (análoga, em humanos, das caspases inflamatórias 4/5) nas respostas a infecções bacterianas, com respostas rápidas. (Latzet *al.*, 2013). A Caspase-11 é ativada pela LPS de bactérias levando a morte celular e destruição da barreira endotelial. O que justificaria o aumento de sua expressão do marcador caspases-4/5 no compartimento endotelial.

No infiltrado inflamatório desse estudo, no entanto, as amostras de NIC1 apresentaram fraca expressão do marcador caspases-4/5. De acordo com Pontillo e colaboradores (2016) esse marcador poderia estar inibido pelo HPV nas amostras deste grupo. Uma vez que a infecção inicial pelo HPV é acompanhada de uma forte resposta imune. Essa resposta imune, porém, poderia ser defectiva, relacionada a genes com polimorfismos de inflamassomas. Outra hipótese para esta fraca expressão é a de que, ainda que a caspase-11 fosse ativada pelo HPV ou por alguma proteína relacionada a ele, não existe citólise ou morte citopática como consequência da replicação, montagem ou liberação da partícula viral do HPV, conforme descrito por Stanley e colaboradores (2010), não ocorrendo destruição da barreira endotelial e

o consequente aumento da expressão do marcador caspases-4/5 no compartimento endotelial como no caso das bactérias descrito por Latz e colaboradores (2013).

O marcador caspase-1 apresentou uma expressão epitelial predominantemente moderada na maioria das amostras do grupo NIC2/3 que poderia ser explicada pela hiperexpressão do marcador NLRP3 responsável pela ativação da caspase-1.

O marcador IL-18 apresentou imunorreatividade epitelial moderada na maioria das amostras de todos os grupos e fraca nos compartimentos inflamatório e endotelial da maioria das amostras dos grupos INF e NIC1.

De acordo com Pontillo e colaboradores (2016) o papel do inflamassoma foi recentemente investigado na interação hospedeiro/HPV devido à sua função na resposta antiviral e antitumoral. Diferentes receptores de reconhecimento de padrões (isto é, NLRP1, NLRP3, AIM2) são capazes de ativar o inflamassoma de acordo com estímulos específicos. Foram relatados achados discordantes sobre o envolvimento de inflamassomas na infecção pelo HPV. Um estudo feito por Reinholz e colaboradores (2013) mostrou que o HPV-16 ativa o inflamassoma AIM2, com consequente secreção de IL-1 $\beta$  e IL-18, e que esta ativação é diretamente proporcional na progressão de lesões cervicais no câncer cervical.

Outro expressivo resultado, desta vez pela ausência de diferenças estatisticamente significativas, foi a fraca expressão do marcador IL-1 $\beta$  em todos os grupos do estudo. Ou seja, independentemente da presença ou não de lesão do colo uterino e do HPV, não há diferenças estatisticamente significativas da expressão deste marcador no epitélio, nas células do infiltrado inflamatório e no endotélio das biópsias do colo uterino.

Ainda no contexto da carcinogênese induzida por HPV, dados de um estudo discordante realizado por Niebler e colaboradores (2013) sugerem um novo mecanismo pós-transdução da regulação da pro-IL-1 $\beta$  que, em última instância, inibe a secreção de IL-1 $\beta$  em ceratinócitos infectados com vírus. Estes resultados foram confirmados em amostras de tecido HPV positivo, onde ocorre uma diminuição gradual da IL-1 $\beta$  em relação ao câncer cervical. Assim, a atenuação dos níveis IL-1 $\beta$  pela oncoproteína E6 do HPV em células imortalizadas é aparentemente um passo crucial na evasão imunológica viral e no início da malignidade.

O estudo de Niebler e colaboradores (2013) corrobora os resultados desse estudo onde foi encontrada uma fraca expressão do marcador IL-1 $\beta$  no epitélio, no infiltrado inflamatório e no compartimento endotelial. Sugerindo que um mecanismo de pós-transdução da regulação da pro-IL-1 $\beta$  inibe a secreção de IL-1 $\beta$  em ceratinócitos infectados com vírus HPV.

Destaque, para o resultado encontrado na genotipagem do HPV nas amostras de citologia em meio líquido dos grupos INF, LSIL e HSIL, para a presença relevante de

infecções por tipos de HPV de alto risco distintas das infecções dos tipos 16 e 18. E o predomínio do HPV-16 no grupo HSIL. Conforme publicações de Martin e colaboradores (2011) e Tornesello e colaboradores (2013) o HPV-16 é o tipo mais prevalente encontrado no CCE, no mundo.

O teste Qui-Quadrado, para associação entre a expressão dos marcadores do inflamassoma NLRP3 e a presença do HPV, apresentou resultado estatisticamente significativo para o marcador NLRP3, que apresenta razão de chances (OR = 36) com significância estatística (IC 95%: 2,58; 501,26), indicando que NLRP3 está com expressão elevada ou hiperexpressão trinta e seis vezes mais naquelas participantes com HPV positivo do que naquelas com HPV negativo. Em conjunto, esses resultados evidenciam a associação do HPV com o inflamassoma NLRP3 na neoplasia intraepitelial do colo uterino.

Os resultados encontrados foram descritos e demonstrados nas tabelas, figuras e escores da expressão de cada marcador nos três grupos de biópsias do colo uterino e nos marcadores dos três grupos dos blocos de células. Em ambos os estudos foi possível observar a significativa e expressiva diferença estatística entre a hiperexpressão dos marcadores NLRP3 nas amostras dos grupos NIC2/3 e HSIL, no compartimento epitelial, que representam as lesões precursoras do câncer cervical, quando comparados com o grupo NIC1 e LSIL, que representa a lesão inicial associada ao HPV, e o grupo INF, que representa amostras com diagnóstico de cervicite ou inflamação inespecífica, sem causa microbiológica determinada.

Este estudo identificou padrões de reatividade de marcadores do inflamassoma NLRP3 em biópsias do colo uterino e bloco de células (*cellblock*), a partir das amostras de citologia em meio líquido de pacientes HPV positivo, contribuindo para melhor entendimento do papel da imunidade inata na neoplasia intraepitelial do colo uterino.

Assim, esse trabalho, produziu conhecimento para auxiliar no melhor entendimento da relação entre a infecção persistente pelo HPV e o desenvolvimento do câncer cervical e levanta perspectivas de continuidade dessa linha de pesquisa para melhor elucidação e comprovação dos mecanismos de ativação e funções dos inflamassomas na neoplasia intraepitelial do colo uterino.

A FIGURA 28 ilustra o mecanismo hipotético de interação do inflamassoma NLRP3 com o HPV no ceratinócito da mucosa escamosa do colo uterino.

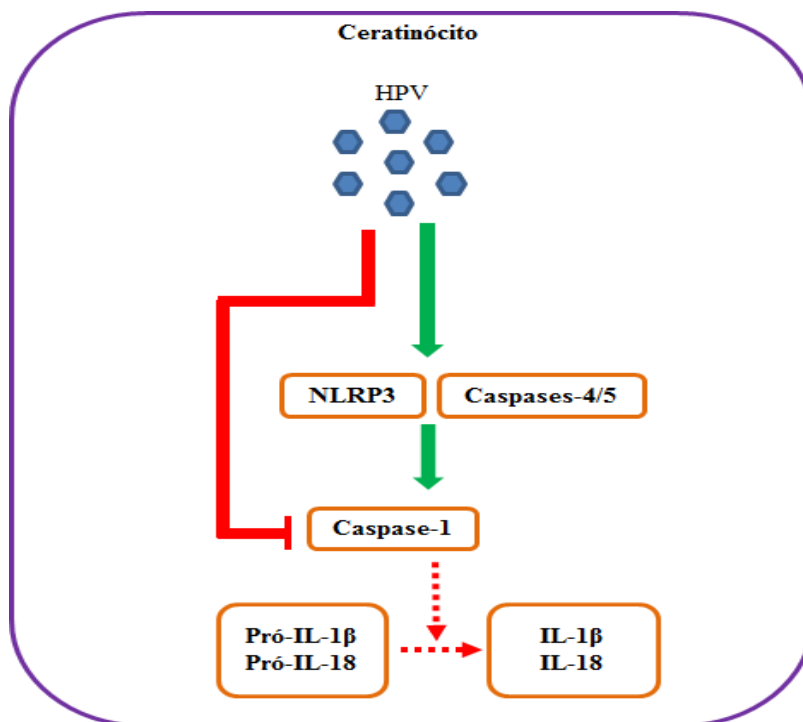


FIGURA 28 - Mecanismo hipotético de interação do inflamassoma NLRP3 com o HPV no ceratinócito da mucosa cervical.

De acordo com os resultados deste estudo, o HPV tanto na forma episossomal, quanto integrado ao genoma da célula, juntamente com suas proteínas, induz ativação de NLRP3 e Caspases-4/5 que, por sua vez, induzem a expressão da Caspase-1. Entretanto, apesar da presença da Caspase-1, não há clivagem das pró-IL-1 $\beta$  e pró-IL-18, passo essencial para a liberação das IL-1 $\beta$  e IL-18, o que indica mecanismo hipotético de evasão imune do HPV via inibição da Caspase-1.

## 6 - CONCLUSÃO

Os resultados desta pesquisa permitem concluir que o inflamassoma NLRP3 está alterado na neoplasia intraepitelial do colo uterino associada ao HPV.

## 8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Module 2: Cervical Cancer – RiskFactors**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/cancer/knowledge/provider-education/cervical/risk-factors.htm>> Acesso em: 8 de Fev. 2018.

Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero / Ministério da Saúde - Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva (INCA). Coordenação de Prevenção e Vigilância (Conprev). Divisão de Detecção Precoce e Apoio à Organização de Rede. Rio de Janeiro: INCA, 2016.

DOORBAR, John. Papillomavirus life cycle organization and biomarker selection. **Disease markers**, v. 23, n. 4, p. 297-313, 2007.

DOORBAR, John. The papillomavirus life cycle. **J Clin Virol**, Supl 1, v. 32, n. 4, p. 7-15, 2005.

Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: INCA, 2015.

FERENCZY, Alex; FRANCO, Eduardo. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. **The lancet oncology**, v. 3, n. 1, p. 11-16, 2002.

FERNÁNDEZ, Daniel Jiménez; LAMKANFI, Mohamed. Inflammatory caspases: key regulators of inflammation and cell death. **Biological chemistry**, v. 396, n. 3, p. 193-203, 2015.

FIGUEIREDO, Anna Carolina Cançado et al. **Caracterização imunocitoquímica da expressão da proteína RAP1 em blocos de células escamosas provenientes de citologia cervical em meio líquido**. 2015. Dissertação de Mestrado.

FRAZER, Ian H. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 1, p. 46, 2004.

HE, Yuan; HARA, Hideki; NÚÑEZ, Gabriel. Mechanism and regulation of NLRP3 inflammasome activation. **Trends in biochemical sciences**, v. 41, n. 12, p. 1012-1021, 2016.

KAYAGAKI, Nobuhiko et al. Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4. **Science**, p. 1240248, 2013.

LAMKANFI, Mohamed; DIXIT, Vishva M. Mechanisms and functions of inflammasomes. **Cell**, v. 157, n. 5, p. 1013-1022, 2014.

LATZ, Eicke; XIAO, T. Sam; STUTZ, Andrea. Activation and regulation of the inflammasomes. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 6, p. 397, 2013.

MARTIN, Cara M.; O'LEARY, John J. Histology of cervical intraepithelial neoplasia and the role of biomarkers. **Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology**, v. 25, n. 5, p. 605-615, 2011.

NAYAR, Ritu; WILBUR, David C. The Pap Test and Bethesda 2014. **Acta Cytologica**, v. 59, p. 121-132, 2015.

NIEBLER, Martina et al. Post-translational control of IL-1 $\beta$  via the human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein: a novel mechanism of innate immune escape mediated by the E3-ubiquitin ligase E6-AP and p53. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 8, p. e1003536, 2013.

PONTILLO, A. et al. Role of inflammasome genetics in susceptibility to HPV infection and cervical cancer development. **Journal of medical virology**, v. 88, n. 9, p. 1646-1651, 2016.

REINHOLZ, M. et al. HPV16 activates the AIM2 inflammasome in keratinocytes. **Archives of dermatological research**, v. 305, n. 8, p. 723-732, 2013.

SCHEURER, M. E.; TORTOLERO-LUNA, G.; ADLER-STORTHZ, K. Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 15, n. 5, p. 727-746, 2005.



SCHIFFMAN, Mark; KJAER, Susanne Krüger. Chapter 2: Natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia. **JNCi Monographs**, v. 2003, n. 31, p. 14-19, 2003.

SCHRODER, Kate; TSCHOPP, Jurg. The inflammasomes. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 821-832, 2010.

SHRIVASTAVA, Gaurav et al. Inflammasomes and its importance in viral infections. **Immunologic research**, v. 64, n. 5-6, p. 1101-1117, 2016.

SMOLA, Sigrun. Immunopathogenesis of HPV-Associated Cancers and Prospects for Immunotherapy. **Viruses**, v. 9, n. 9, p. 254, 2017.

SOLOMON, Diane; NAYAR, **Sistema Bethesda para Citopatologia Cervico vaginal Definições, Critérios e Notas Explicativas**. 2. ed., v. 4, Rio de Janeiro: Revinter, 2005.

STANLEY, Margaret. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. **Gynecologic oncology**, v. 117, n. 2, p. S5-S10, 2010.

TAKANO, Kenichi et al. Expression of inflammasome-associated proteins in human oropharyngeal squamous cell carcinoma. In: **Excellence in Otolaryngology**. Karger Publishers, 2016. p. 98-104.

THOMISON, John; THOMAS, Laurie K.; SHROYER, Kenneth R. Human papillomavirus: molecular and cytologic/histologic aspects related to cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. **Human pathology**, v. 39, n. 2, p. 154-166, 2008.

TORNESELLO, Maria Lina et al. Viral and cellular biomarkers in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia and cancer. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.

VANAJA, Sivapriya K.; RATHINAM, Vijay AK; FITZGERALD, Katherine A. Mechanisms of inflammasome activation: recent advances and novel insights. **Trends in cell biology**, v. 25, n. 5, p. 308-315, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Estimated Cervical Cancer Incidence Worldwide in 2012**. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/cervix-new.asp>>

Acesso em 8 de Fev. 2018.

ZHONG, Yifei; KINIO, Anna; SALEH, Maya. Functions of NOD-like receptors in human diseases. **Frontiers in immunology**, v. 4, p. 333, 2013.

ZUR HAUSEN, Harald. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nature reviews cancer**, v. 2, n. 5, p. 342, 2002.

## 9 – ANEXO

### 9.1 – Artigo científico para submissão ao *Journal of Lower Genital TractDisease*

(<https://journals.lww.com/jlgttd/Pages/journalmission.aspx>)

#### **Inflamassoma NLRP3 está alterado na neoplasia intraepitelial do colo uterino associada ao HPV**

Raquel Rodrigues Martins<sup>1</sup>; Juliana Wilke Saliba<sup>2</sup>; Mariana Vieira Xavier<sup>3</sup>; Fernanda Césari e Silva Barros<sup>1</sup>; Dora Mendezdel Castillo<sup>3</sup>; Marcelo Antonio Pascoal-Xavier<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Minas Gerais;

<sup>2</sup> Instituto René Rachou da Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz Minas

<sup>3</sup>Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais

#### RESUMO

O câncer do colo do útero mantém-se como um importante problema de saúde pública em mulheres no mundo e no Brasil. Somente no biênio 2016/2017, ocorreram cerca de 16.340 novos casos de câncer do colo do útero no país. Esse câncer é precedido pela neoplasia intraepitelial cervical (NIC), que se desenvolve, principalmente, a partir da complexa relação entre a infecção persistente por Papilomavírus humano (HPV) e inflamação crônica na mucosa escamosa do colo uterino. Nesse contexto, o inflamassoma, uma plataforma de sinalização celular que ativa fatores pró-inflamatórios, tem sido associado a infecção viral e desenvolvimento do câncer. Entretanto, a participação do inflamassoma na carcinogênese cervical é desconhecida. Assim, esse trabalho visa caracterizar o inflamassoma na NIC associada à infecção pelo HPV. Para tanto, realizamos um estudo descritivo da intensidade e do percentual da imunorreatividade imuno-histoquímica (IHQ) dos marcadores NLRP3, caspases-4/5 e 1 e interleucinas (IL) 1 $\beta$  e 18 em 35 biópsias do colo uterino com diagnósticos de cervicite inespecífica (n = 11), NIC1 (n = 14) e NIC2/3 (n = 10) e em 25 blocos celulares oriundos de citologia em meio líquido do colo uterino e com diagnósticos de inflamação (n = 12) e lesões intraepiteliais escamosas de baixo (LSIL; n = 7) e alto (HSIL; n = 6). A detecção do HPV foi realizada por IHQ e reação em cadeia da polimerase (PCR). As expressões epitelial de NLRP3 e caspase-1, inflamatória de IL-18 e endotelial de caspases-4/5 foram

fortes ou elevadas no NIC2/3 e fracas ou basais na NIC1. Além disso, a expressão epitelial de NLRP3 se associou com o HPV. Em conjunto, esses resultados evidenciam a relação do HPV com o inflamassoma NLRP3 na neoplasia intraepitelial do colo uterino.

## ABSTRACT

Cervical cancer remains an important public health problem in women worldwide and in Brazil. In the 2016/2017 biennium alone, there were about 16,340 new cases of cervical cancer in the country. This cancer is preceded by cervical intraepithelial neoplasia (CIN), which develops mainly from the complex relationship between persistent Human papillomavirus (HPV) infection and chronic inflammation in the squamous mucosa of the uterine cervix. In the context, inflamassoma, a cellular signaling platform that activates pro-inflammatory factors, has been associated with viral infection and cancer development. However, the involvement of inflamassoma in cervical carcinogenesis is unknown. Thus, this work aims to characterize the inflamassoma in the CIN associated with HPV infection. A descriptive study of the immunohistochemical immunoreactivity (IHC) of the biomarkers NLRP3, caspases-4/5 and 1 and interleukins (IL) 1 $\beta$  and 18 in 35 biopsies of the uterine cervix with diagnoses of non-specific cervicitis (n = 11), CIN1 (n = 14) and CIN2 / 3 (n = 10), and in 25 cell blocks from cytology in the uterine cervix and diagnosed with inflammation (n = 12) and low squamous intraepithelial lesions (LSIL; n = 7) and high (HSIL; n = 6). HPV detection was performed by IHC and polymerase chain reaction (PCR). The NLRP3 and caspase-1 epithelial, IL-18 inflammatory and caspases-4/5 endothelial expressions were strong or elevated in NIC2/3 and weak or basal in NIC1. In addition, NLRP3 epithelial expression was associated with HPV. Taken together, these results evidence the relationship of HPV with NLRP3 inflamassoma in intraepithelial neoplasia of the cervix.

Palavras-chave: Câncer do colo do útero; HPV; Inflamassoma; NLRP3; Caspases.

## INTRODUÇÃO

O câncer cervical ou câncer do colo do útero, especificamente o carcinoma de células escamosas (CCE), é a terceira neoplasia mais comum em mulheres no mundo, com mais de 85% dos casos ocorrendo em países subdesenvolvidos (Tornesello *et al.*, 2013), apesar da ampla disponibilidade de métodos para rastreamento da sua principal lesão precursora, a neoplasia intraepitelial cervical (NIC) e do seu principal fator etiológico, o Papilomavírus Humano (HPV). No biênio 2016/2017 ocorreram cerca de 16.340 novos casos de câncer do colo do útero no Brasil, uma estimativa de 15,85 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2015).

A maioria das infecções por HPV são transitórias e resolvem-se espontaneamente. Presumivelmente, elas são controladas completamente pelo sistema imune mediado por células ou estão em um estado de latência, caracterizado por uma expressão restrita das proteínas precoces virais E1 e E2. Uma infecção persistente, com altos níveis de replicação de HPV, é estabelecida se há falha imunológica no controle do vírus (Ferenczy *et al.*, 2002; Schiffman *et al.*, 2003).

Na ausência de eliminação ou regressão da infecção pelo HPV, as lesões intraepiteliais precursoras do câncer podem progredir para o CCE. A persistência do HPV na mucosa cervical é crucial para o desenvolvimento da neoplasia intraepitelial cervical, que é subdividida histo e citologicamente em 3 categorias: NIC 1 ou lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL), NIC 2 e NIC 3, conhecidas como lesões intraepiteliais de alto grau (HSIL) (Schiffman *et al.*, 2003; Doorbar, 2005). As lesões cervicais de baixo grau relembram infecções produtivas causadas por HPV, enquanto as lesões de alto grau têm uma fase proliferativa com ruptura do gene da proteína E2, integração do DNA do vírus no genoma celular e desregulação na expressão das proteínas transformantes E6 e E7, que leva ao aumento da proliferação celular do epitélio (Thomison III *et al.*, 2009; zurHausen, 2002; Doorbar, 2005).

Esse processo da carcinogênese cervical é complexo e influenciado pelo microambiente inflamatório do colo uterino, visto que a progressão da NIC está relacionada diretamente com o aumento da displasia epitelial e aumento intenso do infiltrado inflamatório estromal, principalmente por células mononucleadas, que caracterizam inflamação crônica. A inflamação crônica pode favorecer desequilíbrio imune e o microambiente inflamatório pode favorecer a carcinogênese. Entretanto, os mecanismos subjacentes à ativação ou inativação da

imunidade inata no colo uterino e ao recrutamento de células inflamatórias permanecem obscuros (Smola, 2017).

Nesse contexto de interações entre infecção, inflamação crônica e o desenvolvimento do câncer, papel atual e muito relevante é atribuído aos inflamassomas, especialmente ao inflamassoma NLRP3, o melhor estudado até o presente. Inflamassomas são complexos multiprotéicos que consistem da associação de receptores do tipo NOD, como o NLRP3, do receptor ASC ( proteína associada a apoptose contendo um domínio CARD) e da caspase-1 (Takano *et al.*, 2016) e funcionam como uma plataforma de sinalização celular para ativação de fatores pró-inflamatórios, tais como interleucinas e caspases (Latz *et al.*, 2013; Vanaja *et al.*, 2014).

Recentes estudos demonstraram que certos tipos de vírus têm a capacidade de ativar inflamassomas, o que contribui, de um lado, para a resposta antiviral e, de outro, para o estabelecimento da inflamação crônica (Shrivastava *et al.*, 2016). Em relação à infecção pelo HPV e o desenvolvimento da NIC, essas interações ainda apresentam resultados incertos. Poucos estudos demonstraram que o HPV ativa os inflamassomas AIM2 e NLRP3, com favorecimento da progressão da NIC para CCE (Reinholz *et al.*, 2013; Pontillo *et al.*, 2016) enquanto outro demonstrou que a oncoproteína E6 do HPV inibiu a secreção de IL-1 $\beta$ , um dos produtos da ativação do inflamassoma (Niebler *et al.*, 2013).

Considerando as particularidades da resposta imune contra o HPV e a possível participação do inflamassoma na carcinogênese cervical, o direcionamento desse estudo para a análise da influência do microambiente inflamatório na infecção pelo HPV e progressão da NIC será importante para a produção de novos conhecimentos e para a identificação de novos marcadores capazes de estabelecer a relação entre a infecção persistente pelo HPV e o desenvolvimento do câncer cervical, assumindo assim os desafios de ampliar o diagnóstico e tratamento deste relevante e importante problema de saúde pública.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

Trata-se de estudo observacional, transversal e comparativo dos aspectos de marcação imuno-histoquímica em amostras de biópsias do colo uterino, oriundas do Serviço de Anatomia Patológica e Citopatologia do Hospital das Clínicas da UFMG e blocos celulares de citologia em meio líquido do colo uterino, provenientes do NUPAD (Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico) da Faculdade de Medicina da UFMG, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP) sob o parecer nº CAAE 61117616.0000.5149.

Foram definidos os seguintes grupos para estudo das biópsias: INF: diagnóstico histopatológico de cervicite inespecífica; NIC1: neoplasia intraepitelial cervical grau 1; NIC 2/3: neoplasia intraepitelial cervical grau 2/3. As amostras de citologia em meio líquido do colo uterino foram agrupadas nos seguintes conjuntos para estudo dos ceratinócitos: INF: diagnóstico citopatológico de inflamação ou negativo para lesão intraepitelial ou neoplasia; LSIL: lesão intraepitelial escamosa de baixo grau/infecção por HPV; HSIL: lesão intraepitelial escamosa de alto grau.

### **Blocos celulares (*cellblock*)**

A preparação do bloco de células (*cellblock*), a partir das amostras de citologia em meio líquido presentes na solução *ClearPrep®* (*ResolutionBiomedical, Inc.*, Tustin, CA), foi realizada com etapa inicial de centrifugação de 10 mL da suspensão celular por 10 minutos a 400 x g a temperatura ambiente, em tubo Falcon de 50 mL (rotor 6441, centrífuga Sorvall RT Legend). O sobrenadante foi cuidadosamente desprezado e, em seguida, o sedimento de células foi ressuscitado em 3 a 5 gotas de plasma humano. Imediatamente após, foram adicionados 25 a 75 µL de trombina (*Thrombinfrombovine plasma*; Sigma-Aldrich, T7513-100UN), Após 5 a 10 minutos, a temperatura ambiente, ocorreu à formação do coágulo.

O coágulo contendo as células cervicais, devidamente identificado, foi transferido para um cassete de histologia e armazenado em solução de formaldeído a 10% (Synth). As amostras foram processadas utilizando o processador de tecidos (modelo PT 05, LUPETEC®, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente, os blocos celulares foram incluídos em parafina (L: 108080, Synth).

### **Imuno-histoquímica**

Lâminas histológicas contendo cortes seriados de 5 µm das amostras parafinadas (biópsias e blocos celulares) foram incubadas em estufa, a 56°C. Posteriormente, as amostras foram submetidas a etapas de desparafinação e reidratação, com três lavagens em xilol, por cinco minutos cada, e três lavagens em álcool etílico (PA), por cinco minutos. Após a reidratação, foi realizada a recuperação antigênica induzida pelo calor, em solução de citrato de sódio, a 0,01 M (pH 6,0) a 90°C por 20 minutos no vapor e resfriadas a temperatura ambiente por 20 minutos. A peroxidase endógena dos tecidos e as proteínas inespecíficas foram bloqueadas nas diferentes etapas.

A marcação para imuno-histoquímica foi feita separadamente com os seguintes anticorpos primários: anti-NLRP3 (Cryopyrin-H-66: sc-66846, Santa Cruz Biotechnology, INC), anti-CASP1 (Caspase-1-14F468: sc-56036, Santa Cruz Biotechnology, INC); anti-CASP4/5 (Caspase-11 p20-A2: sc-374615, Santa Cruz Biotechnology, INC); anti-IL-18 (IL 18-H173: sc-7954, Santa Cruz Biotechnology, INC); e anti-IL-1 $\beta$  (IL 1 $\beta$ -2H12: sc-130323, Santa Cruz Biotechnology, INC). Após padronização desses anticorpos primários no Laboratório de Patologia Molecular, foram definidas as diluições de 1:500 para os anticorpos primários anti-NLRP3, anti-CASP1 e anti-IL  $\beta$ ; 1:300 para os anticorpos primários anti-CASP4/5 e anti-IL-18. Para detecção dos anticorpos primários, foi utilizado o kit *NovoLink Max PolymerDetection Novocastra TM* (Leica Microsystems).

Os cortes foram incubados com o sistema universal de detecção por polímeros do kit NovoLink por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionados 200  $\mu$ L da solução reveladora fornecida pelo kit contendo o cromógeno diamino-benzidina 3,3 (DAB) e a reação incubada a temperatura ambiente por cinco minutos. A contra coloração foi realizada mergulhando as lâminas em solução de hematoxilina de Harris (Cód. 248, Vetec) por 30 segundo.

As lâminas foram analisadas utilizando-se o microscópio óptico Olympus BX. As análises qualitativa e semi-quantitativa foram realizadas em campos em aumento do microscópio (40x) em áreas aleatórias e adequadas à interpretação dos dois observadores. As classificações finais foram obtidas por consenso entre os dois observadores. Os controles externo e interno (intra-lâmina) e o monitoramento da qualidade das reações imuno-histoquímicas foram realizados amostras pele saudável, provenientes de procedimentos de mamoplastia e doadas ao Laboratório de Patologia Molecular.

As análises qualitativas da intensidade e do percentual da reatividade imuno-histoquímica dos marcadores foram realizadas de acordo com a categorização dos parâmetros abaixo:

<b>Intensidade</b>		<b>Percentual</b>	
Parâmetro	Descrição	Parâmetro	Descrição
0	Ausente	0	0%
1	Fraca ou uma cruz (+)	1	1% a 50%
2	Moderada ou duas cruzes (++)	2	51% a 75%
3	Forte ou três cruzes (+++)	3	76% a 100%



Para as análises semi-quantitativas, foi estabelecido um escore da expressão imuno-histoquímica dos marcadores selecionados, de acordo com Takano e colaboradores (2016) (13). Para cada marcador, foi feita a multiplicação da categoria da intensidade pela categoria do percentual da reatividade imuno-histoquímica no epitélio. De acordo com o produto dessa multiplicação, a expressão imuno-histoquímica dos marcadores foi classificada em dois grupos: “expressão elevada e forte” (1) ou “expressão basal e fraca” (0). A FIGURA 9 apresenta esse escore semi-quantitativo da imuno-histoquímica, destacando produtos maiores ou iguais a 4 (destaque vermelho) como “expressão elevada” e produtos menores ou iguais a 3 (destaque azul) como “expressão basal”.

	PERCENTUAL			
INTENSIDADE	0	1	2	3
0	0	0	0	0
1	0	1	2	3
2	0	2	4	6
3	0	3	6	9

### Detecção e genotipagem do HPV

As detecções substitutiva e direta do HPV nas amostras de biópsia e de citologia em meio líquido, respectivamente, foram realizadas por metodologias distintas. A imuno-histoquímica para o marcador p16 (p16INK4A) foi utilizada para detecção substitutiva do HPV nas biópsias do colo uterino, de acordo com Takano e colaboradores (2016).

Todas as etapas da imuno-histoquímica para p16 foram similares às descritas no tópico Imuno-histoquímica acima, exceto pelo uso do anticorpo primário anti-p16 (Anti-p16INK4: 550834, BD Biosciences, INC), na diluição de 1:50. A positividade da reação imuno-histoquímica foi considerada indicativa da presença do HPV no epitélio da mucosa cervical.

A detecção e genotipagem do HPV nas amostras de citologia em meio líquido foram realizadas por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real, no NUPAD, utilizando o *High RiskAbbott Real Time Kit*, de acordo com as recomendações do fabricante. O referido teste (*High RiskAbbott Real Time Kit*) detecta 14 genótipos de HPV de alto risco (16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,66 e 68), destacando os tipos 16 e 18 de HPV.

## **Análises estatísticas**

Os resultados obtidos foram armazenados em planilhas eletrônicas usando o programa EXCEL e submetidos à análise estatística através dos programas R (versão 3.1.2) e MINITAB 17 (versão 17). Para análises descritivas, as variáveis categóricas das abordagens qualitativa e semi-quantitativa foram apresentadas como números e porcentagens. Para análise comparativa da diferença entre os grupos, utilizou-se o teste t de Student. As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando  $p < 0.05$ . Para o estabelecimento de modelos estatísticos preditivos da relação entre os marcadores e os estágios da neoplasia cervical, foi utilizada a análise de regressão logística multinomial no programa VGAM do software estatístico R (Versão 2.15.3; <http://www.r-project.org>) e MINITAB 17.

## **RESULTADOS**

### *Imunorreatividade do inflamassoma NLRP3 na NIC*

A Figura 1 apresenta os resultados da imunorreatividade dos marcadores NLRP3, Caspase-4/5, Caspase-1, IL-1 $\beta$  e IL-18 no epitélio das biópsias dos grupos INF, NIC1 e NIC2/3. Os marcadores NLRP3, Caspase-4/5 e Caspase-1 apresentam intensidade moderada e em toda a espessura do epitélio de parte relevante das amostras do grupo NIC2/3. No grupo INF, há predomínio de ausência de marcação e, no grupo NIC1 há marcação nas camadas basal, intermediária e superficial do epitélio. Os marcadores IL-1 $\beta$  e IL-18 têm imunorreatividade predominantemente ausente nos grupos INF e NIC1, além de reatividade moderada e em toda a espessura do epitélio de IL-18 no grupo NIC2/3. Os ceratinócitos dos blocos celulares dos grupos INF, LSIL e HSIL apresentaram hiperexpressão predominante dos marcadores NLRP3 e Caspase-4/5, além de expressão basal dos marcadores Caspase-1, IL-1 $\beta$  e IL-18.

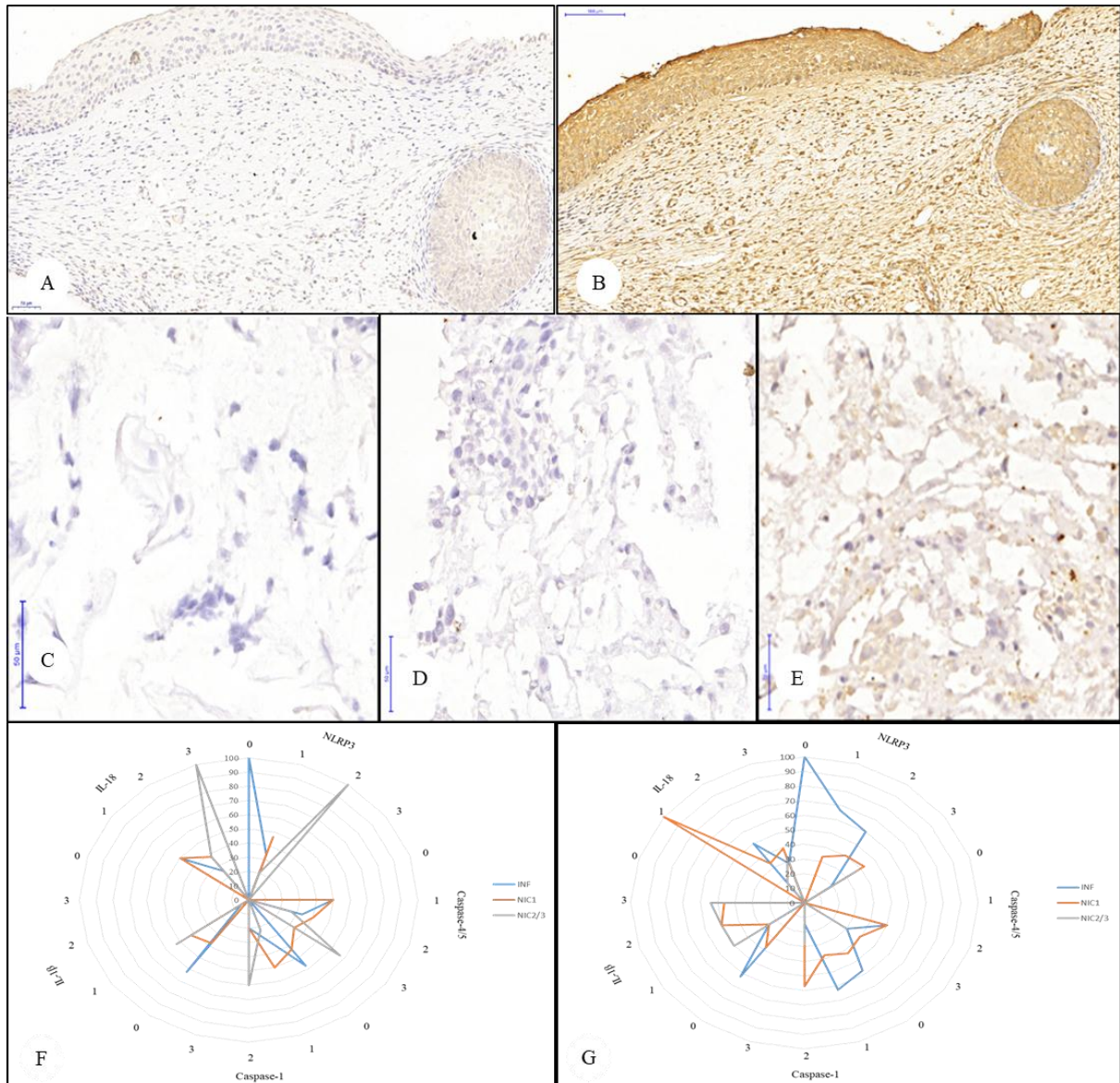


Figura 1- Imunorreatividade dos marcadores do inflamassoma NLRP3 na NIC. A e B: Hiperexpressão dos marcadores NLRP3 e Caspase-4/5 em toda a espessura do epitélio da NIC2/3; C, D e E: Expressão basal dos marcadores Caspase-1, IL-1 $\beta$  e IL-18 nos ceratinócitos de blocos celulares da NIC1; F e G: Gráficos de radar da imunorreatividade dos marcadores do inflamassoma NLRP3 na mucosa inflamada (INF), NIC1 e NIC2/3.

#### *Escore da expressão imuno-histoquímica*

Os escores da expressão imuno-histoquímica, para comparação da expressão imuno-histoquímica dos marcadores entre os grupos de estudo, estão sintetizados na Figura 2.

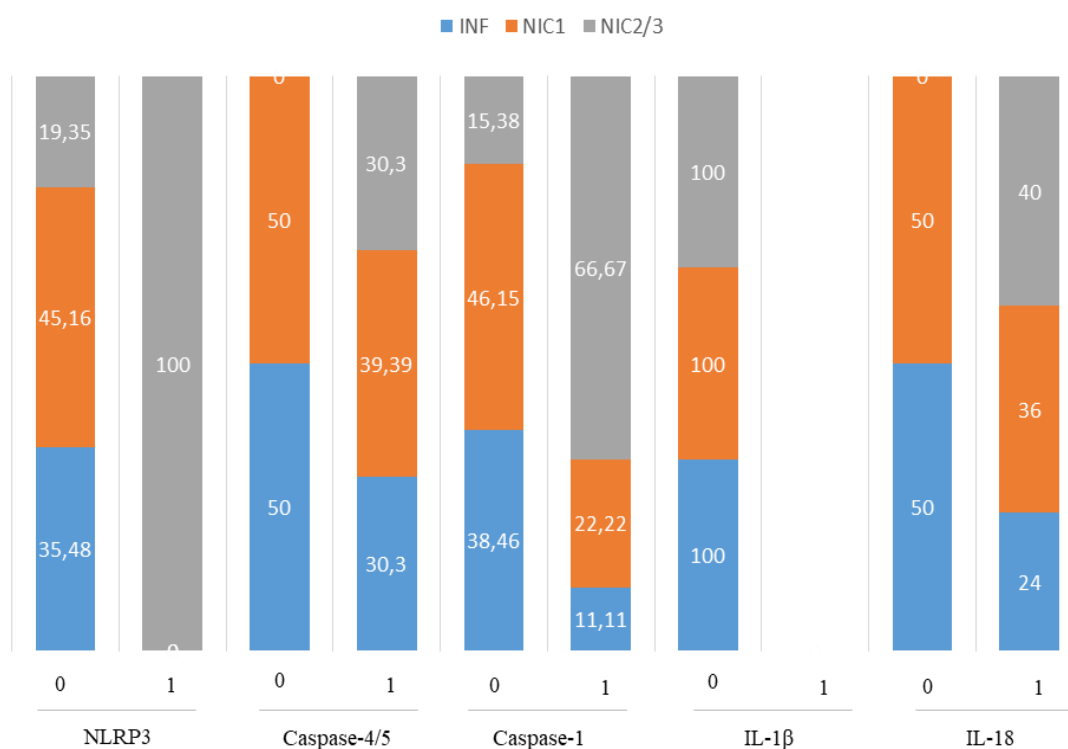


Figura 2- Gráfico de barras dos escores da imunorreatividade dos marcadores do inflamassoma NLRP3 na NIC.

Cerca de 40% das amostras de NIC2/3, nos compartimentos epitelial e inflamatório, a expressão do marcador NLRP3 foi elevada, com diferenças estatisticamente significativas observadas entre os grupos INF e NIC2/3 ( $p = 0,003$ ) e os grupos NIC1 e NIC2/3 ( $p = 0,003$ ) no compartimento epitelial. Cerca de 60% das amostras de NIC2/3 apresentaram expressão de Caspase-1 elevada, com diferenças estatisticamente significativas, entre os grupos INF e NIC2/3 ( $p = 0,016$ ) e os grupos NIC1 e NIC2/3 ( $p = 0,016$ ). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na imunorreatividade epitelial de Caspases-4/5, IL-1 $\beta$  e IL-18 entre os grupos INF, NIC1 e NIC2/3.

### Associação dos marcadores do inflamassoma NLRP3 à infecção por HPV

Considerando o delineamento do estudo, a detecção do HPV nas amostras de biópsia foi substitutiva e realizada por imuno-histoquímica para o marcador p16 (p16INK4A). A Tabela 1 abaixo demonstra a correlação dos escores da expressão imuno-histoquímica dos marcadores do inflamassoma NLRP3 em relação à detecção substitutiva do HPV.

Tabela 1 - Correlação dos escores da expressão imuno-histoquímica dos marcadores do inflamassoma NLRP3 e de p16 no epitélio das biópsias do colo uterino e nos ceratinócitos dos blocos celulares.

Marcador	Expressão	Imuno-histoquímica		PCR em Tempo Real	
		para p16		para HPV	
		Negativa	Positiva	Negativa	Positiva
NLRP3	0	11	0	4	2
	1	20	4	1	18
Caspases-4/5	0	2	9	2	4
	1	0	24	1	18
Caspase-1	0	10	1	6	0
	1	16	8	16	3
IL-1 $\beta$	0	5	6	6	0
	1	5	19	18	1
IL-18	0	11	0	2	4
	1	24	0	3	16

Observa-se forte tendência de associação do marcador NLRP3 à presença do HPV, neste caso determinada pela positividade do marcador substituto p16 ( $p = 0,071$ ). Demais marcadores não apresentaram teste do qui-quadrado com valores próximos da significância estatística. Consequentemente, não apresentaram tendência de associação com a presença do HPV no epitélio. Nos blocos celulares, o teste Qui-Quadrado, para associação entre a expressão dos marcadores do inflamassoma NLRP3 e a presença do HPV, apresentou resultado estatisticamente significativo para o marcador NLRP3 ( $P$ -valor = 0,001). Os demais marcadores não apresentaram resultados significativos

Nas amostras de citologia em meio líquido, a detecção e genotipagem do HPV foram realizadas por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real, permitindo a pesquisa dos 14 genótipos mais relevantes de HPV de alto risco (16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,66 e 68), com destaque para os tipos 16 e 18 de HPV. A Figura 3 abaixo apresenta a contagem dos tipos de HPV detectados e genotipados nas amostras de citologia em meio líquido.

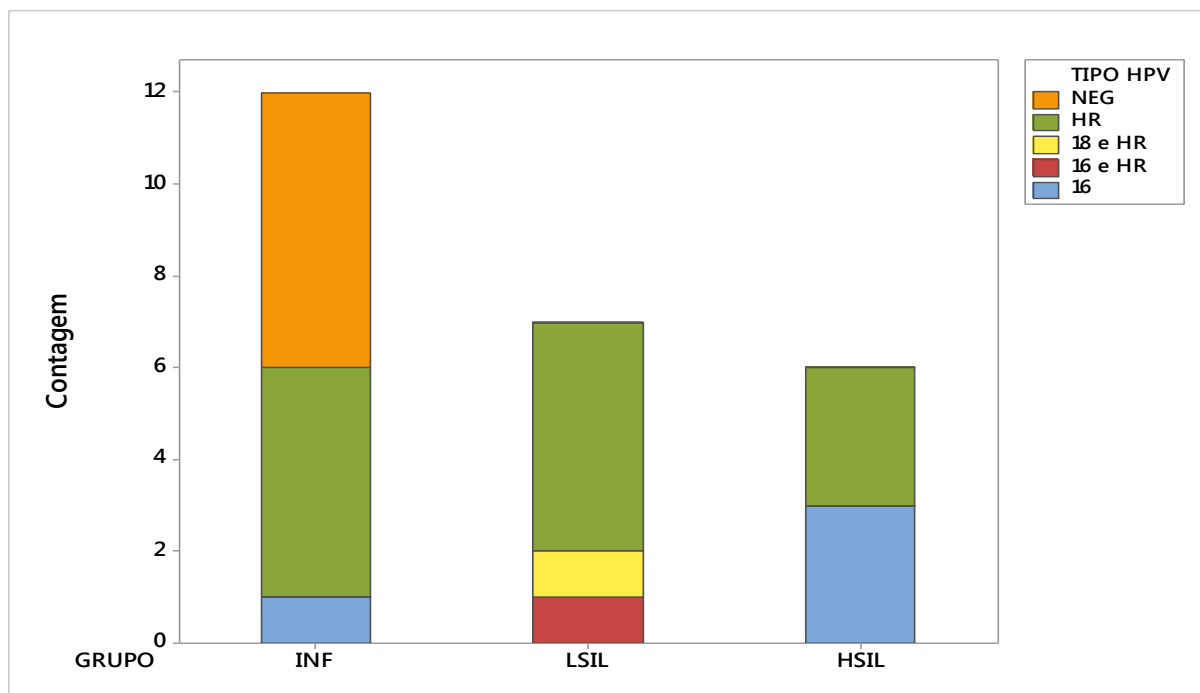


Figura 3 – Gráfico de barras da detecção e genotipagem do HPV nas amostras de citologia em meio líquido dos grupos INF, LSIL e HSIL. A presença dos tipos de HPV de alto risco (HR) está agrupada nas barras de cor verde e, estabelecendo co-infecções com os tipos 18 e 16, nas barras de cores amarela e vermelha, respectivamente. A barra de cor azul representa infecções somente pelo HPV-16. A barra alaranjada representa pesquisa negativa (NEG) para HPV de alto risco.

Como observado na figura acima, destaque, no nosso meio, para a presença relevante de infecções por tipos de HPV de alto risco distintas das infecções dos tipos 16 e 18, geralmente mais prevalentes, em todos os grupos do estudo e em especial nos grupos INF e LSIL. O grupo HSIL apresenta predomínio do HPV-16. Adicionalmente, a TABELA 2 abaixo demonstra a correlação dos escores da expressão imuno-histoquímica dos marcadores do inflamassoma NLRP3 nos blocos celulares em relação à detecção direta do HPV por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real.

### **Efeito do inflamassoma NLRP3 na progressão da neoplasia intraepitelial escamosa**

Corroborando os resultados acima, da associação dos marcadores do inflamassoma NLRP3 à infecção por HPV, as análises de regressão logística binária realizadas para cada marcador nas amostras de citologia em meio líquido do colo uterino, demonstraram influência do HPV em relação à expressão do marcador NLRP3.

As Tabelas 2 e 3 abaixo sumarizam os resultados das análises de regressão logística dos marcadores do inflamassoma NLRP3 em relação ao HPV.

Tabela 2 – Coeficientes estimados, erros, escores e P-valor dos modelos de regressão logística binária dos marcadores do inflamassoma NLRP3 em relação ao HPV

<b>Coeficiente</b>	<b>Estimativa</b>	<b>Erro</b>	<b>P-valor</b>
$\beta_{NLRP3}$	-0,693	0,866	0,002
$\beta_{Caspase-4/5}$	0,693	0,866	0,090
$\beta_{Caspase-1}$	--	--	--
$\beta_{IL-1\beta}$	0,693	0,866	0,369
$\beta_{IL-18}$	--	--	--

Dentre os modelos de regressão logística realizados, o marcador NLRP3 apresentou modelo com coeficiente estatisticamente significativo (P-valor = 0,002) e valor de  $R^2$  de 38,16%, com  $R^2$  ajustado de 34,16%. Os demais marcadores não apresentaram coeficientes com significância estatística.

Complementarmente, as análises de regressão logística permitiram o cálculo das *Oddsratios* (OR) ou razões de chances de cada marcador predizer a infecção pelo HPV. A TABELA 20 sumariza essas relações entre o inflamassoma NLRP3 e o HPV.

Tabela 3 – Predição da expressão dos marcadores do inflamassoma NLRP3 em relação ao HPV

<b>Marcador</b>	<b>Presença do HPV</b>	
	<b>OR</b>	<b>IC 95%</b>
NLRP3	36,0	(2,58;501,26)
Caspases-4/5	9,0	(0,64;125,31)
Caspase-1	--	--
IL-1 $\beta$	2,66	(0,32;21,73)
IL18	--	--

O marcador NLRP3 do inflamassoma NLRP3 apresenta razão de chances (OR = 36) com significância estatística (IC 95%: 2,58;501,26), indicando que NLRP3 está com expressão elevada ou hiperexpressão trinta e seis vezes mais naquelas participantes com HPV positivo do que naquelas com HPV negativo.

Em conjunto, esses resultados evidenciam a associação do HPV com o inflamassoma NLRP3 na neoplasia intraepitelial do colo uterino.

## DISCUSSÃO

O presente estudo encontrou resultados importantes e originais para aprofundamento do conhecimento sobre a participação de marcadores do inflamassoma na história natural do câncer do colo uterino.

O estudo seguiu técnicas dos fabricantes de insumos e protocolos padronizados no Laboratório de Patologia Molecular da Faculdade de medicina da UFMG e utilizou amostras oriundas do Serviço de Anatomia Patológica e Citopatologia do Hospital das Clínicas da UFMG e do NUPAD, centros regionais de referências técnicas na Saúde da Mulher.

Para mitigar ou controlar o risco da variabilidade interobservador na interpretação da imuno-histoquímica, o principal risco de viés na produção dos resultados, os seguintes cuidados foram adotados: 1) análise qualitativa das reações de imuno-histoquímica por duas variáveis independentes (intensidade e percentual de reatividade); 2) Adoção de escores da expressão imuno-histoquímica na análise semi-quantitativa conforme publicação de Takano e colaboradores (2016); 3) Concordância de dois observadores na classificação das reações imuno-histoquímicas.

Foram usadas amostras de biópsias do colo uterino e bloco de células (*cellblock*), a partir das amostras de citologia em meio líquido, para estudo prioritário do epitélio da mucosa escamosa cervical, sede da infecção pelo HPV e local de origem da NIC, além do infiltrado inflamatório e endotélio, participantes relevantes do processo inflamatório que ficam localizados no estroma da mucosa e influenciam a fisiopatologia epitelial.

No desenvolvimento do estudo encontramos algumas limitações como o número relativamente pequeno de pacientes e a quantidade reduzida de células em algumas amostras de blocos celulares. Isso se deve, em parte, ao fato de que várias amostras de citologia em meio líquido, que seriam usadas no trabalho, ficaram armazenadas sob refrigeração, por um longo período, e a preservação celular não possibilitou o uso.

Em conjunto, porém, quando se compara os resultados finais obtidos pelos blocos de células com os resultados das biópsias encontramos uma forte correlação na hiperexpressão do marcador NLRP3 nas amostras de NIC2/3 das biópsias e nas amostras de HSIL dos blocos de células. Demonstrando a viabilidade do uso deste método.

O papel da interação HPV/hospedeiro e da ativação do inflamassoma NLRP3 neste processo tem sido investigado e um estudo feito por Takano e colaboradores (2016) em amostras, com e sem HPV, de pacientes com carcinoma de células escamosas da orofaringe



mostra a correlação entre a expressão de moléculas associadas ao inflamassoma e a infecção pelo HPV. As proteínas associadas ao inflamassoma NLRP3 são altamente expressas em amostras com HPV quando comparadas a amostras normais.

De acordo com essas evidências de Takano e colaboradores (2016) a hiperexpressão do marcador NLRP3 nas amostras de NIC2/3 das biópsias e nas amostras de HSIL dos blocos de células seriam uma consequência direta da ação do HPV na ativação do inflamassoma NLRP3. Nestes grupos o DNA do vírus se integra ao genoma celular e ocorre uma desregulação na expressão das proteínas transformantes E6 e E7, que estariam envolvidas nesta ativação do inflamassoma NLRP3. Nas amostras de NIC1 as proteínas E6 e E7 estão expressas nas células basais em baixos níveis.

Pesquisas sugerem uma participação da família de receptores NLRP3 na geração de um inflamassoma induzido por caspase-11 (análoga, em humanos, das caspases inflamatórias 4/5) nas respostas a infecções bacterianas, com respostas rápidas. (Latzet *al.*, 2013). A Caspase-11 é ativada pela LPS de bactérias levando a morte celular e destruição da barreira endotelial. O que justificaria o aumento de sua expressão do marcador caspases-4/5 no compartimento endotelial.

O marcador caspase-1 apresentou uma expressão epitelial predominantemente moderada na maioria das amostras do grupo NIC2/3 que poderia ser explicada pela hiperexpressão do marcador NLRP3 responsável pela ativação da caspase-1. O marcador IL-18 apresentou imunorreatividade epitelial moderada na maioria das amostras de todos os grupos e fraca nos compartimentos inflamatório e endotelial da maioria das amostras dos grupos INF e NIC1.

De acordo com Pontillo e colaboradores (2016) o papel do inflamassoma foi recentemente investigado na interação hospedeiro/HPV devido à sua função na resposta antiviral e antitumoral. Diferentes receptores de reconhecimento de padrões (isto é, NLRP1, NLRP3, AIM2) são capazes de ativar o inflamassoma de acordo com estímulos específicos. Foram relatados achados discordantes sobre o envolvimento de inflamassomas na infecção pelo HPV. Um estudo feito por Reinholz e colaboradores (2013) mostrou que o HPV-16 ativa o inflamassoma AIM2, com consequente secreção de IL-1 $\beta$  e IL-18, e que esta ativação é diretamente proporcional na progressão de lesões cervicais no câncer cervical.

Outro expressivo resultado, desta vez pela ausência de diferenças estatisticamente significativas, foi a fraca expressão do marcador IL-1 $\beta$  em todos os grupos do estudo. Ou seja, independentemente da presença ou não de lesão do colo uterino e do HPV, não há diferenças

estatisticamente significativas da expressão deste marcador no epitélio, nas células do infiltrado inflamatório e no endotélio das biópsias do colo uterino.

Ainda no contexto da carcinogênese induzida por HPV, dados de um estudo discordante realizado por Niebler e colaboradores (2013) sugerem um novo mecanismo pós-transdução da regulação da pro-IL-1 $\beta$  que, em última instância, inibe a secreção de IL-1 $\beta$  em ceratinócitos infectados com vírus. Estes resultados foram confirmados em amostras de tecido HPV positivo, onde ocorre uma diminuição gradual da IL-1 $\beta$  em relação ao câncer cervical. Assim, a atenuação dos níveis IL-1 $\beta$  pela oncoproteína E6 do HPV em células imortalizadas é aparentemente um passo crucial na evasão imunológica viral e no início da malignidade.

Em conjunto, a Figura 4 abaixo ilustra o mecanismo hipotético de interação do inflamassoma NLRP3 com o HPV.

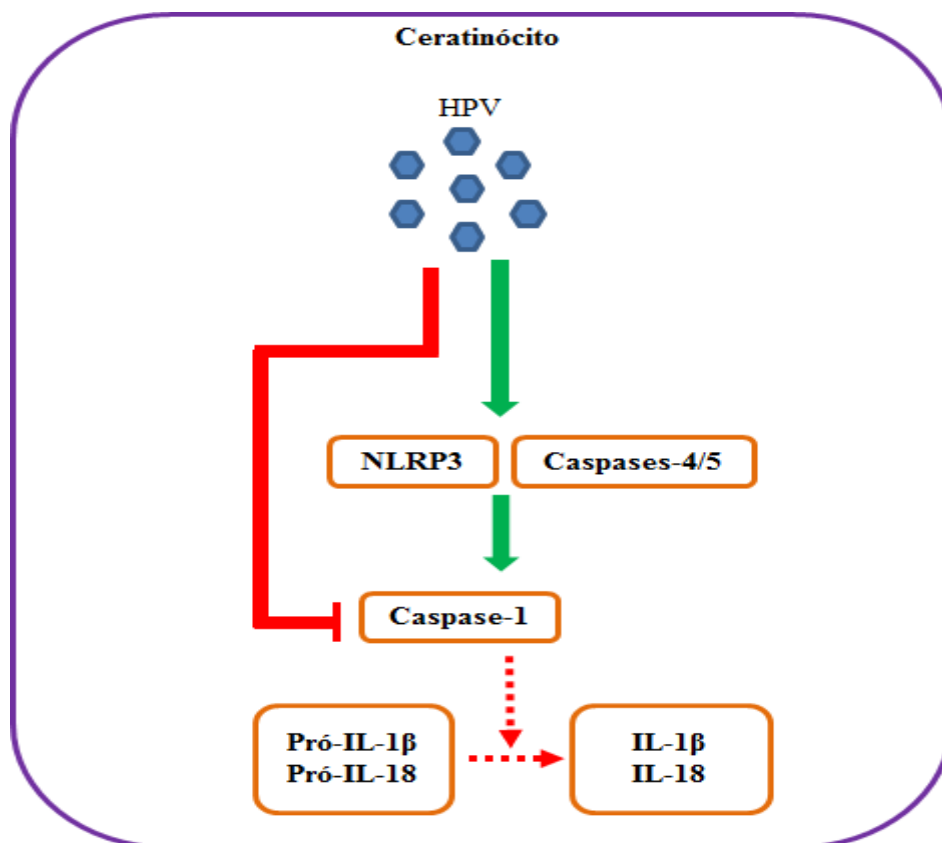


Figura 4 - Mecanismo hipotético de interação do inflamassoma NLRP3 com o HPV no ceratinócito da mucosa cervical.

## CONCLUSÃO

Este estudo identificou padrões de reatividade de marcadores do inflamassoma NLRP3 em biópsias do colo uterino e bloco de células (*cellblock*), a partir das amostras de citologia em meio líquido de pacientes HPV positivo, contribuindo para melhor entendimento do papel da imunidade inata na neoplasia intraepitelial do colo uterino.

Os resultados desta pesquisa permitem concluir que o inflamassoma NLRP3 participa da neoplasia intraepitelial do colo uterino associada ao HPV.

Assim, esse trabalho, produziu conhecimento para auxiliar no melhor entendimento da relação entre a infecção persistente pelo HPV e o desenvolvimento do câncer cervical e levanta perspectivas de continuidade dessa linha de pesquisa para melhor elucidação e comprovação dos mecanismos de ativação e funções dos inflamassomas na neoplasia intraepitelial do colo uterino.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. World Health Organization. “Module 2: Cervical Cancer – RiskFactors.”. Disponível em <http://www.cdc.gov/cancer/knowledge/provider-education/cervical/risk-factors.htm> - Acesso em 8 de fevereiro de 2018.

C.M. Martin, J.J. O’Lery Histology of cervical intraepithelial neoplasia and the role of biomarkers Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol., 25 (2011), pp. 605-615

Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero / Ministério da Saúde - Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva (INCA). Coordenação de Prevenção e Vigilância (Conprev). Divisão de Detecção Precoce e Apoio à Organização de Rede. Rio de Janeiro: INCA, 2016.

Doorbar J. The papillomavirus lifecycle. J Clin Virol. 2005; 32 Suppl 1: S7-15

Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: INCA, 2015.

Ferenczy A, Franco E. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. Lancet Oncol. 2002; 3(1): 11-6.

Fernández, D. & Lamkanfi, M. (2014). Inflammatory caspases: key regulators of inflammation and cell death. *Biological Chemistry*, 396(3), pp. 193-203. Retrieved 7 Feb. 2018, from doi:10.1515/hsz-2014-0253

- Figueiredo, Anna Carolina Cançado et al. Caracterização imunocitoquímica da expressão da proteína RAP1 em blocos de células escamosas provenientes de citologia cervical em meio líquido. 2015. Dissertação de Mestrado.
- Frazer, I. H. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nature Reviews Immunology*. 2004; 4(1)46-54.
- He Y, Hara H, Núñez G. Mechanism and regulation of NLRP3 inflammasome activation. *Trends in biochemical sciences*. 2016;41(12):1012-1021. doi:10.1016/j.tibs.2016.09.002.
- Kayagaki, N. et al. Non canonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4. *Science (New York, N.Y.)*, v. 341, n. 6151, p. 1246–9, 13 set. 2013.
- Lamkanfi, M.; Dixit, V. M. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell*, v. 157, n. 5, p. 1013–1022, 2014.
- Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasome. *Nature Reviews Immunology*. 2013; 13; 397-411.
- Nayar R, Wilbur D, C, The Pap Test and Bethesda 2014. *Acta Cytologica* 2015;59:121-132
- Niebler M, Qian X, Höfler D, et al. Post-Translational Control of IL-1 $\beta$  via the Human Papillomavirus Type 16 E6 Oncoprotein: A Novel Mechanism of Innate Immune Escape Mediated by the E3-Ubiquitin Ligase E6-AP and p53. Gack MU, ed. *PLoS Pathogens*. 2013;9(8):e1003536. doi:10.1371/journal.ppat.1003536.
- Pascoal-Xavier MA. Expressão e caracterização da proteína RAP1 como marcador da neoplasia intraepitelial cervical associada à infecção por papilomavírus humano. Belo Horizonte. Tese [Doutorado em Ciências na área de Ciências Biológicas] - Universidade Federal de Minas Gerais; 2011.
- Pontillo, A., Bricher, P., Leal, V.N.C., Lima, S., Souza, P.R.E. and Crovella, S. (2016), Role of inflammasome genetics in susceptibility to HPV infection and cervical cancer development. *J. Med. Virol.*, 88: 1646–1651. doi:10.1002/jmv.24514
- Reinholz, M., Kawakami, Y., Salzer, S. et al. *Arch Dermatol Res* (2013) 305: 723. <https://doi.org/10.1007/s00403-013-1375-0>
- Scheurer ME, Tortolero-Luna G, Adler-Storthz K. Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. *Int J Gynecol Cancer*. 2005;15(5): 727-46.
- Schiffman M, Kjaer SK. Natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003; 31: 14-9.

- Schroder K&Tschopp J. Mechanism TheInflammasomes. *Cell*, ISSN: 1097-4172, Vol: 140, Issue: 6, pp: 821-32. 2010
- Shrivastava, G., León-Juárez, M., García-Cordero, J. et al. *Immunol Res* (2016) 64: 1101. <https://doi-org.ez27.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s12026-016-8873-z>
- Smola S. Immuno pathogenesis of HPV-Associated Cancers and Prospects for Immunotherapy. *Viruses*. 2017; 9(9):254.
- Solomon, D; Nayar, R – Sistema Bethesda para Citopatologia Cervico vaginal Definições, Critérios e Notas Explicativas. SegundaEdição, Revinter, Rio de Janeiro, 2005.
- Stanley M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *GynecolOncol*. 2010 May;117(2 Suppl):S5-10
- Takano K, Kondo A, Kurose M, Yamashita K, Nomura K, Obata K, Murayama K, Ito F, Himi T. Expression of Inflammasome-Associated Proteins in Human Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *AdvOtorhinolaryngol*. 2016;77:98-104. doi: 10.1159/000441884.
- Thomison J III, Thomas LK, Shroyer KR. Human papillomavirus: molecular and cytologic/histological spectrs related to cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. *Hum Pathol*. 2009; 39(2): 154-66.
- Tornesello ML, Buonaguro L, Giorgi-Rossi P, Buonaguro FM. Viral and Cellular Biomarkers in the Diagnosis of Cervical Intraepithelial Neoplasia and Cancer. *BioMed Research International*. 2013;2013:519619. doi:10.1155/2013/519619.
- Vanaja S, Rathinam VK, Fitzgerald KA. Mechanisms of inflammasome activation: recent advances and novel insights. *Trends in cell biology*. 2015;25(5):308-315. doi:10.1016/j.tcb.2014.12.009.
- WHO World Health Organization. “Estimated Cervical Cancer Incidence Worldwide in 2012.” World Health Organization (2015). Disponível em <http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/cervix-new.asp> - Acesso em 8 de fevereiro de 2018.
- Zhong Y, Kinio A, Saleh M. Functions of NOD-Like Receptors in Human Diseases. *Frontiers in Immunology*. 2013;4:333. doi:10.3389/fimmu.2013.00333.
- zurHausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2(5): 342-50.