# CAIO RAONY FARINA SILVEIRA

# CARACTERIZAÇÃO DE ALVOS MOLECULARES EM TUMORES ASSOCIADOS AO PAPILOMAVÍRUS HUMANO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

São Paulo

2019

# CAIO RAONY FARINA SILVEIRA

# CARACTERIZAÇÃO DE ALVOS MOLECULARES EM TUMORES ASSOCIADOS AO PAPILOMAVÍRUS HUMANO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Lepique

Versão original

São Paulo 2019

#### DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do Instituto de

Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha catalográfica elaborada pelo autor

Silveira, Caio Raony Farina Caracterização de alvos moleculares em tumores associados ao Papilomavírus Humano / Caio Raony Farina Silveira. – São Paulo, 2019.

Orientadora: Prf<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Paula Lepique

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de Pesquisa: Imunomodulação tumoral. Versão do título para o inglês: Characterization of molecular targets in tumors

associated with Human Papillomavirus.

1. Imunomodulação; 2. Peptide Phage Display; 3. HPV; 4. alfa-manosidase; 5. triptase. I. Lepique, Ana Paula, orientadora. II. Título

## UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Caio Raony Farina Silveira

Titulo da Dissertação/Tese: Caracterização de alvos moleculares em tumores associados ao Papilomavírus Humano

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Paula Lepique

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a ........................, considerou o(a) candidato(a):

(	) Aprovado(a)	(	) Reprovado(a)
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:		
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:	· · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	
Presidente:	Assinatura: Nome: Instituição:	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

idade Universitaria "Armando de Saligs Oliveira" Butantă, Săo Paulo, SP. - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Potencial anti-tumoral de Swainsonina, inibidor de alfa-manosidase*", registrado sob o protocolo nº *8/2015-E*, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **30/03/2015** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais tem validade de **04 (guatro) anos** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: Dr.(a.) Ana Paula Lepique

- Membros da Equipe:

Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

# CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*Swainsonine antitumor potential, alpha-mannosidase inhibitor*", protocol nº *8/2015-E*, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for scientific research purposes, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8<sup>th</sup>, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15<sup>th</sup>, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on 3/30/2015 by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for 04 (four) years from the date of approval.

- Principal Investigator: Dr.(a.) Ana Paula Lepique

- Team members:

If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
Mus musculus	C57BL/6 arginase-yellow	Fêmea/female	5 semanas/weeks	60
	C57BL/6 RAG1KO	Fêmea/female	5 semanas/weeks	120

Julian Valiria

Profa. Dra. Luciane Valéria Sita Vice-coordenadora CEUA-ICB/USP



#### COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Cidade Universitaria Armando de Salles Oliveira Butantá São Paulo SP Av Professor Lineu Prestes 2415 - ICB III - 05506 000 CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail cep@icb usp br

## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Caracterização da atividade de Triptase proveniente de mastócitos em tumores associados ao Papilomavírus humano", registrado sob o protocolo nº **30/2017**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **02/05/2017** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: Dr.(a.) Ana Paula Lepique
- Departamento: Imunologia

- Membros da Equipe: Caio Raony Farina Silveira (Pós-graduando)

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico <u>www.icb.usp.br/ceua</u>. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

## CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*Tryptase activity characterization from mast cells in tumors associated with human papilloma virus*", protocol nº 30/2017, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8<sup>th</sup>, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15<sup>th</sup>, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on 5/2/2017 by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for 4 year(s) from the date of approval.

- Principal Investigator: Dr.(a.) Ana Paula Lepique

- Team members: Caio Raony Farina Silveira (Graduate Student).

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
Mus musculus	C57BL/6 Rag1	Fêmea/female	4 semanas/weeks	60
	C57BL/6	Fêmea/female	4 semanas/weeks	50

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes Coordenador CEUA-ICB/LISP

liane yong

Eliane Aparecida Gomes de M. Nascimento Secretário CEUA-ICB/USP

São Paulo, 04 de maio de 2017.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunomodulação do Departamento de Imunologia, do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade de São Paulo, em São Paulo, SP, Brasil, e recebeu apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e do INCT-HPV.

À minha tia Josefina Farina, Pesquisadora Científica do Instituto Butantan, que me incentivou a dar os primeiros passos no que se tornaria uma das paixões da minha vida, a ciência. Sinto que esteja onde estiver está me apoiando e me dando forças para nunca desistir.

#### AGRADECIMENTOS

À Professora Ana Paula Lepique, por me receber em seu laboratório e pela confiança. Agradeço por todos os ensinamentos, conselhos e por me ser um exemplo de cientista.

A todos os membros da banca por aceitarem participar da conclusão desta etapa tão importante da minha vida.

Aos meus anjos da guarda que me protegem de noite, de dia e sempre.

Aos meus pais Walter e Teresa e às minhas irmãs Patrícia e Fernanda por serem a base e o alicerce de todos os meus projetos e da minha vida. Amor incondicional.

Aos meus sobrinhos Lara, Yasmin, Sabrina, Danilo e Heitor, que fazem a vida parecer mais fácil e alegre, mesmo com todas as adversidades.

À Escola Poty por toda a base educacional e moral e à toda família Poty, por estar sempre unida e disposta a amparar.

À minha companheira de bancada e amiga Suellen, que esteve por perto nos melhores e piores momentos desta jornada.

À Marcella, pela colaboração no projeto da manosidase.

A todos do laboratório de Imunomodulação, Mariana, Flávia, Gretel, Marcella e Victor, pela convivência e cooperação dos últimos 4 anos.

Às alunas antigas do laboratório de Imunomodulação: Renata, Karla e Simone, que me receberam muito bem e estavam sempre prontas para ensinar.

À Sandra, por ser altruísta e ter auxiliado em todos os experimentos.

Às minhas orientadoras de iniciação e FUNDAP, Dra. Irene Fernandes, e de mestrado, Dra. Roxane Piazza, que foram peças fundamentais para que o doutorado fosse possível.

À minha orientadora de coração Dra. Eliana Faquim, que esteve presente em toda a jornada com as melhores palavras de incentivo e junto com a mestra Bianca Távora colaboraram no projeto dos mastócitos e triptase. Às amigas Bruna, Josi e Isa, que sempre estiveram dispostas a me ouvir.

A todos os professores, alunos e funcionários do departamento de Imunologia do ICB-USP.

"Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes". (Martin Luther King) SILVEIRA, C. R. F. **Caracterização de alvos moleculares em tumores associados ao Papilomavírus Humano.** 2019. 111f. Tese (Doutorado em Ciências com ênfase em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

#### RESUMO

O câncer de cervical é causado por uma infecção persistente por algum dos tipos oncogênicos de Papilomavírus Humano (HPV) e continua a ser um problema de saúde pública, especialmente nos países em desenvolvimento. Por Peptide Phage Display, foram selecionadas sequências de peptídeos com afinidade de ligação a linhagens celulares ou a tumores associados ao HPV. Dentre elas, foi possível identificar sequências contidas em moléculas importantes para a progressão de tumores, como a α-manosidase e triptase, enzimas que desempenham um papel importante na progressão tumoral. Para caracterizar o efeito da inibição de  $\alpha$ -manosidase II na terapia de tumores cervicais em camundongos, utilizamos a droga Swainsonina (SW), previamente descrita como inibidor desta enzima. Nós testamos o efeito desta droga tratando animais inoculados com células tumorais que expressam os oncogenes E6 e E7 de HPV16. Observamos que os animais tratados com Swainsonina apresentaram crescimento tumoral significativamente mais rápido do que os animais controle. Investigando os mecanismos por trás desse efeito, descobrimos que embora SW module parcialmente os macrófagos associados aos tumores, o tratamento induz o acúmulo de células com fenótipo mieloderivado supressor no baço dos animais, potencializando o efeito tolerogênico dos tumores sobre o sistema imune. Sendo assim, sugerimos cautela no uso deste fármaco para a terapia de pacientes com tumores HPV<sup>+</sup>. Outro braço do trabalho foi avaliar o papel da triptase, que é produzida por mastócitos, no infiltrado inflamatório. Para isto padronizamos um modelo de co-cultura de esferóides tumorais da linhagem TC-1 com a linhagem de mastócitos murinos PT18. Através deste modelo pudemos observar que a linhagem tumoral consegue induzir a desgranulação dos mastócitos independentemente de anticorpos. Além disso, quando em co-cultura, a linhagem tumoral parece estar aumentando a meia-vida dos mastócitos e estimulando a proliferação destes. Em experimentos in vivo observamos que tumores induzidos com as células PT18 e TC-1 cresceram mais rapidamente do que tumores induzidos apenas com TC-1. Através da imunofenotipagem dos tumores ficou evidenciado um aumento de células CD31<sup>+</sup> e no infiltrado inflamatório total de tumores induzidos com o co-cultivo. Justificando o fato destes crescerem mais rapidamente, sugerindo que os mastócitos podem ter efeitos tanto proliferativos quanto no processo de angiogênese tumoral.

SILVEIRA, C. R. F. Characterization of molecular targets in tumors associated with Human **Papillomavirus.** 2019. 111f. Thesis (PhD in Sciences with emphasis in Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

#### ABSTRACT

Cervical cancer is caused by a persistent infection by some of the oncogenic types of Human Papillomavirus (HPV) and continues to be a public health problem, especially in developing countries. By Peptide Phage Display peptide sequences were selected with binding affinity to cell lines or to HPV-associated tumors. Among them, it was possible to identify sequences contained in molecules important for the progression of tumors, such as  $\alpha$ -mannosidase and tryptase, enzymes that play an important role in tumor progression. To characterize the effect of  $\alpha$ mannosidase II inhibition on cervical tumor therapy in mice, we used the drug Swainsonina (SW), previously described as an inhibitor of this enzyme. We tested the effect of this drug by treating animals inoculated with tumor cells expressing HPV16 E6 and E7 oncogenes. We observed that Swainsonine treated animals had significantly faster tumor growth than control animals. Investigating the mechanisms behind this effect, we found that although SW partially modulates tumor-associated macrophages, the treatment induces the accumulation of cells with suppressive myeloderivative phenotype in the animals spleens, enhancing the tolerogenic effect of tumors on the immune system. Therefore, we suggest caution in the use of this drug for the therapy of patients with HPV<sup>+</sup> tumors. Another arm of the study was to evaluate the role of tryptase, which is produced by mast cells, in the inflammatory infiltrate. For this we standardized a co-culture model of tumor spheroids of the TC-1 lineage with the murine mast cell line PT18. Through this model we could observe that the tumoral lineage can induce mast cell degranulation independently of antibodies. In addition, when co-cultured, the tumoral lineage appears to be increasing the half-life of mast cells and stimulating the proliferation of these. In in vivo experiments we observed that tumors induced with PT18 and TC-1 cells grew faster than tumors induced only with TC-1. Tumor immunophenotyping revealed an increase in CD31<sup>+</sup> cells and in the total inflammatory infiltrate of tumors induced with co-culture. Justifying the fact that they grow faster, suggesting that mast cells can have both proliferative effects and the process of tumor angiogenesis.

#### LISTA DE ABREVIATURAS

- BMDC células derivadas da medula óssea
- **CA** Adenocarcinoma
- **CCL** chemokine (C-C motif) ligand
- **CD** Cluster of differentiation
- **CEC** carcinoma espinocelular
- COX ciclooxigenase
- **CRC** câncer colorretal
- **CXCL** chemokine (C-X-C motif) ligand
- DNA ácido desoxirribonucleico
- EMT Transição epitélio-mesênquima
- ERK extracellular signal-regulated kinases
- **Fc** fragment crystallizable
- **FGF** *fibroblast growth factor*
- **FSC** Foward-scattered
- G-CSF Fator de crescimento de colônias de granulócitos
- HPV Papilomavírus humano
- IFN Interferon
- **Ig** Imunoglobulina
- IL Interleucinas
- INCA Instituto Nacional de Câncer
- iNOS Inducible nitric oxide syntase

- LPS lipopolissacarídeo
- MAPK mitogen-activated protein kinase
- MDSC células mieloderivadas supressoras
- MHC Complexo principal de histocompatibilidade
- **MMP** metaloproteinases de matriz
- **MSC** células-tronco mesenquimais
- NF-κB fator de transcrição nuclear kappa B
- **NIC** Neoplasia intraepitelial cervical
- NK natural killer
- ORF Região codificadora
- **PAR-2** Protease activated receptor 2
- PBMC células mononucleares do sangue periférico
- **PDGF** *Platelet-derived growth factor*
- **PHK** primary human keratinocytes
- PKC Proteína quinase C
- **PMA** phorbol myristate acetate
- **pRB** proteína do retinoblastoma
- **RAS** rat Sarcoma virus
- **SSC** Side-scattered
- SSC carcinomas de células escamosas
- **STAT** signal transducers and activators of transcription
- SW Swainsonina

- **TAM –** macrófagos associados a tumores
- **TEM –** monócitos expressando TIE-2
- **TERT –** *Telomerase reverse transcriptase*
- **TGF** *Transforming growth factor*
- **TNF** Fator de Necrose Tumoral
- **URR -** Região regulatória *upstream*
- **VEGF** Fator de crescimento do endotélio vascular
- **WHO** World Health Organization

#### **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 - Representação esquemática do genoma do HPV	25
Figura 2 - O ciclo de vida cervicovaginal do HPV e desenvolvimento de tumores	27
Figura 3 - O microambiente tumoral	28
Figura 4 - Imunodetecção de $\alpha$ -Manosidase	31
Figura 5 - A via de processamento de carboidratos N-ligados do Complexo de Golgi	32
Figura 6 - Sinalização mediada por PAR-2 e progressão tumoral	37
Figura 7 - O tratamento com Swainsonina não inibe a proliferação de células tumorais <i>in</i>	
vitro	51
Figura 8 - A Swainsonina modula parcialmente os macrófagos associados ao tumor	53
Figura 9 - Cinética de crescimento tumoral	54
Figura 10 - Frequência de leucócitos infiltrantes tumorais determinada por citometria de	
fluxo	55
Figura 11 - Fenotipagem do baço de camundongos <i>naive</i> e com tumor tratados com SW	
ou com veículo	57
Figura 12 - Fenotipagem do baço de camundongos livres de tumor tratados com SW e	
com veículo	58
Figura 13 - Ensaio de supressão da proliferação de linfócitos T por MDSC	60
Figura 14 - Western blotting mostrando a expressão de fosfo (p) e total de NF-кВ e STAT3	
em lisados de baço	61
Figura 15 - Avaliação da expressão de triptase pela linhagem celular PT18	62
Figure 16 - Imunodetecção de triptase por imunofluorescência	63
Figura 17 – Expressão de marcadores de superfície pela linhagem PT18	64
Figura 18 - Avaliação da expressão de PAR-2 por queratinócitos	65
Figura 19 - Esferóides de TC-1	66
Figura 20 - Ensaio de infiltração de mastócitos (PT18) nos esferóides tumorais de TC-1	67
Figura 21 – Desgranulação independente de anticorpos	68
Figura 22 - Cinética de desgranulação dos mastócitos na presença de TC-1	69
Figura 23 – Cinética de crescimento dos esferoides tumorais com mastócitos e ciclo	
celular	70

Figura 24 - Teste de viabilidade com cristal violeta de co-cultura de PT18 com TC-1 em	
monocamada	71
Figura 25 - Teste de viabilidade com cristal violeta de co-cultura em monocamada com	
diferentes razões de TC-1/PT-18	72
Figura 26 – Cinética de crescimento de tumores TC-1 e TC-1/PT18	73
Figura 27 – Avaliação das células endoteliais e leucócitos totais por FACS	74
Figura 28 – Representação esquemática do mecanismo de ação de SW no tratamento de	
animais com tumores	85

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Painel de anticorpos utilizados para imunofenotipagem de tumores animais	
tratados com SW	43
Tabela 2 – Painel de anticorpos utilizados para imunofenotipagem dos baços de animais	
tratados com SW	43
Tabela 3 – Anticorpos utilizados na caracterização dos marcadores de superfícies da	
linhagem celular PT18	44

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
1.1 HPV e o câncer	24
1.2 Microambiente tumoral	27
1.3 Peptide Phage Display e tumores associados ao HPV	30
1.4 α-Manosidase	32
1.5 Mastócitos e Triptase	34
2. OBJETIVOS	38
3. MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1 Linhagens celulares	41
3.2 Animais	41
3.3 Modelo subcultâneo de indução de tumores TC-1	42
3.4 Caracterização do perfil inflamatório dos animais	42
3.4.1. Preparação das suspensões celulares	42
3.4.2 Citometria de fluxo	43
3.4.3 Cell Sorting	45
3.4.4 Atividade de iNOS e Arginase	45
3.4.5 Ensaio de inibição da proliferação de linfócitos T por MDSCs	46
3.5 Western blotting	46
3.6 Avaliação da expressão de Triptase pela linhagem PT18 por Imunofluorescência	47
3.7 Cultura de esferoides tumorais	47
3.8 Ensaio de detecção da atividade de β-hexosaminidase de mastócitos	48
3.9 Cinética de crescimento dos esferoides tumorais com mastócitos	48
3.10 Análise estatística	48
4. RESULTADOS	49
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA $\alpha$ -MANOSIDASE EM TUMORES ASSOCIADOS AO HPV	50
4.1.1 $\alpha$ -manosidase é expressa nos tumores TC-1, entretanto o tratamento com	
Swainsonina não tem efeito na proliferação de células tumorais in vitro	50
4.1.2 A Swainsonina modula parcialmente os macrófagos associados ao tumor	52

4.1.3 O tratamento de camundongos com o inibidor de $lpha$ -manosidase II (SW)	
potencializa o crescimento tumoral	53
4.1.4 Tumores de animais tratados com SW recrutam menos infiltrado	
inflamatório, composto principalmente de células mielóides, que os tumores	
controle	54
4.1.5 A SW aumenta significativamente a leucocitose no baço	55
4.1.6 O tratamento com SW promove a supressão de células T através de MDSC	59
4.1.7 A imunossupressão exacerbada causada pelo tratamento terapêutico com	
SW pode estar relacionada com alterações na ativação de vias de sinalização	
intracelulares nos esplenócitos	61
4.2 CARACTERIZAÇÃO DA TRIPTASE DE MASTÓCITOS EM TUMORES ASSOCIADOS AO	
HPV	62
4.2.1 Avaliação da expressão de Triptase pela linhagem celular PT-18	62
4.2.2 Avaliação dos marcadores de superfície da linhagem PT-18 por citometria	
de fluxo	63
4.2.3 Avaliação do perfil de expressão de receptor PAR-2 por linhagens celulares	65
4.2.4 Padronização do modelo de esferóides de co-cultura de PT18 e TC-1 <i>in vitro</i>	
para avaliar o papel da Triptase no crescimento tumoral	65
4.2.5 Ensaio de desgranulação de PT18 em esferóides de co-cultura com TC-1	67
4.2.6 Ciclo celular de esferóides de co-cultura de PT18 com TC-1	69
4.2.7 Teste de viabilidade com cristal violeta de co-cultura de PT18 com TC-1 em	
monocamada	70
4.2.8 Avaliação do efeito in vivo dos mastócitos no crescimento de tumores TC-	
1 em camundongos RAG1-/	72
5. DISCUSSÃO	75
5.1 INIBIÇÃO DE $\alpha$ -manosidase II em modelo de tumores associados ao	
HPV16	77
5.2 CARACTERIZAÇÃO DA TRIPTASE DE MASTÓCITOS EM MODELOS EXPERIMENTAIS	
DE TUMORES ASSOCIADOS AO HPV16	80
6. CONCLUSÕES	83

	6.1 α-Manosidase	84
	6.1 Triptase	85
7.	CONCLUSÕES FINAIS	87
8.	REFERÊNCIAS	89
9.	APÊNDICE (Artigos publicados ou em andamento durante o período do doutorado)	104
	9.1 SWAINSONINE, NA ALPHA-MANNOSIDASE INHIBITOR, MAY WORSEN CERVICAL	
	CANCER PROGRESSION THROUGH THE INCREASE IN MYELOID DERIVED SUPRESSOR	
	CELLS POPULATION	105
	9.2 UM ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE O INFILTRADO INFLAMATÓRIO E A	
	MICROBIOTA DE LESÕES CERVICAIS ASSOCIADAS AO HPV	106
	9.3 THE ROLE OF RECK SUPER EXPRESSION IN HPV-ASSOCIATED TUMORIGENESIS	108
	9.4 LOCAL AND SYSTEMIC IMMUNOMODULATORY MECHANISMS TRIGGERED BY	
	HUMAN PAPILLOMAVIRUS TRANSFORMED CELLS: A POTENCIAL ROLE FOR G-CSF	
	AND NEUTROPHILS	109
	9.5 CAN ANTI-BOTHROPSTOXIN-I ANTIBODIES DISCRIMINATE BETWEEN BOTHROPS	
	JARARACA AND BOTHROPS JARARACUSSU VENOMS?	110
	9.6 SINGLE CHAIN VARIABLE FRAGMENTS PRODUCED IN ESCHERICHIA COLI AGAINST	111
	HEAT-LABILE AND HEAT-STABLE TOXINS FROM ENTEROTOXIGENIC E. COLI	

# 1. INTRODUÇÃO

## 1. INTRODUÇÃO

#### 1.1 HPV e o câncer

O câncer da cérvice uterina é um dos tipos de neoplasia mais frequentes em mulheres em todo o mundo (Decrausaz *et al.*, 2011). Dados estimam 530.000 novos casos de câncer cervical e dentre estes, mais de 270.000 mortes (Plummer *et al.*, 2016). No Brasil, em 2016, estima-se que houve 16.340 casos novos de câncer cervical, com um risco estimado de 15,85 casos a cada 100 mil mulheres. É o terceiro tipo de câncer mais incidente dentre as mulheres e o quarto que causa mais mortes. Em 2013, ocorreram 5.430 óbitos por esta neoplasia, representando uma taxa de mortalidade ajustada para a população mundial de 4,86 óbitos para cada 100 mil mulheres (INCA, 2015).

Tem se estimado que 99% dos casos de câncer cervical têm como etiologia uma infecção genital persistente por qualquer tipo oncogênico de HPV (WHO, 2007). Esta relação foi comprovada após diversos estudos que se iniciaram no fim da década de 70. Sendo relacionados ao HPV, carcinomas de células escamosas (SCC) (70%), adenocarcinomas (CA) (25%) ou tumores histológicos mistos (Cutts *et al.*, 2007). Histologias extremamente raras não associadas ao HPV, representam menos de 1% dos casos recém diagnosticados (Frumovitz, 2016). O HPV é também o fator etiológico de uma porcentagem significativa de tumores anogenitais e orofaríngeos (Gillison *et al.*, 2012; Moscicki *et al.*, 2012).

O HPV é um vírus de DNA dupla-fita, epiteliotrópico e não envelopado. O genoma do HPV possui nove ou oito regiões codificadoras (ORFs), dois sítios de poliadenilação e uma região regulatória da transcrição e replicação (URR). Também possuem dois conjuntos de genes, chamados de precoces e tardios. Os genes precoces são expressos na primeira etapa do ciclo viral, sendo eles E1, E2, E4, E5, E6 e E7. Os genes tardios L1 e L2 codificam proteínas estruturais para a formação do capsídeo (Hebner e Laimins, 2006) (FIGURA 1).



**Figura 1** - **Representação esquemática do genoma do HPV.** O genoma viral pode ser dividido em três regiões: uma região precoce necessária para a replicação viral composta pelos genes E1, E2, E4, E5, E6, e E7; uma região tardia contendo os genes L1 e L2 que codificam proteínas estruturais; e uma região regulatória que contém a origem da replicação e o controle dos elementos para a transcrição e replicação (URR) (Muñoz *et al.*, 2006).

São descritos mais de 200 tipos de HPV, classificados por critérios como avaliação de regiões hipervariáveis do genoma, pelo tipo de células que infectam e pela capacidade de transformação celular. O critério de transformação celular divide os vírus que infectam a mucosa anogenital em baixo risco e alto risco oncogênico, sendo que os de baixo tipo oncogênico frequentemente levam ao surgimento de lesões benignas, como verrugas, enquanto os de alto risco estão relacionados com o processo de carcinogênese (Fehrmann e Laimins, 2003). Os dois vírus de baixo risco mais comuns que causam verrugas nas mucosas anogenitais são os HPV 6 e 11. Por outro lado, existem mais de 15 vírus oncogênicos ou de alto risco que infectam o trato genital, mas os principais são o HPV 16 e 18, os quais são os responsáveis por 70% dos casos de câncer cervical (Parkin e Bray, 2006).

Após a infecção pelo HPV, o desenvolvimento de tumores envolve a persistência do vírus na camada basal de células epiteliais e integração do DNA viral no genoma da célula hospedeira, de forma que os oncogenes virais E6 e E7 são constitutivamente expressos, causando assim a imortalização das células (Pirami *et al.*, 1997), devido à inibição das funções p53 e pRb (Doorbar, 2006). Adicionalmente, a proteína E6 promove a transcrição de hTERT, subunidade catalítica da telomerase com função de manter a integridade dos telômeros durante a replicação do genoma celular (Klingelhutz *et al.*, 1996). Com passar do tempo, as células imortalizadas adquirirem mais mutações ou sofrem mais perturbações por intermédio das oncoproteínas do HPV, levando à transformação destas células, como por exemplo, a instabilidade genômica por promoverem anomalias nos centrossomos (Duensing e Münger, 2003). A expressão de oncoproteínas de HPV E6 e E7 é essencial para a manutenção do fenótipo transformado das células tumorais (Johung *et al.*, 2007).

A infecção persistente por HPV causa lesões precursoras no epitélio denominadas de neoplasias intraepiteliais cervicais, que são classificadas em 3 grupos de risco progressivo (NIC 1, NIC 2 e NIC 3) com base na proporção de epitélio acometido (Moscicki *et al.*, 2012). Uma pequena porcentagem de lesões precursoras NIC 1 podem evoluir para lesões NIC 2 e NIC 3, com proliferação contínua e aumento da instabilidade cromossômica. Ao fim ocorre um processo biológico chamado de transição epitélio-mesenquimal (EMT) que envolve a polarização de células epiteliais, que normalmente interagem com a membrana basal através de suas superfícies basais. Essa polarização induz múltiplas alterações bioquímicas que permitem que as células assumam um fenótipo de célula mesenquimal (Samatov *et al.*, 2013). Essas mudanças conferem várias propriedades, como capacidade migratória, invasividade, elevada resistência à apoptose e a produção de componentes da matriz extracelular (ECM) (Kalluri e Neilson, 2003) (FIGURA 2).



**Figura 2 - O ciclo de vida cervicovaginal do HPV e desenvolvimento de tumores.** Para iniciar a infecção, o papilomavírus humano (HPV) se liga aos proteoglicanos na membrana basal por meio de lesões no epitélio, levando à infecção destas células. O epitélio não infectado é representado à esquerda e o epitélio infectado pelo HPV é ilustrado a direita. Os genomas virais são mantidos na forma epissomal e são expressos conforme as células infectadas se movem em direção à superfície epitelial. A fase tardia do ciclo de vida produtivo ocorre nas camadas epiteliais superiores, diferenciadas terminalmente, onde os vírus progenitores são liberados (hexágonos vermelhos). A expressão de E6 e E7 desregula o controle do ciclo celular, levando as células diferenciadas para a fase S, permitindo à amplificação do genoma viral em células que normalmente teriam saído do ciclo celular. A progressão para neoplasias de alto grau representa uma infecção abortiva, na qual a expressão de E6 e E7 fica desregulada e o ciclo de vida normal de produção de vírus não pode ser concluído. NIC indica neoplasia intraepitelial cervical (adaptado de Berman e Schiller, 2017).

#### 1.2 Microambiente tumoral

Os tumores são tecidos complexos que contêm além de células tumorais, células endoteliais, pericitos, células inflamatórias, fibroblastos, como também componentes acelulares,

tais como citocinas, mediadores inflamatórios e matriz extracelular. Dentro do microambiente tumoral, diferentes elementos são capazes de induzir a angiogênese, inativar respostas antitumorais das células T através de vários mecanismos, e promover a sobrevivência e proliferação de células do tumor (Hanahan e Weinberg, 2011) (FIGURA 3).



**Figura 3** - **O** microambiente tumoral. Células cancerosas em tumores primários são cercadas por um microambiente complexo compreendendo numerosas células, incluindo células endoteliais do sangue e circulação linfática, fibroblastos estromais e uma variedade de células derivadas da medula óssea (BMDCs), incluindo macrófagos, células mieloderivadas supressoras (MDSCs), monócitos expressando TIE-2 (TEMs) e células-tronco mesenquimais (MSCs) (adaptado de Joyce e Pollard, 2009).

As células do infiltrado inflamatório dos tumores constituem uma importante linha de defesa inicial contra o tumor, através da geração de espécies reativas de oxigênio, pela secreção de citocinas pró-inflamatórias, e mediando citotoxicidade. Entretanto, durante o desenvolvimento inicial do tumor, as restrições de proteção do microambiente são anuladas por

condições como a inflamação crônica, e o microambiente tecidual local muda para um estado promotor de crescimento (Guerra *et al.*, 2011; Barashi *et al.*, 2013). Portanto as células mielóides derivadas da medula óssea (BMDCs) recrutadas ao microambiente tumoral sofrem a ação de sinais e rapidamente se polarizam a células com propriedades anti-inflamatórias e supressoras, tais como células mieloderivadas supressoras (MDSCs) e macrófagos alternativamente ativados (M2) (Baay *et al.*, 2011; Sevko e Umansky, 2013; Tanchot *et al.*, 2013). Outras populações mielóides potencialmente supressoras da resposta adaptativa também encontradas no infiltrado inflamatório de tumores sólidos são neutrófilos (N2), monócitos que expressam o receptor de angiopoietina TIE-2 e mastócitos (Joyce e Pollard, 2009).

As células mielóides compartilham papéis redundantes no infiltrado inflamatório no que diz respeito a progressão tumoral. Estas células podem suprimir a resposta imune adaptativa bloqueando as funções das células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, em parte através da produção de arginase e óxido nítrico, expandindo o pool de células T reguladoras e inibindo a ativação de células NK (Sica e Bronte, 2007; Marigo *et al.*, 2008). Além disso, contribuem para a angiogênese tumoral através da produção de fatores de crescimento, citocinas e proteases, como fator de crescimento endotelial vascular A (VEGFA), PROK2 (também conhecido como BV8) e metaloproteinases de matriz (MMPs) (Murdoch *et al.*, 2008). Vários desses tipos de celulares também foram relacionados a invasão e metástase, aumentando a malignidade do tumor direta e/ou indiretamente.

A presença de um infiltrado inflamatório implica que os tumores secretem fatores capazes de recrutar estas células. De fato, tem sido relatado que os tumores secretam fatores que induzem a proliferação das células em tecidos linfóides (Wilcox, 2010), que inclui células mielóides com o fenótipo imaturo e características supressoras (Kusmartsev e Gabrilovich, 2002).

Dados de vários estudos demonstraram que as lesões cervicais associadas ao HPV são infiltradas por macrófagos e linfócitos (Hammes *et al.*, 2007; Kobayashi *et al.*, 2008; Woo *et al.*, 2008). De fato, a relação entre células T CD8 e Tregs em tumores primários é um marcador prognóstico para o câncer de colo do útero (Piersma *et al.*, 2007). Além do microambiente tumoral, as células T CD4<sup>+</sup> específicas de HPV, com fenótipo efetor e/ou de regulação estão presentes no sangue periférico das pacientes. O fenótipo dos linfócitos depende da progressão

da lesão cervical. Mulheres assintomáticas, preferencialmente, apresentam respostas do tipo Th1 contra antígenos virais, entretanto mulheres com câncer apresentam também células T reguladoras (Welters *et al.*, 2006), e resposta efetora Th1 ineficiente (Van Der Burg *et al.*, 2007).

A identificação do papel e da fonte das células do infiltrado inflamatório é importante para a compreensão da biologia do tumor. Além disso, estas populações de células constituem um alvo para a interferência que pode contribuir para a desestabilização do crescimento e progressão tumoral (Lepique *et al.*, 2009; Palucka e Coussens, 2016). A identificação destes alvos pode ser realizada por meio da técnica de *Peptide Phage Display*.

#### 1.3 Peptide Phage Display e tumores associados ao HPV

A tecnologia de *Phage Display* é baseada na capacidade de bacteriófagos expressarem peptídeos menores ou polipeptídeos em sua superfície em fusão com proteínas do capsídeo viral e foi descrita pela primeira vez em 1985 por George P. Smith. A técnica de *Peptide Phage Display* permite a investigação de interações entre ligante e receptor, através da construção de um mapa de sítios de ligação do ligante ou receptor a partir das sequências de peptídeos selecionados (Giordano *et al.*, 2001). Mais especificamente no estudo do câncer, a técnica de *Peptide Phage Display* tem sido amplamente utilizada em diferentes estratégias como: em modelos de inibição de fatores pró-angiogênicos como o bFGF (Yayon *et al.*, 1993), em diagnóstico experimental de marcadores de câncer cervical como p16 (Khemthongcharoen *et al.*, 2015) e na busca de antagonistas para reativar a via de pRB/E2F (Guo, C. P. *et al.*, 2011).

Pelo procedimento de *Biopanning*, foram obtidas sequências peptídicas com afinidade a linhagens celulares positivas para HPV (HeLa e SiHa) *in vitro* e *in vivo* em nosso laboratório. Estas foram submetidas à análise no software ClustalW2 (EMBL-EBI, UK) para identificar motivos comuns aos peptídeos identificados. Algumas das sequências peptídicas encontradas apresentam similaridade com proteínas humanas e estão associadas ao câncer.

Ficamos especialmente interessados em dois alvos, a  $\alpha$ -manosidase e a Triptase, ambos com atividades associadas ao cancer descritas na literatura. No caso da  $\alpha$ -manosidase, foi realizada a validação onde pode se observar uma alta expressão desta enzima nas linhagens tumorais e em macrófagos do infiltrado inflamatório (FIGURA 4A) e em biópsias de lesões (indicadas na figura) coletadas do colo uterino de pacientes atendidas na UNICAMP, em estudo dirigido pelo Dr. Luis Carlos Zeferino, com indicação de biópsia (FIGURA 4B).





#### 1.4 α-Manosidase

Tem sido documentado que em algumas doenças que acometem humanos, incluindo o câncer, existe uma alteração no padrão de glicosilação de proteínas. Células "doentes" expressam glicoproteínas com estruturas e/ou com níveis de glicanos alterados, quando comparadas com células "normais" (Dennis *et al.*, 1999; Ito *et al.*, 2005). Estas alterações no padrão de glicosilação de glicoproteínas são uma característica comum de cânceres humanos, o que influencia no comportamento do tumor, metástase e na vigilância imunitária (Parham, 1996; Rudd *et al.*, 1999), além de representarem potenciais alvos para abordagens terapêuticas (Hollingsworth e Swanson, 2004; Liu e Rabinovich, 2005).

O processo de glicosilação é complexo e é definido pela adição de açúcares em proteínas recém-sintetizadas, que ocorre no lúmen do Retículo Endoplasmático Rugoso e no Complexo de Golgi. Há estimativas de mais de 200 enzimas glicosiltransferase nesta via, o que resulta em uma considerável diversidade estrutural dos carboidratos encontrados em glicoproteínas secretadas e transmembranares (Goss *et al.*, 1995) (FIGURA 5).



Figura 5 - A via de processamento de carboidratos N-ligados do Complexo de Golgi. Muitas sequências podem ser adicionadas aos terminais, com preferência a estruturas do tipo complexo, como as mostradas à direita. Uma via secundária de processamento alternativo contorna a necessidade de  $\alpha$ -manosidase II. Enzimas:  $\alpha$ G:  $\alpha$ -glucosidase,  $\alpha$ MI:  $\alpha$ -manosidase I,  $\alpha$ MII:  $\alpha$ -

manosidase II, TI, TII, TIV, TV: β1-6-N-Acetilglicosamina transferases, respectivamente (adaptado de Goss *et al.*, 1995).

Células cancerosas comumente apresentam aumento de  $\beta$ 1-6-N-Acetilglicosamina. Este aumento tem sido notado em tumores com carcinoma de mama, cólon e em câncer de pele (Dennis e Laferté, 1989; Fernandes *et al.*, 1991). Em tecidos normais a forma de  $\beta$ 1-6-N-Acetilglicosamina está relacionada com células com capacidade de invasão, como: trofoblastos intersticiais e linfócitos ativados (Fernandes *et al.*, 1991; Lemaire *et al.*, 1994).

A enzima chave que produz as formas acima citadas, é a β1-6-N-Acetilglicosamina transferase V. As ramificações geradas por esta enzima são preferidas por enzimas subsequentes da via para extensão com Polilactosamina e Antígenos de Lewis. Estas sequências são distribuídas limitadamente em tecidos normais. Entretanto são altamente expressas em carcinomas humanos, servindo como marcadores tumorais (Yousefi *et al.*, 1991; Heffernan *et al.*, 1993).

Polilatosamina e Antígenos de Lewis quando expressos em tumores podem contribuir com adesão célula-célula, via selectinas e lectinas, as quais são encontradas no endotélio vascular, assim, aumentando a invasão e metástase (Cornil *et al.*, 1990; Sawada *et al.*, 1993). Entretanto vale ressaltar que as alterações no processo de glicosilação são importantes não apenas na adesão. Interessantemente, no processo de transformação de células pela ativação de oncogenes na via de RAS e c-Myc, tem sido demonstrado um aumento na atividade de β1-6-N-Acetilglicosamina transferase V (Hiraizumi *et al.*, 1991; Lu e Chaney, 1993).

Em estudos do câncer, as  $\alpha$ -manosidades e  $\alpha$ -glicosidases são os mais promissores alvos para o desenvolvimento de inibidores de glicosidases celulares (Gerber-Lemaire e Juillerat-Jeanneret, 2010). A Swainsonina (SW) ou 8 $\alpha$ β-indolizidina-1 $\alpha$ ,2 $\alpha$ ,8 $\beta$ -triol, um alcaloide extraído inicialmente de *Swainsona canescens*, e é um potente inibidor de  $\alpha$ -manosidade II de Golgi e de  $\alpha$ 1-3-/ $\alpha$ 1-6- manosidases lisossomais, mas não possui ação sobre a  $\alpha$ -manosidase I de Golgi (Bowen *et al.*, 1993; Winchester *et al.*, 1993). O efeito da SW foi avaliado em diferentes linhagens celulares de câncer humano. O tratamento de células de hepatoma humano com SW resultou numa secreção acelerada de formas híbridas de glicoproteínas transferrina, ceruloplasmina,  $\alpha$ 2macroglobulina e  $\alpha$ 1-antitripsina, enquanto a secreção de proteínas não glicosiladas não foi afetada (Yeo *et al.*, 1985). O transporte destas glicoproteínas híbridas através do aparelho de Golgi foi mais rápido do que o transporte de glicoproteínas normais. Em experimentos *in vivo* (Humphries *et al.*, 1986), camundongos injetados com B16-F10, linhagem celular de melanoma murino, incubadas previamente com SW, mostraram uma inibição dose-dependente da colonização pulmonar. No entanto as propriedades tumorigênicas das células B16-F10 não foram afetadas pela SW. Em modelos experimentais de câncer murino, a administração de SW na água, antes ou após a excisão cirúrgica do tumor primário, inibiu em 95 e 88% da formação de metástases espontâneas para o fígado e os pulmões das células altamente invasivas M5076 (reticulosarcoma murino) ou B16-F10 (melanoma murino) (Olden *et al.*, 1991).

Adicionalmente, tem sido avaliado o efeito da SW no infiltrado inflamatório. A SW possui a capacidade de induzir secreção de citocinas, tais como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . Este efeito sobre a secreção de citocinas poderia permitir uma modulação na atividade tumoricida de macrófagos e de células *natural killer* (Humphries *et al.*, 1988; Das *et al.*, 1995). Além da expressão de IL-1, a estimulação da atividade tumoricida de macrófagos foi associada com a maior expressão de antígenos lak do MHC II e demonstrou um efeito de 6 a 8 vezes maior na ativação que o tratamento clássico com IFN- $\gamma$  recombinante e LPS *in vitro* (Grzegorzewski *et al.*, 1989), sugerindo que a SW possa funcionar como imunomodulador da resposta imune contra tumores. Em PBMCs de fêmeas penhas BALB/c tratadas com SW houve uma mudança significativa de resposta Th1/Th2 para um perfil de resposta Th1 (Hu *et al.*, 2015).

Devido a ação direta nas células tumorais descritas na literatura, e ao seu efeito imunomodulador, o tratamento com SW e a consequente inibição de α-manosidase II, pode parecer uma alternativa promissora na terapia de tumores cervicais, sendo assim buscamos avaliar experimentalmente seu efeito em modelos bem caracterizados em nosso laboratório.

#### 1.5 Mastócitos e Triptase

Os mastócitos são células imunes inatas, caracterizadas pela carga de mediadores inflamatórios, constituídos por uma ampla variedade de moléculas bioativas pré-formadas armazenadas em grânulos citoplasmáticos, que são liberadas ao encontrar os estímulos apropriados e têm um papel benéfico nas respostas imunológicas contra patógenos, incluindo helmintos, bactérias e vírus. Os mediadores derivados de mastócitos também participam de

processos fisiológicos nos tecidos, como cicatrização de feridas e reparo tecidual (Wernersson e Pejler, 2014), e em algumas condições patológicas a degranulação de mastócitos induzida por IgE desencadeia as reações de hipersensibilidade imediatas que desempenham um papel central na patogênese das doenças alérgicas (Frieri *et al.*, 2015). A ativação de mastócitos também é observada em muitos processos independentes de IgE, como a desgranulação induzida por trombina, complexos de IgG, neuropeptídios, anafilatoxinas derivadas de complemento (Yu, Y. *et al.*, 2016), bem como por ação de toxinas de animais, como por exemplo de aranhas do gênero *Loxoceles* (Rattmann *et al.*, 2008).

Mastócitos têm sido reconhecidos como um dos primeiros tipos celulares recrutados em muitos processos de desenvolvimento de tumores, especialmente em melanomas malignos, de mama e câncer de colorretal (CRC) (Ribatti *et al.*, 2010). Amplas evidências destacam que estes tipos celulares se acumulam predominantemente em torno de vários tipos de tumores, no limite entre tecidos malignos e saudáveis (Ranieri *et al.*, 2009; Mangia *et al.*, 2011).

A densidade de mastócitos é altamente correlacionada com o quadro de angiogênese tumoral tanto em tumores benignos (por exemplo, em quelóides) e em malignidades humanas (mastocitose sistêmica, câncer de cabeça e pescoço, câncer colo-retal, de pulmão, de pele) (Yano *et al.*, 1999; Ammendola *et al.*, 2013). Os mastócitos intervêm no processo de angiogênese através de vários fatores pró-angiogênicos clássicos, tais como VEGF, FGF-2, PDGF, interleucina-6 (IL-6), e fatores pró-angiogênicos não clássicos, tais como triptase e quimase, armazenados nos seus grânulos de secreção (Soucek *et al.*, 2007; Ribatti *et al.*, 2011) e liberados com a ativação destas células.

Particularmente, em câncer cervical, foi descrita por Utrera-Barillas e colaboradores (2010) uma forte correlação entre os mastócitos infiltrados e os vasos sanguíneos em lesões e carcinoma *in situ*. Em um modelo de camundongos transgênicos, onde os genes precoces de HPV16 são introduzidos em queratinócitos, (Coussens *et al.*, 1999) forneceram suporte experimental para a avaliação da participação dos mastócitos na progressão do carcinoma escamoso. Os mastócitos infiltram o estroma da frente invasiva dos carcinomas, próximo aos capilares. Sendo assim ativam mecanismos responsáveis pelo gatilho angiogênico. Quando

utilizaram animais deficientes de mastócitos, notaram a ausência deste gatilho, indicando que neste modelo, a infiltração de mastócitos na pele é necessária para a progressão tumoral.

Em células tumorais, a triptase liberada por mastócitos liga-se e cliva proteolíticamente receptores denominados PAR-2 (Cai *et al.*, 2014) (FIGURA 6). Ocorre então a ativação de cascatas de sinalização intracelulares, incluindo a mobilização de reservas de cálcio intracelular, fosforilação de PKC e ERK1/2 e ativação de NF-κB (Guo, D. *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2013), culminando no aumento da proliferação das células tumorais (Strouch *et al.*, 2010). Este estímulo de MAPK também leva um aumento na expressão VEGF pelas células tumorais, um potente fator angiogênico (Dutra-Oliveira *et al.*, 2012; Chang *et al.*, 2013). Outros fatores pró-angiogênicos tem sua expressão aumentada através da ativação de PAR-2, como COX-2 (Zhang *et al.*, 2012), IL-8 (Hjortoe *et al.*, 2004) e CXCL1 (Albrektsen *et al.*, 2007). Além disso, a ativação de PAR-2 foi relacionada com sobrevivência de células tumorais devido a sua capacidade de induzir proteínas antiapoptóticas e/ou modular vias de apoptose intrínsecas ou extrínsecas, como por exemplo, aumentando a expressão da proteína anti-apoptótica Bcl2 e diminuindo a expressão da proteína pró-apoptótica Bax (Wu *et al.*, 2013).


**Figura 6 - Sinalização mediada por PAR-2 e progressão tumoral.** Múltiplas vias de sinalização dependentes de proteína G, bem como vias ativadas por transativação de EGFR dependente de PAR-2 e sinalização de β-arrestina independente de proteína G, têm resultado em aumento da proliferação, sobrevivência, expressão de fatores angiogênicos e migração de células derivadas de tumor em resposta à ativação do PAR-2 (adaptado de Kularathna *et al.*, 2014).

As triptases são uma família de serino-proteases semelhantes a tripsina presentes em grandes quantidades nos grânulos de secreção de mastócitos humanos e animais (Trivedi e Caughey, 2010). Os genes da triptase humana estão agrupados no cromossomo 16p13.3 e compreendem cinco *locus*. TPSG1 codifica gama-triptase, TPSB2 codifica betall e betalll-triptases, TPSAB1 codifica alfa-triptase e betal-triptase, TPSD1 é responsável pela delta-triptase e TPSE1 codifica epsilon-triptase (Trivedi *et al.*, 2008). A triptase humana é considerada praticamente específica dos mastócitos, que podem conter grandes quantidades, até 35 pg por célula (Schwartz *et al.*, 1987). Os basófilos também contêm e liberam a triptase (Castells *et al.*, 1987), mas não representam contribuintes importantes para os níveis de triptase (Vitte, 2015). Sendo assim os mastócitos, e mais especificamente a triptase, constituem alvos potencialmente interessantes para interferência durante a progressão tumoral.

# 2. OBJETIVOS

## 2. OBJETIVOS

Tendo em vista o potencial tumorigênico das moléculas identificadas, citados anteriormente, os objetivos deste trabalho se embasam na caracterização funcional dos alvos moleculares,  $\alpha$ -manosidade II e Triptase, para terapia em modelo de câncer de cérvice.

Objetivos específicos:

- Caracterizar o papel do inibidor de  $\alpha$ -manosidase, Swainsonina, em terapia para tumores associados ao HPV, em células tumorais e no infiltrado inflamatório.

-Estudar a interação dos mastócitos com as células tumorais com o intuito de avaliar o seu papel na tumorigênese, sendo estas células fontes de altas concentrações de triptase.

# 3. MATERIAL E MÉTODOS

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### 3.1 Linhagens celulares

Foram utilizadas, principalmente, as seguintes linhagens celulares para a realização deste projeto: TC-1, células derivadas de epitélio pulmonar, transduzidas com vetor retroviral contendo os oncogenes E6 e E7 de HPV16 e Ha-ras (Lin *et al.*, 1996) e PT-18 (Pluznik *et al.*, 1984), linhagem de mastócito derivada de baço murino. Estas linhagens celulares foram doadas gentilmente pelo Dr. T-C Wu da Universidade Johns Hopkins e pela Dra. Eliana Faquim de Lima Mauro do Instituto Butantan, respectivamente. As linhagens foram cultivadas em meio RPMI suplementado com 10% Soro Fetal Bovino e mantidas a 37°C, em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>. Outras linhagens de câncer cervical como: HeLa, SiHa, Caski, SW750, C33A, foram cultivadas para obtenção de lisados celulares para *Western blotting*, bem como queratinócitos primários (PHK) e imortalizados (HACAT). Sendo que, estas linhagens citadas acima, tem origem ATCC. No caso específico da linhagem PT18, foi adicionado à cultura 10% de meio condicionado pela linhagem celular WEHI-2B, sendo IL-3 um dos fatores produzidos por estas células.

Culturas monocamadas de TC-1 ( $5x10^3$  células/poço) foram tratadas com concentrações variáveis de Swainsonina (0,5, 1 e 2 µg/mL de SW) (S9263, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) durante 3 dias para testar a citotoxicidade da droga. No final do período de incubação, as células foram colhidas e contadas para estimar o número de células e viabilidade, com de Azul de Trypan.

# 3.2 Animais

Para o modelo de crescimento tumoral subcultâneo foram utilizadas fêmeas RAG1-/-(B6.129S7- Rag1<sup>tm1Mom</sup>/J, Jackson Laboratories) e C57Black/6. Estas foram mantidas em condições spf (*specific pathogen free*) com água e ração *ad libdum* no biotério do Instituto de Ciências Biomédicas IV da USP.

#### 3.3 Modelo subcultâneo de indução de tumores TC-1

Para o experimento de caracterização do efeito da inibição de  $\alpha$ -manosidase II, foram inoculadas 10<sup>5</sup> células TC-1 em 100 µL de PBS suplementado com 1 mM de CaCl<sub>2</sub> e 0,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, subcutaneamente no dorso lateral de camundongos C57Black/6 fêmeas, no tempo zero. Quando os tumores atingiram aproximadamente 2 mm de diâmetro, nós iniciamos tratamento diário, intraperitoneal, com 4 mg/kg de Swainsonina ou PBS durante 7 dias. Após o início do tratamento as dimensões dos tumores foram mensuradas com auxílio de um paquímetro para a avaliação da cinética tumoral.

Semelhantemente o experimento *in vivo* de caracterização do papel de mastócitos na cinética de crescimento foi realizado, entretanto foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem C57Black/6 RAG1-/-. No primeiro grupo foram injetadas 10<sup>5</sup> células TC-1 (grupo controle) e no segundo uma co-cultura de TC-1 e PT-18 em 100 µL de PBS suplementado com 1 mM de CaCl<sub>2</sub> e 0,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, ambas na concentração de 10<sup>5</sup> células (na razão 1:1). Quando os tumores atingiram aproximadamente 2 mm de diâmetro, nós iniciamos tratamento diário, intraperitoneal, com 100 mg/kg de Cromolyn ou PBS durante 7 dias

Em ambos os experimentos os animais foram sacrificados quando os tumores atingiriam um tamanho próximo de 10 mm.

#### 3.4 Caracterização do perfil inflamatório dos animais

#### 3.4.1. Preparação das suspensões celulares

Após a extração, os baços foram dissociados mecanicamente em tampão MTH – Mouse Tonic Hanks (Hanks Salt Buffered Solution 1X com 15 nmol/L de HEPES pH 7,4, 0.5 U/mL de DNase e 5% de SFB). Seguido de tratamento com tampão hipotônico ACK (0,15 M de NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM de KHCO<sub>3</sub> e 0,1 mM de EDTA) para lise das hemácias. Para obtenção das suspensões de células dos tumores, estes foram submetidos à digestão com 1 mg/mL de Colagenase I/IV (Worthington Biochemical Corporation, EUA) em MTH, por aproximadamente 30 minutos, à 37°C, sob agitação de 1250 rpm em Thermomixer (Eppendorf, Alemanha). Por fim, todas as suspensões obtidas foram contadas em câmara de Neubauer e a viabilidade foi avaliada com a coloração do Azul de Trypan.

# 3.4.2 Citometria de fluxo

As células obtidas dos tumores e baços foram incubadas com *Fc block* por 15 minutos em gelo. Este anticorpo reconhece um epítopo compartilhado por CD16 (*Fc gama III receptor*) e CD32 (*Fc gama III receptor*), bloqueando ligações inespecíficas dos anticorpos usados. A seguir, foi realizada a marcação das células com diferentes painéis de anticorpos contra marcadores de superfície, observados nas tabelas abaixo:

# Tabela 1 – Painel de anticorpos utilizados para imunofenotipagem de tumores animais tratados com SW. Na tabela estão dispostos os fluorocromos, as populações de interesse e os fabricantes.

Anticorpo	Clone	População de interesse	Fabricante
anti-CD45 APC	30-F11	Leucócitos	BD Biosciences
anti-CD11b FITC	FAB1124F	Mielóides	R&D Systems
anti-F4/80 PECy5	BM8	Macrófagos	eBioscience
anti-Ly6C Pacific	AL-21	Monócitos	eBioscience
anti-Ly6G PECy7	1A8	Granulócitos	BD Biosciences

Tabela 2 – Painel de anticorpos utilizados para imunofenotipagem dos baços de animais tratados com SW. Na tabela estão dispostos os fluorocromos, as populações de interesse e os fabricantes.

Anticorpo	Clone	População de interesse	Fabricante
anti-CD3 APC	145-2C11	Linfócitos T	BD Biosciences
anti-CD11b FITC	FAB1124F	Mielóides	R&D Systems
anti-CD8 PE	53-6.7	Linfócitos T CD8 <sup>+</sup>	eBioscience
anti-Ly6C Pacific	AL-21	Monócitos	eBioscience
anti-Ly6G PECy7	1A8	Granulócitos	BD Biosciences

Tabela 3 – Anticorpos utilizados na caracterização dos marcadores de superfícies da linhagem celular PT18. As marcações foram realizadas separadamente. Na tabela estão dispostos os fluorocromos, as populações de interesse e os fabricantes.

Anticorpo	Clone	População de interesse	Fabricante
anti-CD45 APC	30-F11	Leucócitos	BD Biosciences
anti-CD11b FITC	FAB1124F	Mielóides	R&D Systems
anti-FcERI APCCy7	MAR-1	Mastócitos	BD Biosciences
anti-CD117 PE	Ack45	Mastócitos	eBioscience

Os anticorpos foram incubados durante 20 minutos com as suspensões celulares em gelo, então estas foram lavadas com MTH e ressuspendidas no mesmo para aquisição no citômetro de fluxo (FACSCANTO II). Para os experimentos de ciclo celular, as células foram fixadas e permeabilizadas com 2% de formaldeído e então tratadas com DAPI na concentração de 10 µg/mL, após a marcação de superfície, seja com anti-CD45 APC (para o ensaio de ciclo celular em tumores tratados com SW), seja com anti-FcERI APCCy7 (para os ensaios de ciclo celular de esferóides TC-1/PT18). Quando usado para a finalidade de viabilidade celular, como no caso da cinética dos esferóides TC-1/PT18, a concentração empregada foi de 0,1 µg/mL. Ambos os protocolos de ciclo celular e de marcação de viabilidade celular foram realizados conforme o descrito por (Gordon *et al.*, 2003). No ensaio para avaliar a quantidade de células endoteliais em tumores de animais RAG1-/- inoculados com TC-1 e TC-1/PT18, foi utilizado o anticorpo anti-CD31 biotinilado, e a marcação com estrepto-avidina PECy7.

As análises dos experimentos de citometria de fluxo foram realizadas no software FlowJo V10, com diferentes estratégias para as diferentes finalidades, mas partindo sempre da seleção das populações com os parâmetros SSC-A por FSC-A e a exclusão de agregados celulares pelos parâmetros FSC-H e FSC-A.

#### 3.4.3 Cell Sorting

As células foram selecionadas usando esferas metálicas conjugadas com anticorpo anti-CD45 por 15 minutos em gelo e submetidas para a seleção positiva do infiltrado inflamatório dos tumores em colunas de seleção magnéticas (Miltenyi Biotech). Após as 3 lavagens com MTH, as células foram recuperadas e contadas para serem utilizadas nos ensaios de atividade de iNOS e Arginase. Desta mesma forma foram obtidas as células CD11b<sup>+</sup> positivas do baço, utilizadas no ensaio de supressão de linfócitos T.

### 3.4.4 Atividade de iNOS e Arginase

Células do infiltrado inflamatório dos tumores e os macrófagos peritoneais (PM) foram tratadas com 100 U/mL IFN-γ (Peprotech) e 10 ng/mL LPS e/ou 2 mg/mL de Swainsonina, e incubadas por 72h, a 37°C, em placas de cultura de 96 poços em RPMI. O sobrenadante foi utilizado para o ensaio de atividade de iNOSII. O método utilizado para a quantificação de iNOSII consiste na detecção de nitrito, estado detectável do óxido nítrico (NO), pelo teste de Griess (Hibbs *et al.*, 1988), no qual as amostras são colocadas em contato com o reagente, gerando uma reação colorimétrica, lida em comprimento de onda 540 nm em espectrofotômetro.

Para a quantificação da atividade da enzima arginase, nós quantificamos a concentração de uréia, um dos produtos da reação catalisada pela arginase a partir de arginina, através de um método colorimétrico. A enzima presente nos lisados celulares foi ativada pelo aquecimento do lisado em 55-60°C por 10 minutos e a reação de hidrólise de seu substrato L-arginina foi feita pela incubação da primeira proteína a 37°C por uma hora e interrompida pela solução ácida (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>:H<sub>2</sub>O, 1:3:7). Finalmente, foi adicionada α-isonitrosopropiofinona (9% em etanol absoluto), e as reações foram incubadas a 100°C por 45 minutos e depois incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente. A concentração de ureia foi determinada então por leitura das amostras e curva padrão em espectrofotômetro a 550 nm. Alíquotas do lisado das células foram utilizadas para a quantificação de proteínas por meio do ensaio de Bradford, normalizando a quantidade de proteínas em relação aos dois parâmetros colorimétricos. O resultado da quantificação de ambas as enzimas foi normalizado pela concentração de proteína e partir disso, foi feita uma razão dos valores obtidos pelo respectivo grupo controle.

#### 3.4.5 Ensaio de inibição da proliferação de linfócitos T por MDSCs

Células de linfonodos de animais *naive* foram marcadas com corante vital Violet Proliferation Dye 450 (BD Biosciences, Carlsbad, CA) e foram plaqueadas 2x10<sup>5</sup> células/poço em placas de 96 poços e tratadas com uma combinação de 10 ng/ml de PMA e 1 mg/ml de ionomicina (PI). Esplenócitos CD11b<sup>+</sup> foram adicionados às culturas, na proporção de 4 linfócitos/célula mielóide. Após 4 dias de incubação, as células foram colhidas, marcadas com anticorpos anti-CD4 e anti-CD8 conjugados com fluoróforos e analisadas por citometria de fluxo, utilizando um FACSCanto (BD Biosciences, Carlsbad, CA), onde, pelo menos 30.000 eventos foram adquiridos.

#### 3.5 Western blotting

Inicialmente foram preparados os lisados celulares. As linhagens de células tumorais derivadas de tumores do colo uterino, C33A (HPV-), HeLa (HPV18) e SiHa (HPV16), HaCat (linhagem de queratinócitos imortalizados), PHK (queratinócitos primários), TC-1 e PT18, foram cultivadas nas condições já descritas. O lavado peritoneal foi obtido com a injeção de 5 mL de PBS na cavidade peritoneal de camundongos C57Black/6. Sendo assim, 4.10<sup>6</sup> células de cada linhagem foram diluídas em 100 μL de tampão RIPA (150 mM cloreto de sódio, 1% Triton X-100, 0,5% desoxicolato de sódio, 0,1% SDS, 50 mM Tris, pH 8,0) com coquetel de inibidores de proteases em concentração indicada pelo fabricante (Sigma, EUA), e agitadas no vórtex em velocidade alta. As células foram incubadas por 30 minutos em gelo, centrifugadas por 5 minutos a 12.000 rpm e o sobrenadante foi utilizado para dosagem de proteína pelo ensaio de Bradford. Tendo as concentrações de cada lisado, foram adicionadas 50 µg/µL no gel de poliacrilamida 10% e estes foram submetidos à separação por SDS-PAGE em condições redutoras como descrito por Laemmli (1970). O lisado de MFC7 (linhagem de câncer de mama) foi utilizado como controle negativo do ensaio, doado pela ABCAM (fabricante do anticorpo anti-triptase). Ao fim da corrida, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (GE Heathcare, EUA), utilizando o aparato em sistema úmido (BioRad Laboratories, EUA), sob corrente constante de 150 mA em tampão de transferência (Tris 250 mM, pH 8,3; Glicina 192 mM; metanol 20% v/v), como descrito por Towbin e colaboradores (1979). Uma vez feita a transferência, a membrana foi corada com Ponceau S (Sigma-Aldrich, EUA), seguida de bloqueio com solução de 10% de leite desnatado (Nestlé, Brasil) em PBS 10mM, por 1 horas a temperatura ambiente, sob agitação.

Após o bloqueio foi realizado o *Immunoblotting*, onde a membrana foi submetida à imunodetecção de triptase com o anticorpo monoclonal EPR9522 (Abcam, Reino Unido) na diluição de 1:2000 em solução de bloqueio. Após a incubação overnight à 4°C, sob agitação, a membrana foi lavada por 3 vezes de 5 minutos cada, com PBS-Tween 20 a 0,05% (Synth, Brasil). Uma vez lavada, a membrana foi incubada com anti-IgG de coelho acoplado com HRP (Cell Signling Technology, EUA) na diluição de 1:3000, por 1 hora, à temperatura ambiente, sob agitação. A revelação foi feita com Amershan ECL (GE Healthcare, EUA) e capturada no G-BOX.

#### 3.6 Avaliação da expressão de Triptase pela linhagem PT18 por Imunofluorescência

Células PT18 (4.10<sup>4</sup>) foram sedimentadas em lâminas através de *Cytospin*, foram fixadas com 1% de formaldeído, permeabilizadas com metanol, lavadas com PBS e bloqueadas com PBS com 5% de SFB, 0.5% Tween e anticorpo *Fc block* (1: 100) por 30 minutos. As células foram então marcadas com anticorpo anti-triptase AA1 (Abcam, Reino Unido) de camundongo (1:100) por 30 minutos. Após 3 lavagens com PBS, foi aplicado o anticorpo secundário, *anti-mouse* IgG Alexa 488 por 30 minutos. Foram feitas 3 lavagens e as lâminas foram finalizadas com meio de montagem contendo DAPI.

#### 3.7 Cultura de esferoides tumorais

Para a geração dos esferoides de TC-1, foram cultivadas 5.10<sup>3</sup> ou 15.10<sup>3</sup> células sobre uma cama de agarose 1% em placas de 96 poços por 24 horas em meio RPMI/SFB 10%. A adição das células PT18 foi realizada de duas formas diferentes, diretamente na formação do esferoide com a TC-1, ou alternativamente no segundo dia. Ambas as condições na proporção 1:1 de células. O ensaio foi realizado na presença e na ausência de IL-3 recombinante de camundongo (Invitrogen, EUA) a 10 ng/mL, sendo este fator importante para a manutenção da linhagem celular de mastócitos PT-18.

#### **3.8 Ensaio de detecção da atividade de β-hexosaminidase de mastócitos**

No terceiro dia de cultura dos esferoides, os controles positivos receberam um tratamento com veneno de *L. gaucho* (30 ug/poço) por uma hora. Após a incubação o sobrenadante foi transferido para poços vazios e o *pellet* restante foi lisado com uma solução de 0,5% de Triton X-100. Então foi adicionado o substrato (1.3 mg/ml) em toda a placa e esta foi incubada por 16 horas à 37°C. No dia seguinte o ensaio foi revelado com solução Glicina pH 2.8 e a D.O. foi lida a 405 nm. A porcentagem de desgranulação foi determinada através da razão das densidades ópticas dos sobrenadantes e dos lisados da cultura.

### 3.9 Cinética de crescimento dos esferoides tumorais com mastócitos

Os esferoides previamente preparados, foram submetidos à digestão com 1 mg/mL de Colagenase I/IV (Worthington Biochemical Corporation, EUA) e 10% de acutase (Invitrogen, EUA) em MTH, por uma hora, à 37°C, sob agitação de 1250 rpm em Thermomixer (Eppendorf, Alemanha). Uma alíquota de 10 µL das suspensões obtidas foi usada para contagem de células em câmara de Neubauer. O restante foi utilizado para marcação com anticorpo anti-FcERI para quantificar os mastócitos por FACS e desta forma quantificar as células TC-1 das co-culturas também. Adicionalmente, estas células foram marcadas com DAPI para duas finalidades, ciclo celular e viabilidade, como descrito no item 3.4.2.

#### 3.10 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada por análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey para comparações múltiplas ou pelo teste t de Student para distribuição normal e apenas duas variáveis. Sendo consideradas significantes as diferenças cujas as probabilidades de erro forem menores que 5% (p<0.05).

# 4. RESULTADOS

#### 4. RESULTADOS

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DA α-MANOSIDASE EM TUMORES ASSOCIADOS AO HPV

Em um trabalho anterior de nosso grupo, foi realizado o procedimento de *Biopanning* utilizando uma biblioteca comercial de *Peptide phage display* com 7 resíduos de aminoácidos e linhagens celulares derivadas de cânceres cervicais, HeLa e SiHa. Foram identificadas sequências peptídicas que exibiram diferentes níveis de enriquecimento após 3 etapas de seleção. O sequenciamento mostrou 71,4 a 100% de similaridade com a  $\alpha$ -manosidase. As  $\alpha$ -manosidases são expressas no retículo endoplasmático e nos lisossomos, onde desempenham um papel na síntese de glicoproteínas que afetam diretamente na função ou na estabilidade (Rose, 2012). Estivemos particularmente interessados no papel potencial da  $\alpha$ -manosidase no estroma tumoral, devido à sua expressão por macrófagos, e os dados mostram que o bloqueio farmacológico desta enzima com Swainsonina (SW) pode modular o fenótipo dos macrófagos (Chen *et al.*, 2011). Importante ressaltar que a sequência foi identificada como sendo  $\alpha$ -manosidase, isto significa que as moléculas que se ligam a esta enzima, provavelmente substratos, devem ser abundantes nas células tumorais.

A expressão de  $\alpha$ -manosidase em lesões cervicais e câncer cervical foi então investigada. Observa-se que os tecidos cervicais expressam  $\alpha$ -manosidase, e que a expressão líquida foi maior em lesões de alto grau e câncer em comparação com a mucosa normal. Isto se deve, provavelmente, ao aumento do número de células que expressam a enzima, incluindo leucócitos presentes no estroma tumoral, em vez de uma maior expressão proteica por célula (FIGURA 4B). Sendo assim, levantamos a hipótese de que a atividade da  $\alpha$ -manosidase pode ser importante para a progressão de tumores cervicais.

# 4.1.1 α-manosidase é expressa nos tumores TC-1, entretanto o tratamento com Swainsonina não tem efeito na proliferação de células tumorais *in vitro*

A inibição da  $\alpha$ -manosidase com o inibidor farmacológico, Swainsonina (SW), demonstrou causar efeitos antitumorais, seja inibindo a metástase ou o próprio crescimento do tumor (Yu, X. *et al.*, 2016; Ma *et al.*, 2018). Decidimos testar se o uso de SW poderia inibir a proliferação de

linhagens câncer cervical e o crescimento do tumor. O laboratório de imunomodulação vem trabalhando com o modelo tumoral experimental TC-1 há muitos anos, e a maior vantagem dessa linhagem, além de expressar HPV16 E6 e E7, é que é isogênica para camundongos C57Black/6 e, portanto, pode ser testada em um contexto imunocompetente.

Primeiramente, extraímos tumores TC-1 e depois separamos as células CD45<sup>+</sup> do resto das células tumorais e avaliamos a expressão de  $\alpha$ -manosidase em ambos os compartimentos. Como mostrado na figura 7A, ambas as células CD45<sup>-</sup> e CD45<sup>+</sup> expressam a  $\alpha$ -manosidase *in vivo*. Este resultado concorda com a observação anterior de que as células do estroma dos tumores do colo do útero expressavam  $\alpha$ -manosidase (FIGURA 4A). Sendo assim, testamos se o inibidor de  $\alpha$ -manosidase (SW) poderia interferir na proliferação de células TC-1 *in vitro*. Entretanto, não detectamos alteração na viabilidade ou proliferação destas células, como observado na figura 7B.



Figura 7 - O tratamento com Swainsonina não inibe a proliferação de células tumorais *in vitro*. (A) As suspensões de células foram obtidas de tumores TC-1 crescidos em camundongos C57Black/6 e extraídos quando atingiram 1 cm de diâmetro. Os leucócitos foram separados das outras células por seleção positiva utilizando esferas metálicas conjugadas à anti-CD45. Ambas as populações de células foram lisadas para ensaio de *western blotting* e detecção de  $\alpha$ -manosidase e  $\beta$ -tubulina. (B) Curva dose-resposta de células TC-1 tratadas durante 3 dias com concentrações indicadas de SW.

#### 4.1.2 A Swainsonina modula parcialmente os macrófagos associados ao tumor

Como mostrado na figura 10 e já demonstrado anteriormente (Lepique *et al.*, 2009), a maioria das células CD45<sup>+</sup> dos tumores TC-1 são macrófagos. Portanto, isolamos os macrófagos associados ao tumor (TAM) para testar se a inibição de  $\alpha$ -manosidase poderia modular seu fenótipo. Comparando macrófagos tumorais com macrófagos residentes peritoneais (PM), observamos que a SW não teve efeito, isoladamente ou em combinação com o tratamento com LPS e IFN- $\gamma$ , na atividade de Arginase. Entretanto podemos observar uma pequena, mas significativa, modulação dos macrófagos tumorais na atividade de iNOS quando tratados apenas com SW (FIGURA 8A). Arginase e iNOS são marcadores clássicos de fenótipo M2 e M1 de macrófagos, respectivamente.

Em relação à produção de citocinas, que é uma característica essencial do microambiente tumoral, observamos que o tratamento combinado com LPS e IFN- $\gamma$  (LI) levou a um aumento significativo na secreção de IL-10 pelos TAM, que foi neutralizado pela SW. O mesmo foi observado com IL-6, em que a expressão de IL-6 foi induzida por LI em TAM, mas o co-tratamento com SW contrabalançou seu efeito (a barra indica a diferença entre TAM tratado com LI e LI mais SW). Observamos também que CCL2, que foi secretada pelos TAM, como descrito anteriormente (Stone, Rossetti, Lima, *et al.*, 2014), apresentou uma concentração significativamente menor quando as células foram tratadas com uma combinação de SW e LI. CCL2 é importante para o recrutamento de monócitos e modulação de macrófagos para um viés M2 (Pahler *et al.*, 2008; Sierra-Filardi *et al.*, 2014). Portanto, a inibição da secreção de CCL2 pode ser um efeito interessante da SW em tumores. Finalmente, observamos que o tratamento com LI induziu secreção de IFN- $\gamma$  por TAMs, potencializado pela ação da SW (FIGURA 9B). Estes resultados indicaram que o SW não era um forte modulador do fenótipo dos macrófagos, mas poderia suprimir algumas características importantes da TAM, como a ativação induzida pela secreção de IL-10 e CCL2 (Lepique *et al.*, 2009).





# 4.1.3 O tratamento de camundongos com o inibidor de $\alpha$ -manosidase II (SW) potencializa o crescimento tumoral

Embora a SW não tenha mostrado efeito direto na proliferação de células tumorais, os resultados descritos acima nos levaram a investigar se a SW poderia ter algum efeito no crescimento do tumor, principalmente através da modulação do microambiente tumoral. Dados anteriores do laboratório de Imunomodulação mostram que TAM pode inibir respostas de células T anti-tumorais (Lepique *et al.*, 2009). Sendo assim, nosso racional foi que a modulação do

fenótipo dos macrófagos poderia inibir o crescimento do tumor. Para testar essa hipótese, usamos o modelo de indução de tumores murinos com células TC-1 e tratamos os camundongos com SW para observar o crescimento do tumor. Após o tratamento, ficamos surpresos ao observar que tumores em camundongos tratados cresceram significativamente mais rápido que tumores em camundongos controle (PBS) (FIGURA 9).



**Figura 9 – Cinética de crescimento tumoral.** Camundongos fêmeas C57Bl/6 receberam a injeção de 10<sup>5</sup> células TC-1 e quando os tumores se apresentaram palpáveis, foi iniciado o tratamento diário com 4 mg/kg SW ou PBS, durante 7 dias consecutivos. Os dados são representados em gráficos *box-plots* e as linhas tracejadas indicam a variação no crescimento do tumor nos dias 14 e 21 após a injeção de células tumorais entre os grupos tratados com SW e PBS. Os gráficos demonstram o resultado de 3 experimentos com n=5 animais por grupo. Os resultados foram comparados pelo teste U de Mann-Whitney, com valor de p indicado.

# 4.1.4 Tumores de animais tratados com SW recrutam menos infiltrado inflamatório, composto principalmente de células mielóides, que os tumores controle

Com o intuito de investigar o motivo pelo qual a droga potencializou o crescimento tumoral, fomos investigar o infiltrado inflamatório dos tumores do grupo SW e PBS. Após o processamento dos tumores, as suspensões de células obtidas foram utilizadas para o ensaio de imunofenotipagem por citometria de fluxo. Curiosamente, houve uma inibição significativa no recrutamento de células para o microambiente tumoral em animais tratados com SW (FIGURA 10). Embora não tenhamos testado a concentração de CCL2 em animais tratados com SW, este resultado corrobora com a observação de que o SW pode diminuir a secreção de CCL2 pelos TAM, reduzindo o recrutamento de células para o microambiente tumoral. O tratamento com SW reduziu significativamente também as células mielóides (CD11b<sup>+</sup>) negativas para o marcador de macrófagos F4/80.



**Figura 10 - Frequência de leucócitos infiltrantes tumorais determinada por citometria de fluxo.** Após dissecção, os tumores foram digeridos com colagenase e as suspensões de células marcadas com anti-CD45, anti-CD11b e anti-F4/80. À esquerda um representativo da análise realizada no programa FlowJo (média±SEM) e à direita a representação gráfica da quantificação desta fenotipagem. A análise estatística foi realizada por Teste t.

### 4.1.5 A SW aumenta significativamente a leucocitose no baço

Já foi mostrado anteriormente que os tumores TC-1, bem como tumores cervicais em pacientes, exibem efeitos sistêmicos nas células do sistema imunológico (Mabuchi *et al.*, 2014; Stone, Rossetti, Lima, *et al.*, 2014; Alvarez *et al.*, 2017). Deste modo, na busca de evidências dos efeitos sistêmicos causados pelo estabelecimento do tumor e pelo tratamento com SW, os baços dos animais foram dissociados mecanicamente, as hemácias foram lisadas e a suspenção de células nucleadas resultante foi utilizada para contagem em câmera Neubauer e para imunofenotipagem. Houve um aumento significativo na celularidade, evidenciando possível esplenomegalia nos animais tratados com SW. Na imunofenotipagem foram observadas diferenças nos compartimentos linfoide e mielóide nas células do baço de animais tratados em relação ao grupo controle, observadas na figura 11. Podemos observar na figura 11B uma diminuição de células T CD8<sup>+</sup>, sugerindo uma diminuição de células citotóxicas. Em relação às populações mielóides, ambos os grupos portadores de tumor tiveram frequências significativamente maiores de células CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>++</sup> Ly6G<sup>+</sup> no baço do que os controles *naive*. Entre os camundongos portadores de tumor tratados com SW e PBS, observou-se que os animais tratados com SW tinham uma frequência significativamente maior de esplenócitos CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>++</sup> (FIGURA 11C). Estas populações mielóides foram descritas na literatura como células mieloderivadas supressoras monocíticas ou granulocíticas (Tcyganov *et al.*, 2018).



**Figura 11 - Fenotipagem do baço de camundongos** *naive* e com tumor tratados com SW ou com **veículo.** (A) Os baços dos camundongos foram mecanicamente dissociados e as supressões celulares foram contadas na câmara de Neubauer. As suspenções de células dos baços de camundongos portadores de tumor (tratados com SW ou PBS) ou *naive* foram marcadas com anticorpo anti-CD8 (B), com anti-CD11b, anti-Ly6C e anti-Ly6G (C) e adquiridas no citômetro de fluxo. À esquerda um representativo da análise realizada no programa FlowJo (média±SEM) e à direita a representação gráfica da quantificação da fenotipagem. Dados referentes a 3 experimentos independentes com n=3 animais por grupo. A análise estatística foi realizada por One-Way ANOVA e Tukey.

Interessantemente, em camundongos *naive*, o tratamento com SW diminuiu a frequência geral de células CD11b<sup>+</sup>, mas nenhuma mudança nas subpopulações de Ly6C e Ly6G foi observada (FIGURA 12B). Mais que isso, com o tratamento ocorre um aumento de células T CD8<sup>+</sup> no baço, diferentemente do observado nos animais com tumor (FIGURA 12A). Estes

resultados mostram que em camundongos portadores de tumor, a SW potencializou os efeitos sistêmicos desencadeados pelo tumor, entretanto não tem efeito isoladamente.



**Figura 12 - Fenotipagem do baço de camundongos livres de tumor tratados com SW e com veículo.** As suspenções de células dos baços foram preparadas por dissociação mecânica e foram marcadas com anticorpo anti-CD8 (A), com anti-CD11b, anti-Ly6C e anti-Ly6G (B) e adquiridas no citômetro de fluxo. À esquerda um representativo da análise realizada no programa FlowJo (média±SEM) e à direita a representação gráfica da quantificação da fenotipagem. Dados referentes a um experimento com n=3 por grupo. A análise estatística foi realizada por Teste t, onde p<0.05.

#### 4.1.6 O tratamento com SW promove a supressão de células T através de MDSC

Tendo em vista que o tratamento com SW coopera com o tumor para o acúmulo de células mielóides no baço dos animais com o fenótipo potencialmente supressor, resolvemos comprovar se tais células realmente apresentam atividade supressora sob a proliferação de linfócitos T. Para isto as células CD11b<sup>+</sup> do baço dos animais foram enriquecidas por seleção magnética e colocadas em co-cultivo com linfócitos T previamente marcados e estimulados. E o efeito inibitório das células mielóides foi avaliado por citometria de fluxo. Observamos que esplenócitos do grupo tratado com SW inibiram significativamente a proliferação de células T em comparação com os outros grupos (FIGURA 13A). Entretanto, esplenócitos de camundongos *naive* tratados com SW aumentaram a proliferação de células T CD8<sup>+</sup>, ao invés de inibir (FIGURA 13B). Esses resultados indicaram que a SW potencializa o ambiente supressivo causado pelos tumores TC-1, aumentando a população de células mielóides supressoras.





# 4.1.7 A imunossupressão exacerbada causada pelo tratamento terapêutico com SW pode estar relacionada com alterações na ativação de vias de sinalização intracelulares nos esplenócitos

As atividades de STAT3 e NF-κB foram associadas a diferentes fenótipos de leucócitos e respostas antitumorais (Wang *et al.*, 2014). Sendo assim foram preparados lisados celulares de esplenócitos de camundongos *naive* ou portadores de tumor tratados com SW ou PBS e estes foram testados por *western blotting* para ambas as vias de sinalizações citadas acima. Esta caracterização mostrou que houve maior expressão de fosfo-STAT3 nos esplenócitos de camundongos portadores de tumor em relação aos *naive*, independentemente do tratamento com SW. Por outro lado, a expressão de fosfo-p65 NF-κB nos esplenócitos foi menor em camundongos portadores de tumor tratados com SW, do que em camundongos com tumor tratados com veículo, e mesmo inferior a expressão observada em esplenócitos de camundongos *naive* (FIGURA 14).



**Figura 14** - *Western blotting* mostrando a expressão de fosfo (p) e total de NF-κB e STAT3 em **lisados de baço.** A β-actina foi usada como controle. Preparações de baço de 3 camundongos diferentes por grupo foram usadas neste experimento. O gráfico à direita mostra as razões de expressão calculadas da seguinte forma: o valor densitométrico de cada banda foi dividido pelo respectivo valor de densitometria de β-actina para normalizar a expressão de cada uma das proteínas; os valores normalizados de p-NF-κB foram divididos por valores normalizados de NFκB, e o mesmo foi feito com STAT3.

### 4.2 CARACTERIZAÇÃO DA TRIPTASE DE MASTÓCITOS EM TUMORES ASSOCIADOS AO HPV

#### 4.2.1 Avaliação da expressão de Triptase pela linhagem celular PT-18

Os mastócitos estão descritos na literatura como células amplamente distribuídas e encontradas em diversos tecidos e de diferentes origens. E podem ser classificados como produtores de Triptase, produtores de Quimase ou produtores de ambas as enzimas.

Para que se tornasse viável a caracterização do papel da triptase na progressão tumoral, fez-se necessário a criação de um modelo de estudo. Resolvemos utilizar a linhagem celular murina PT18 para avaliar os efeitos da interação dos mastócitos com as células tumorais, tanto *in vitro*, como *in vivo*. Para isto, o primeiro fator que fomos investigar foi a expressão de Triptase, nosso alvo em questão, por esta linhagem. Duas técnicas foram empregadas, *Western Blotting* (FIGURA 15) e *Imunofluorescência* (FIGURA 16).



**Figura 15- Avaliação da expressão de triptase pela linhagem celular PT18.** *Western blotting* para triptase em linhagens de células tumorais derivadas de tumores do colo uterino, C33A, HeLa e SiHa, de câncer de mama MFC7, de queratinócitos imortalizados HaCat, queratinócitos primários PHK, células tumorais TC-1, lavado peritoneal de camundongos C57Black/6 (per) e células PT-18.

Por *Western Blotting*, a expressão da Triptase foi evidenciada por uma banda específica com aproximadamente 30 KDa, que apareceu apenas nas amostras de lisados de PT18 e do lavado peritoneal de camundongos, como era de se esperar, já que este contém mastócitos entre outras células.



**Figure 16- Imunodetecção de triptase por imunofluorescência.** Células PT18 foram sedimentadas em lâminas através de *Cytospin*, foram fixadas com formaldeído, permeabilizadas com metanol e bloqueadas com PBS com SFB e anticorpo *Fc block*. As células foram então marcadas com anticorpo anti-triptase e em seguida com anticorpo secundário, *anti-mouse* IgG Alexa 488. As lâminas foram finalizadas com meio de montagem contendo DAPI. (A) Expressão de triptase pelas células PT18. (B) Controle negativo, apenas o anticorpo secundário sem o primário anti-triptase.

Através da imunofluorescência foi possível visualizar a co-localização da expressão da Triptase, que como o esperado aparece em grânulos citoplasmáticos. Em azul fica evidenciado o núcleo das células.

#### 4.2.2 Avaliação dos marcadores de superfície da linhagem PT-18 por citometria de fluxo

Ainda visando a padronização dos experimentos *in vitro*, foi avaliada a expressão de marcadores de superfície para mastócitos pela PT18, na busca de um bom marcador que pudesse diferenciar estas células das células tumorais (TC-1) em ensaios de co-cultura. Como o esperado esta célula se mostrou competente a expressar dois marcadores típicos de mastócitos, como o receptor de IgE – FcERI (FIGURA 17A) e c-kit – CD117 (FIGURA 17B). Como o esperado, estas células não apresentaram expressão do marcador comum de células mielóides CD11b (FIGURA 17C). Curiosamente, esta linhagem demonstrou uma expressão heterogênea do marcador comum para leucócitos CD45 (FIGURA 17D).



**Figura 17 – Expressão de marcadores de superfície pela linhagem PT18.** Foram marcadas 10<sup>6</sup> células com os anticorpos separadamente nas suas devidas titulações por 20 minutos em gelo. Após isso, foram lavadas e adquiridas no citômetro de fluxo (FACSCANTO II). A análise foi realizada no software FlowJo. (A) Expressão de FcERI. (B) Expressão de CD117. (C) Expressão de CD11b. (D) Expressão de CD45. Em rosa estão representadas as células não marcadas e em azul marcadas com o anticorpo indicado. Representativo de um experimento realizado em triplicatas por marcador.

### 4.2.3 Avaliação do perfil de expressão de receptor PAR-2 por linhagens celulares

Ainda na busca da padronização de um modelo de estudo da interação mastócito/célula tumoral, decidimos investigar o perfil de expressão do receptor PAR-2, cujo o qual a triptase atua. Sendo assim realizamos um ensaio de *Western blotting* diferentes linhagens e em diferentes estágios de tumorigênese, contendo PHK (queratinócito primário), HACAT (queratinócito imortalizado) e células transformadas HPV<sup>+</sup> e HPV<sup>-</sup> (FIGURA 18).

A linhagem TC-1 murina, modelo bem caracterizado e muito utilizado em nosso laboratório, apresentou um nível considerável de expressão do receptor se mostrando ser uma candidata promissora na padronização deste modelo de estudo.

Interessantemente, os queratinócitos primários apresentaram o menor nível de expressão dentre as células testadas, enquanto que os queratinócitos transformados e imortalizados apresentaram maior nível de expressão. Isto poderia sugerir um possível papel do receptor no processo de imortalização celular.



**Figura 18** - **Avaliação da expressão de PAR-2 por queratinócitos.** *Western blotting* para o receptor PAR-2 em linhagens de células tumorais derivadas de tumores do colo uterino, C33A (HPV-), HeLa/SW756 (HPV18), SiHa/Caski/TC-1 (HPV16), e de câncer de mama MFC7. O gráfico à direita mostra as razões de expressão calculadas da seguinte forma: o valor densitométrico de cada banda foi dividido pelo respectivo valor de densitometria de β-tubulina para normalizar a expressão de cada uma das proteínas.

# 4.2.4 Padronização do modelo de esferóides de co-cultura de PT18 e TC-1 *in vitro* para avaliar o papel da Triptase no crescimento tumoral

Foram estabelecidas oncoesferas, culturas tridimensionais de células tumorais, para o estudo da interação entre mastócitos e células tumorais. Este modelo se torna interessante, ao passo que mimetiza diferentes características naturais dos tumores, como aumento da expressão

de genes cujos produtos estão envolvidos no metabolismo glicolítico e formação de centro necrótico (Wenzel *et al.*, 2014). O protocolo foi estabelecido e utilizado com diversas variações para diferentes finalidades, como por exemplo a adição dos mastócitos a esferoides pré-formados de TC-1, ou a adição conjunta no momento da geração dos esferoides. As quantidades de células também foram mexidas na busca de uma melhor condição. Além disso, os esferoides foram feitos na presença ou ausência de IL-3 recombinante, devido a necessidade desta citocina para manutenção das células PT-18.

Na figura 19A podemos observar a aparência dos esferóides de TC-1, em 19B a adição de PT18 a esferóides de TC-1 previamente montados e por fim em 19C apenas a linhagem PT18 que foi utilizada como controle dos experimentos.



**Figura 19- Esferóides de TC-1.** Para a geração dos esferóides de TC-1, as células foram cultivadas 5.10<sup>3</sup> ou 15.10<sup>3</sup> células TC-1 sobre um colchão de 1% de agarose em placas de 96 poços por 24 horas em meio RPMI/SFB 10%. No segundo dia foram adicionadas as células PT18 na proporção 1:1. (A) Esferóide de TC-1 após 72 horas de cultivo. (B) Esferóide de TC-1 com PT18 após 72 horas de cultivo. (C) Cultura de PT18 apenas com 48 horas com IL-3 recombinante.

Para verificar se os mastócitos são capazes de migrar para o interior da esfera de TC-1, células da linhagem PT18 foram marcadas com CFSE e foram adicionadas aos esferoides de TC-1 previamente formados. Fotos do campo claro e fluorescente foram tiradas e sobrepostas. O que se pode observar é que os mastócitos infiltram os esferóides de TC-1, sugerindo uma interação entre estes dois tipos celulares (FIGURA 20).



**Figura 20 - Ensaio de infiltração de mastócitos (PT18) nos esferóides tumorais de TC-1.** Os mastócitos foram marcados com CFSE conforme as instruções do fabricante. Parte destas células foi adquirida no FACSCanto II para comprovar a homogeneidade da marcação e analisadas no software FlowJo (esquerda). Em rosa as células não marcadas e em azul as células marcadas com CFSE. Após isto, 5.10<sup>4</sup> foram adicionadas por poço contendo o esferóide de TC-1 pré-formado. As fotos dos campos claros e fluorescentes foram tiradas no microscópio Nikon Eclipse Ti-E invertido após 24 de incubação a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. A sobreposição das imagens foi realizada no software *ImageJ* (direita).

# 4.2.5 Ensaio de desgranulação de PT18 em esferóides de co-cultura com TC-1

Para que fosse possível padronizar um modelo para verificar o papel da triptase na progressão tumoral, a desgranulação destes mastócitos precisava ocorrer de maneira efetiva. Inicialmente pensamos em um modelo de secreção de triptase que utilizasse a sensibilização destes mastócitos com anticorpos IgG. Entretanto verificamos que a célula tumoral é capaz de ativar o mastócito por algum mecanismo independente da sensibilização com anticorpos. Neste experimento os esferoides foram gerados novamente na razão 1:1 de TC-1/PT18, incubados por 72 horas e a detecção de β-hexosaminidase foi realizada por teste colorimétrico (FIGURA 21).



**Figura 21 – Desgranulação independente de anticorpos.** Neste ensaio a geração dos esferóides TC-1 foi realizada já na presença ou ausência de PT18, o controle negativo foi apenas PT18. No terceiro dia, os controles positivos receberam um tratamento com veneno de *L. gaucho* (30 ug/poço) por uma hora. Após a incubação o sobrenadante foi transferido para poços vazios e o *pellet* restante foi lisado com uma solução de 0,5% de Triton X-100. Então foi adicionado o substrato (1.3 mg/ml) em toda a placa e esta foi incubada por 16 horas à 37°C. No dia seguinte o ensaio foi revelado com solução Glicina pH 2.8 e a D.O. foi lida a 405 nm. Média de dois experimentos realizados com triplicata amostral.

Utilizando então o mesmo protocolo, foi averiguado em quanto tempo da co-cultura o fenômeno de desgranulação começa a acontecer. O resultado deste experimento pode ser verificado na figura 22. De fato, a cultura demora 7 horas para que o efeito da liberação dos grânulos da PT18 comece a acontecer. Possivelmente este deve ser o tempo que as células tumorais necessitam para condicionar o meio de cultivo.



**Figura 22** - **Cinética de desgranulação dos mastócitos na presença de TC-1.** Este experimento foi realizado de forma semelhante ao experimento anterior, entretanto foi verificada a liberação de  $\beta$ -hexosaminidase em diferentes tempos (7 horas, 5 horas e 3 horas de co-cultura). 2X representa que o dobro de células também foi testado como controle negativo. Dados referentes a um experimento com triplicatas amostrais por condição. Estatística realizada por One-Way ANOVA e Tukey, onde p>0,05.

# 4.2.6 Ciclo celular de esferóides de co-cultura de PT18 com TC-1

A fim de avaliar se além de manter a viabilidade da TC-1, o co-cultivo com células PT18 acelera o ciclo celular da célula tumoral, realizamos um protocolo muito similar com o citado no item acima, entretanto a marcação com DAPI visou observar as diversas etapas do ciclo celular, que foram avaliadas em 72 e 96 horas de cultivo. Não foi possível verificar nenhuma diferença significativa nas fases do ciclo celular em nenhum dos tempos avaliados (FIGURA 23A e B). Nos dois tempos avaliados a PT18 quando cultivada sozinha aparece em sub G1, enquanto que a PT18 em co-cultivo tem praticamente 0% de células em sub G1 (dados não mostrados).



**Figura 23 – Cinética de crescimento dos esferoides tumorais com mastócitos e ciclo celular.** Após o período de incubação indicado os esferoides foram submetidos à digestão. Uma alíquota das suspensões obtidas foi usada para contagem de células e o restante foi utilizado para marcação com anticorpo anti-FcERI para quantificar os mastócitos por FACS e desta forma quantificar as células TC-1 das co-culturas também. Adicionalmente, estas células foram marcadas com DAPI na concentração de 10 μg/mL. (A) Fases do ciclo celular da TC-1 sozinha ou em co-cultivo com PT18 no tempo de 72 horas de cultura. (B) Fases do ciclo celular da TC-1 sozinha ou em co-cultivo com PT18 no tempo de 96 horas de cultura. Dados de apenas um experimento com triplicata amostral.

### 4.2.7 Teste de viabilidade com cristal violeta de co-cultura de PT18 com TC-1 em monocamada

Para confirmar o efeito da PT18 na viabilidade celular e proliferação da TC-1 o ensaio de viabilidade com cristal violeta foi empregado. Este ensaio foi possível de ser realizado devido ao fato da PT18 crescer em suspensão e a TC-1 ser aderente. Portanto depois de 72 horas de cultivo foi possível eliminar os mastócitos por 3 lavagens sequenciais. Então parte da cultura foi tripsinizada e utilizada para contagem com Trypan, enquanto a outra parte foi corada por cristal de violeta e solubilizada com metanol para o teste colorimétrico. Na figura 24 à esquerda é perceptível que a TC-1 cresceu mais rapidamente na presença dos mastócitos. O que corrobora com os dados colorimétricos do cristal violeta (FIGURA 24 à direita).



**Figura 24 - Teste de viabilidade com cristal violeta de co-cultura de PT18 com TC-1 em monocamada.** Foram cultivadas 2.10<sup>3</sup> células TC-1 na presença ou ausência de PT18 na razão 1:1 em placas de 96 poços. Após 72 horas, as células receberam 3 lavagens sequenciais com PBS para tirar todos os mastócitos da cultura. Então parte das células foram recuperadas para a contagem com trypan com tripsina. O restante foi utilizado para a coloração com uma solução de cristal violeta 0,5%. Foi adicionado então metanol para solubilizar as amostras e estas foram lidas a 570 nm. (esquerda) Contagem com azul de Trypan. (direita) Teste de viabilidade com cristal violeta. análise estatística foi feita por teste T, com intervalo de confiança de p<0,05.

Sabendo que os mastócitos podem induzir a proliferação de células tumorais na razão de 1 células tumoral para 1 mastócitos, resolvemos investigar se o mesmo acontece com quantidades mais reduzidas de mastócitos devido ao fato de que esta célula é pouco abundante no infiltrado inflamatório de tumores. O que observamos é que o efeito é perdido a partir de 1:2, evidenciando assim que a concentração de mastócitos é importante, pelo menos neste modelo (FIGURA 25).



**Figura 25** - **Teste de viabilidade com cristal violeta de co-cultura em monocamada com diferentes razões de TC-1/PT-18.** Os esferóides foram preparados em diferentes razões TC-1:PT18 ou apenas TC-1. Após 72 horas, as células receberam 3 lavagens sequenciais com PBS para tirar todos os mastócitos da cultura. Então as células foram coradas com uma solução de cristal violeta 0,5%. Foi adicionado então metanol para solubilizar as amostras e estas foram lidas a 570 nm. Dados de apenas um experimento com triplicata amostral.

# 4.2.8 Avaliação do efeito *in vivo* dos mastócitos no crescimento de tumores TC-1 em camundongos RAG1-/-

A fim de avaliar o papel dos mastócitos, mais especificamente da triptase, no crescimento de tumores TC-1, células tumorais ou em co-cultura com mastócitos foram injetadas subcutaneamente no flanco lateral de camundongos C57Bl6 RAG1-/-. Parte dos animais injetados com ambas as células foram tratados por uma semana com Cromolyn (inibidor de desgranulação) a partir do momento que os tumores se tornaram palpáveis. O crescimento dos tumores injetados com mastócitos ocorreu muito mais rapidamente do que os que foram injetados apenas com as células tumorais, como pode ser observado na Figura 26. Aparentemente o fármaco Cromolyn não teve efeito algum inibindo o crescimento tumoral.


**Figura 26 – Cinética de crescimento de tumores TC-1 e TC-1/PT18.** Foram injetadas 10<sup>5</sup> células TC-1 apenas, ou com a razão 1:1 de PT18 no flanco direito de camundongos C57Bl6 Rags. Conforme o tumor foi crescendo as medidas foram tiradas com auxílio de um paquímetro. Dados representativos de um total de 2 experimentos (n=3 por grupo).

Outro dado interessante deste experimento, é que houve um aumento significativo na porcentagem de células endoteliais (CD31<sup>+</sup>), que pode representar um aumento na angiogênese tumoral, o que pode explicar o crescimento mais acelerado destes tumores. Além disso, observamos um aumento significativo também no infiltrado inflamatório de leucócitos, como o esperado, sendo o mastócito uma célula responsável pelo recrutamento de leucócitos. Mais uma vez não foi observado nenhum efeito significativo com o tratamento com Cromolyn (Figura 27).



**Figura 27 – Avaliação das células endoteliais e leucócitos totais por FACS.** Após 25 dias, os animais (n=3 por grupo) foram sacrificados e os tumores foram retirados e digeridos com o protocolo padrão de colagenase. Então as suspensões de células obtidas foram coradas com anti-CD45 APC e anti-CD31 biotina/estrepto-avidina PECy7. Por fim as células foram adquiridas no FASCANTOII e as porcentagens de células endoteliais e do infiltrado inflamatório total foram dispostas no gráfico. A análise estatística foi realizada por One-Way ANOVA e Tukey.

# 5. DISCUSSÃO

### 5. DISCUSSÃO

O câncer cervical é um dos tipos mais frequentes de câncer em mulheres de países em desenvolvimento. Uma condição necessária para o desenvolvimento deste tipo de tumor é a infecção persistente por um tipo de alto risco oncogênico de Papilomavírus Humano. Estes são vírus epiteliotrópicos que infectam pele ou mucosas. Com isso, observam-se além dos tumores do colo uterino, outros tipos de tumores associados à infecção por HPV: anais, penianos, orofaríngeos, vulvares e vaginais.

Um trabalho anterior de nosso laboratório teve como objetivo identificar alvos moleculares específicos em tumores do colo uterino tanto na população de células que expressam oncoproteínas virais, como em outras populações que compõem o tumor, como células endoteliais e do infiltrado inflamatório. Com isso pretendíamos encontrar moléculas especificamente expressas na superfície destas células que sirvam tanto como marcadores dos tumores e suas populações, como também, sirvam como alvo direto para terapia ou como endereçamento de terapias indiretas. O método escolhido para a busca destes alvos foi *Peptide Phage Display*.

Dentre os alvos encontrados, podemos destacar a  $\alpha$ -Manosidase, a Triptase e o *Lethal Giant Larvae*, que já possuem dados na literatura relacionando estas moléculas com malignidades. Dando continuidade ao estudo, observamos que a enzima  $\alpha$ -manosidase é expressa em linhagens celulares derivadas de tumores do colo uterino, e também na cérvice uterina, onde há aumento da expressão dessa enzima em correlação positiva com o grau de lesão, sendo a expressão máxima em câncer. Interessantemente, não observamos aumento da expressão da proteína/célula, mas sim, do número de células positivamente marcadas, incluindo células do infiltrado inflamatório. Sendo a expertise de nosso laboratório trabalhar com imunomodulação do infiltrado inflamatório, consideramos a  $\alpha$ -manosidase um alvo interessante para se trabalhar. Além disso, resolvemos trabalhar com a Triptase por ser produzida por mastócitos, componente celular comum do infiltrado inflamatório deste tipo de tumores.

#### 5.1 INIBIÇÃO DE α-MANOSIDASE II EM MODELO DE TUMORES ASSOCIADOS AO HPV16

Para compreender o papel da enzima  $\alpha$ -manosidase, em tumores associados ao HPV, optamos por utilizar o inibidor Swainsonina. Desde a década de 80 o SW tem sido relatado como um agente antitumoral promissor. É um inibidor eficaz tanto de  $\alpha$ -manosidase lisossômica quanto da  $\alpha$ -manosidase II de Golgi (Gerber-Lemaire e Juillerat-Jeanneret, 2010). SW em terapias de câncer tem sido associado ao bloqueio da produção dos complexos  $\beta$ 1,6-ramificados N-glicanos ligados (Wrodnigg *et al.*, 2008). De fato, a expressão destes na superfície celular foi associada ao fenótipo maligno (Fuster e Esko, 2005). Portanto, as vias de glicosilação são um alvo promissor para novas terapias contra o câncer. Integrinas, receptores e ligantes de matriz extracelular exibem um padrão alterado de glicosilação N-ligada em células que foram submetidas a uma transformação maligna (Janik *et al.*, 2010). Além disso, há um crescente número de evidências que sugerem que as células tumorais, que superexpressam algumas glicosiltranferases, sintetizam glicanos que facilitam processos como invasão e metástase (Fuster e Esko, 2005; Zhao *et al.*, 2008).

A SW mostrou reduzir a invasão de células tumorais em ensaios de câncer em humanos de Fase I e aumentar as defesas antitumorais naturais do corpo, tais como células assassinas ativadas por linfocinas (LAK) e citotoxicidade de células assassinas naturais (NK) (Galustian *et al.*, 1994; Goss *et al.*, 1994).

Em inúmeros estudos realizados em camundongos *in vivo*, é perceptível o potencial de retardar o crescimento tumoral de diferentes linhagens de cânceres humanos, tais como: HepG2, SMCC7721, Huh7 e MHCC97-H de hepatocarcinoma (You *et al.*, 2012), Eca-109 de carcinoma escamoso de esôfago (Li *et al.*, 2012) e PC-3 de câncer de próstata (Beheshti Zavareh *et al.*, 2012).

Além disso, dados da literatura mostraram que SW pode ativar células do sistema imunológico, incluindo macrófagos, células NK e células T CD8. Nossos dados corroboram com essas observações, uma vez que mostramos que o tratamento com SW de animais *naive*, aumenta a frequência de células T CD8 no baço e pode modular parcialmente macrófagos associados a tumores do modelo TC-1. Essa observação foi particularmente interessante para o nosso laboratório, uma vez que estamos investigando o microambiente tumoral no câncer cervical (Alvarez *et al.*, 2017).

As células mielóides têm um papel bem estabelecido no microambiente tumoral. No caso de tumores cervicais especificamente, tem sido demonstrado na literatura que há um aumento do número de macrófagos e isto é proporcional à progressão da lesão (Hammes *et al.*, 2007; Mazibrada *et al.*, 2008). Estes macrófagos associados a tumores (TAMs) não expressam iNOS (Kobayashi *et al.*, 2008) podendo ser macrófagos alternativamente ativados (Gordon e Martinez, 2010). Dados de nosso laboratório mostram que em modelo experimental de tumor associado ao HPV16, há recrutamento de macrófagos com características supressoras da resposta imune, capazes de induzir diferenciação de células T reguladoras. Além disso, são as células mais abundantes no infiltrado inflamatório deste tipo de tumores e possuem resistência à ativação por IFN-γ e LPS (Lepique *et al.*, 2009).

Uma das nossas observações interessantes foi que a SW poderia reduzir a secreção de CCL2 pelos TAMs, uma vez que os TAMs expressam mais CCL2 no microambiente do que células tumorais (Stone, Rossetti, Bolpetti, *et al.*, 2014). Além disso, tem sido descrita a importância desta quimiocina no recrutamento de monócitos para o microambiente tumoral (Pahler *et al.*, 2008). Além disso, a SW poderia neutralizar os efeitos estimulatórios do tratamento com IFN e LPS na indução da secreção de IL-10 e IL-6 pela TAM. Ambas as citocinas foram associadas à supressão das respostas das células T (Heusinkveld *et al.*, 2011; Kubota *et al.*, 2017).

Estes resultados nos levaram a testar o efeito SW no crescimento do tumor TC-1 *in vivo*. Para nossa surpresa, o crescimento do tumor foi significativamente aumentado em camundongos tratados com SW. Curiosamente, o efeito da SW no crescimento do tumor pareceu ser indireto, através do aumento na frequência de mielóides no baço de camundongos portadores de tumor.

Analisando esta população de células mielóides encontramos um dado interessante. Existe um aumento na população de células mielóides Ly6C<sup>+</sup>Ly6G<sup>++</sup>, usualmente caracterizadas como células mieloderivadas supressoras, nos camundongos com tumor quando comparados com os animais *naive*, mas um aumento ainda mais é observado nos animais com tumor tratados com SW. Estas células atuam suprimindo a resposta antitumoral tanto da imunidade inata, como da adaptativa (Safarzadeh *et al.*, 2018). Atuando de diferentes formas, como suprimindo a proliferação de células T através da depleção de aminoácidos essenciais para proliferação e ativação de células T (Baniyash, 2016), bem como produzindo moléculas indutoras de fenótipo de regulador em linfócitos, como IL-10 e TGF-β (Bronte e Zanovello, 2005).

As células mieloderivadas supressoras (MDSCs) são uma população heterogênea de células imaturas com origem granulocítica ou monocítica (Meirow *et al.*, 2015). Em camundongos são encontradas duas populações distintas de MDSCs, as polimorfonucleares/granulocíticas (PMN-MDSCs), que possuem o fenótipo CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup>Ly6C<sup>/ow</sup>, e as monocíticas (MO-MDSCs) com fenótipo CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>/ow</sup>Ly6C<sup>high</sup> (Mandruzzato *et al.*, 2016). Evidentemente, PMN-MDSC e MO-MDSC são fenotipicamente semelhantes aos neutrófilos e monócitos, respectivamente, apesar de ter algumas diferenças notáveis. Por exemplo, PMN-MDSCs comparados aos neutrófilos têm menos grânulos e diminuição da expressão de CD16 e CD62L (Bronte *et al.*, 2016). Aparentemente, a população que observamos aumentada em nosso estudo, possivelmente representa PMN-MDSCs.

Em um estudo realizado com células retiradas da medula óssea de humanos, notou-se que o tratamento in vitro com SW suprimiu a diferenciação completa de mielócitos em neutrófilos por G-CSF (Misago *et al.*, 2000). Estes dados podem se complementar, sugerindo que SW intervêm no processo de diferenciação e acaba por induzir este fenótipo supressor na geração de células granulocíticas, combinado ao fato das células TC-1 produzirem G-CSF.

Os tumores cervicais exibem efeitos sistêmicos no sistema imunológico, estes são desencadeados, por exemplo, por citocinas como G-CSF que promovem leucocitose por sinalização através de STAT3 (Mabuchi *et al.*, 2014; Kawano *et al.*, 2015). Em modelos experimentais de tumores, é descrito um aumento na proliferação de células mielóides na medula óssea e no baço de camundongos portadores de tumor em comparação com controles (Stone, Rossetti, Lima, *et al.*, 2014). Além disso, pacientes com neoplasia intraepitelial cervical exibem um aumento na frequência de neutrófilos CD66b<sup>+</sup> de baixa densidade circulantes, indicando novamente os efeitos sistêmicos dessas lesões, mesmo antes de progredir para o câncer (Alvarez *et al.*, 2017).

Aparentemente a SW está potencializando a leucocitose já causada por este tipo de tumores, uma vez que animais *naive* tratados com a droga não apresentam este fenômeno. Apesar dos resultados inesperados, consideramos este trabalho relevante, uma vez que SW tem sido considerada uma droga para tratamento de câncer (Goss *et al.*, 1994; Goss *et al.*, 1997; Li *et*  *al.*, 2012), quando nós estamos mostrando que é necessário cautela para o uso dessa droga no tratamento de tumores HPV<sup>+</sup>.

# 5.2 CARACTERIZAÇÃO DA TRIPTASE DE MASTÓCITOS EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE TUMORES ASSOCIADOS AO HPV16

Como dito anteriormente, um dos peptídeos identificados em nosso estudo tem similaridade à enzima triptase de mastócitos. A triptase e a quimase são serino-proteases ativas pré-formadas e estão armazenadas em grandes quantidades em grânulos secretores de MCs (Metcalfe et al., 1997), cujo papel angiogênico tem sido estabelecido (Ribatti et al., 2011). Em particular, a triptase representa um dos mais potentes mediadores angiogênicos liberados por MCs humanos após sua ativação, e pode desempenhar um papel angiogênico através de vários mecanismos (Moon et al., 2003). Esta enzima liga-se a receptores PAR-2 em outras células, incluindo células tumorais (Cai et al., 2014), células endoteliais e outras células inflamatórias. No microambiente tumoral, a atividade de triptase pode levar ao aumento da proliferação das células tumorais, e aumento da angiogênese, o que indiretamente, também suporta a proliferação das células tumorais (Ribatti et al., 2005; Strouch et al., 2010). Ou seja, esta protease estimula diretamente a proliferação de células endoteliais vasculares, levando a um efeito angiogênico direto. Ou efeitos angiogênicos indiretos, como demostrado por (Yoshii et al., 2005), em que a triptase induz efeitos proliferativos mediados por PAR-2 na linhagem celular DLD-1 de carcinoma do cólon humano em MAP quinase e cicloxigenase (COX) de maneira dependente e a liberação de IL-6 e do fator de estimulação de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) que, por sua vez, atuam como fatores angiogênicos.

Sendo assim, resolvemos padronizar um modelo no qual pudéssemos estudar o papel direto da triptase em células HPV<sup>+</sup>, e o método escolhido para este estudo foi o de esferoides tumorais de células TC-1 e a linhagem PT18. De fato, nós observamos que mastócitos da linhagem PT18 expressam triptase, assim como células de lavado peritoneal de camundongos, sendo essas boas candidatas para o estudo, além de crescerem muito bem na presença de interleucina-3, que é produzida pelas células TC-1 (Stone *et al.*, 2014). Nós mostramos também que células TC-1 além de expressarem o receptor alvo da triptase (PAR-2), são capazes de induzir desgranulação de PT- 18, de forma independente de anticorpo. Uma possível explicação para esta ativação, seja pelo fato da TC-1 produzir a anafilatoxina C5a (Stone *et al.*, 2014), sendo esta uma das moléculas capazes de ativar mastócitos. Sugerindo esse ser um sistema promissor, pois parece se retroalimentar. Entretanto os resultados são heterogêneos entre as repetições do mesmo experimento, tanto em relação à viabilidade das células TC-1, como ao ciclo celular. A TC-1 parece fornecer condições ótimas para o crescimento da PT18. Quando colocada sozinha no colchão de agarose, a PT18 começa a morrer em poucas horas mesmo com a adição de IL-3. Tendo em vista esta limitação do modelo dos esferoides de co-cultura de célula tumoral e mastócitos, resolvemos olhar a proliferação em monocamada do co-cultivo através da metodologia do Cristal Violeta. E o resultado nos deu a pista de que os mastócitos estão tendo efeito direto na proliferação das células tumorais. Entretanto não podemos dizer se este efeito é devido à ação da triptase, pois ainda que TC-1 esteja apta para receber sinais da triptase, os mastócitos produzem outros diversos mediadores inflamatórios, que poderiam estar atuando como sinais mitogênicos, tais como IL-8 e histamina (Theoharides e Conti, 2004).

Pensando nos efeitos indiretos que a triptase pode causar no microambiente tumoral, nossos resultados mostram que a co-inoculação de células TC-1 e PT18 em camundongos leva ao crescimento tumoral mais acelerado dos tumores TC-1, do que quando injetamos células TC-1 sozinhas, sendo que o tratamento com Cromolyn incapaz de inibir tal efeito. É possível que essa resposta seja, pelo menos em parte, devido ao aumento de angiogênese, já que os tumores com PT-18 apresentam maior frequência de células CD31<sup>+</sup> (células endoteliais).

Outro dado interessante observado, é que queratinócitos primários expressam menos PAR-2 que queratinócitos imortalizados e transformados, o que nos levou a questionar se a ativação de PAR-2 poderia participar da tumorigênese, principalmente na etapa de imortalização. Sendo assim, surgiu a ideia de um projeto que está sendo realizado no laboratório por um aluno de iniciação científica, no qual queratinócitos em diferentes estágios de malignidade por ação de oncoproteínas do HPV serão expostos a ação de um peptídeo agonista de PAR-2 e as alterações na proliferação e no ciclo celular serão avaliadas.

Importante ressaltar que nosso modelo não mimetiza idealmente as condições fisiológicas do microambiente tumoral, onde a população mastócitos constitui apenas de 4 a 6% das células

encontradas nos tumores TC-1. Quando utilizamos diferentes razões de células tumorais para mastócitos, foi perceptível que o efeito na proliferação das células tumorais só ocorria quando mastócitos estavam na razão 1:1 ou 1:2. Entretanto estes dados não descartam a importância dos mastócitos para o microambiente. Está descrito na literatura que o receptor PAR-2 é ativado por outras proteases como tripsina, por fatores de coagulação do sangue (TF-VIIa e Xa), elastase de neutrófilos, calicreínas e por serino-proteases transmembranares como matriptase-1 e TMPRSS2 (Adams *et al.*, 2011). Sendo assim outras células do microambiente podem fornecer fontes de ativação de PAR-2 e mesmo a própria célula tumoral pode sinalizar por este receptor de forma autócrina. Desta forma, acreditamos que os mastócitos devem atuar sinergicamente com outros fatores citados. Usando este racional fizemos uma tentativa de nocautear o receptor PAR-2 nas linhagens tumorais HPV<sup>+</sup> HeLa e SiHa, utilizando a técnica de Crispr-Cas9, para verificar se a ausência do receptor traria prejuízos para a progressão tumoral. Infelizmente não obtivemos sucesso nesta primeira tentativa. De qualquer forma, acreditamos que uma abordagem direta de inibição de PAR-2 poderia ser uma opção terapêutica promissora, levando em consideração os efeitos proliferativos e no processo de angiogênese causados por sua ativação.

# 6. CONCLUSÕES

### 6. CONCLUSÕES

Este trabalho buscou avaliar o papel de dois possíveis alvos terapêuticos para tumores  $HPV^+$  que apresentaram afinidade preferencial a linhagens de células tumorais cervicais e tumores por *Peptide phage display*,  $\alpha$ -manosidase e triptase, ambas enzimas produzidas abundantemente no microambiente tumoral.

### $6.1 \alpha$ -Manosidase

As conclusões obtidas no estudo da inibição de α-manosidase por SW em tumores HPV16<sup>+</sup> estão descritas a seguir e resumidas em um esquema representativo do mecanismo de ação do fármaco (Figura 28).

 O tratamento com o inibidor farmacológico de α-manosidase II (Swainsonina – SW) não inibe a proliferação de células tumorais *in vitro*.

 Macrófagos associados a tumores (TAMs) quando tratados com SW são parcialmente modulados apresentando um aumento da atividade de iNOS, aumento da expressão de IFN-γ e reduzindo a expressão de IL-10, IL-6 e CCL2. Entretanto a atividade de Arginase não sofreu alterações com o tratamento.

- O tratamento com SW, ao contrário do esperado, acelerou o crescimento tumoral ao invés de inibir.

- Tumores de animais tratados recrutam menos infiltrado inflamatório, que pode ser devido a redução da expressão de CCL2.

 SW aumenta o acúmulo de células mielóides no baço com fenótipo e atividade supressora, além de diminuir a frequência de células T CD8<sup>+</sup>. Efeito este apenas observado em animais com tumores tratados, comprovando que a SW atua acentuando os efeitos sistêmicos causados por tumores HPV<sup>+</sup>.

- A atividade supressora das células mielóides do baço de animais com tumor tratados pode se dar por uma redução na ativação de NF-κB.



Figura 28 – Representação esquemática do mecanismo de ação de SW no tratamento de animais com tumores. SW potencializa o crescimento tumoral por acentuar o acúmulo de MDSCs no baço que inibem a proliferação de células T. As células T por sua vez são importantes ferramentas na resposta imunológica anti-tumoral.

### 6.1 Triptase

No caso da caracterização da triptase, optamos por observar a interação de mastócitos com as células tumorais em experimentos *in vitro* e *in vivo*, sendo as conclusões obtidas descritas abaixo:

- A linhagem de mastócitos PT-18 se apresentou competente para a expressão de triptase, além de apresentar os marcadores clássicos CD117 e FcERI.

- Observamos diferentes níveis de expressão do receptor de triptase PAR-2 em linhagens tumorais e em queratinócitos imortalizados e primários. Sendo que os queratinócitos primários apresentaram menor nível de expressão quando comparados com o restante dos tipos celulares, sugerindo que PAR-2 pode ter um papel importante no processo de imortalização.

- Em cultura de monocamada, os mastócitos induzem a proliferação das células tumorais nas proporções 1:1 e 1:2 (TC-1:PT-18).

- Quando injetadas TC-1 e PT-18 conjuntamente, na proporção de 1:1, em camundongos RAG1-/observamos um crescimento mais acelerado dos tumores. Este crescimento pode ser explicado em partes por um aumento da angiogênese tumoral, evidenciado pelo aumento da frequência de células CD31<sup>+</sup>.

# 7. CONCLUSÕES FINAIS

### 7. CONCLUSÕES FINAIS

- Embora os tumores associados ao HPV ainda acometam homens e mulheres, principalmente em países em desenvolvimento e soluções terapêuticas sejam importantes, nossos dados sugerem que a Swainsonina não deve ser utilizada como potencial droga terapêutica para estes pacientes. O tratamento de animais com tumores relacionados ao HPV16 com a droga parece ter um efeito indesejável de exacerbação da imunossupressão através do aumento e acúmulo de MDSCs, promovendo a progressão tumoral ao invés de ser protetivo.
- Os mastócitos, em nossos modelos, apresentaram atividades pró-tumorais tais como aumento da proliferação de células tumorais, bem como um aparente aumento na angiogênese. Entretanto nosso modelo não simula as condições fisiológicas do microambiente tumoral. Sendo o receptor PAR-2 ativado por uma vasta gama de proteases, acreditamos que os mastócitos têm seu papel, mas devem atuar conjuntamente com outros fatores para ter um efeito mais robusto. Sendo assim, parece uma ideia mais promissora inibir o receptor do que a triptase propriamente dita.

# 8. REFERÊNCIAS

### 8. REFERÊNCIAS

ADAMS, M. N. et al. Structure, function and pathophysiology of protease activated receptors. **Pharmacol Ther,** v. 130, n. 3, p. 248-82, Jun 2011. ISSN 1879-016X. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21277892</u> >.

ALBREKTSEN, T. et al. Transcriptional program induced by factor VIIa-tissue factor, PAR1 and PAR2 in MDA-MB-231 cells. J Thromb Haemost, v. 5, n. 8, p. 1588-97, Aug 2007. ISSN 1538-7933. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17470200</u> >.

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

AMMENDOLA, M. et al. Mast cell positivity to tryptase correlates with metastatic lymph nodes in gastrointestinal cancer patients treated surgically. **Oncology**, v. 85, n. 2, p. 111-6, 2013. ISSN 1423-0232. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23887206</u> >.

BAAY, M. et al. Tumor cells and tumor-associated macrophages: secreted proteins as potential targets for therapy. **Clin Dev Immunol,** v. 2011, p. 565187, 2011. ISSN 1740-2530. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22162712</u> >.

BANIYASH, M. Myeloid-derived suppressor cells as intruders and targets: clinical implications in cancer therapy. **Cancer Immunol Immunother,** v. 65, n. 7, p. 857-67, 07 2016. ISSN 1432-0851. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27225641</u> >.

BARASHI, N. et al. Inflammation-induced hepatocellular carcinoma is dependent on CCR5 in mice. **Hepatology,** v. 58, n. 3, p. 1021-30, Sep 2013. ISSN 1527-3350. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23526353</u> >.

BEHESHTI ZAVAREH, R. et al. Suppression of cancer progression by MGAT1 shRNA knockdown.PLoS One,v.7,n.9,p.e43721,2012.ISSN1932-6203.Disponívelem:<</td>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22957033>.

BERMAN, T. A.; SCHILLER, J. T. Human papillomavirus in cervical cancer and oropharyngeal cancer: One cause, two diseases. **Cancer**, v. 123, n. 12, p. 2219-2229, Jun 2017. ISSN 1097-0142. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28346680</u> >.

BOWEN, D. et al. A preliminary pharmacokinetic evaluation of the antimetastatic immunomodulator swainsonine: clinical and toxic implications. **Anticancer Res,** v. 13, n. 4, p. 841-4, 1993 Jul-Aug 1993. ISSN 0250-7005. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8352552</u> >.

BRONTE, V. et al. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. **Nat Commun**, v. 7, p. 12150, 07 2016. ISSN 2041-1723. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27381735</u> >.

BRONTE, V.; ZANOVELLO, P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. **Nat Rev Immunol**, v. 5, n. 8, p. 641-54, Aug 2005. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16056256</u> >.

CAI, W. S. et al. Activated protease receptor-2 induces GATA6 expression to promote survival in irradiated colon cancer cells. **Arch Biochem Biophys,** v. 555-556, p. 28-32, Aug 2014. ISSN 1096-0384. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24887481</u> >.

CASTELLS, M. C.; IRANI, A. M.; SCHWARTZ, L. B. Evaluation of human peripheral blood leukocytes for mast cell tryptase. **J Immunol**, v. 138, n. 7, p. 2184-9, Apr 1987. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3549898</u> >.

CHANG, L. H. et al. Activated PAR-2 regulates pancreatic cancer progression through ILK/HIF- $\alpha$ -induced TGF- $\alpha$  expression and MEK/VEGF-A-mediated angiogenesis. **Am J Pathol**, v. 183, n. 2, p. 566-75, Aug 2013. ISSN 1525-2191. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23764046</u> >.

CHEN, H. et al. N-glycan-defective breast cancer cells induce a phenotypic switch in polarization of bone marrow-derived macrophages. **Clin Invest Med,** v. 34, n. 2, p. E71-81, Apr 2011. ISSN 1488-2353. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21463547</u> >.

CORNIL, I.; KERBEL, R. S.; DENNIS, J. W. Tumor cell surface beta 1-4-linked galactose binds to lectin(s) on microvascular endothelial cells and contributes to organ colonization. **J Cell Biol**, v. 111, n. 2, p. 773-81, Aug 1990. ISSN 0021-9525. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2116422</u> >.

COUSSENS, L. M. et al. Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. **Genes Dev,** v. 13, n. 11, p. 1382-97, Jun 1999. ISSN 0890-9369. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10364156</u> >.

CUTTS, F. T. et al. Human papillomavirus and HPV vaccines: a review. **Bull World Health Organ,** v. 85, n. 9, p. 719-26, Sep 2007. ISSN 0042-9686. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18026629</u> >.

DAS, P. C. et al. Activation of resident tissue-specific macrophages by swainsonine. **Oncol Res,** v. 7, n. 9, p. 425-33, 1995. ISSN 0965-0407. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8835286</u> >.

DECRAUSAZ, L. et al. A novel mucosal orthotopic murine model of human papillomavirus-associated genital cancers. **Int J Cancer,** v. 128, n. 9, p. 2105-13, May 2011. ISSN 1097-0215. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20635385</u> >.

DENNIS, J. W.; GRANOVSKY, M.; WARREN, C. E. Protein glycosylation in development and disease. **Bioessays,** v. 21, n. 5, p. 412-21, May 1999. ISSN 0265-9247. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10376012</u> >.

DENNIS, J. W.; LAFERTÉ, S. Oncodevelopmental expression of--GlcNAc beta 1-6Man alpha 1-6Man beta 1--branched asparagine-linked oligosaccharides in murine tissues and human breast carcinomas. Cancer Res, 49. n. 4, 945-50, Feb 1989. ISSN 0008-5472. Disponível v. р. em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2521456 >.

DOORBAR, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. **Clin Sci (Lond),** v. 110, n. 5, p. 525-41, May 2006. ISSN 0143-5221. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16597322</u> >.

DUENSING, S.; MÜNGER, K. Centrosome abnormalities and genomic instability induced by human papillomavirus oncoproteins. **Prog Cell Cycle Res,** v. 5, p. 383-91, 2003. ISSN 1087-2957. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14593733</u> >.

DUTRA-OLIVEIRA, A.; MONTEIRO, R. Q.; MARIANO-OLIVEIRA, A. Protease-activated receptor-2 (PAR2) mediates VEGF production through the ERK1/2 pathway in human glioblastoma cell lines. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 421, n. 2, p. 221-7, May 2012. ISSN 1090-2104. Disponível em: < <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22497886">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22497886</a> >.

FEHRMANN, F.; LAIMINS, L. A. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. **Oncogene**, v. 22, n. 33, p. 5201-7, Aug 2003. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12910257</u> >.

FERNANDES, B. et al. Beta 1-6 branched oligosaccharides as a marker of tumor progression in human breast and colon neoplasia. **Cancer Res,** v. 51, n. 2, p. 718-23, Jan 1991. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1985789</u> >.

FRIERI, M.; KUMAR, K.; BOUTIN, A. Role of mast cells in trauma and neuroinflammation in allergy immunology. **Ann Allergy Asthma Immunol**, v. 115, n. 3, p. 172-7, Sep 2015. ISSN 1534-4436. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26356588</u> >.

FRUMOVITZ, M. Small- and Large-Cell Neuroendocrine Cervical Cancer. **Oncology (Williston Park),** v. 30, n. 1, p. 70, 77-8, 93, Jan 2016. ISSN 0890-9091. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26791848</u> >.

FUSTER, M. M.; ESKO, J. D. The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. **Nat Rev Cancer**, v. 5, n. 7, p. 526-42, Jul 2005. ISSN 1474-175X. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16069816</u> >.

GALUSTIAN, C. et al. Swainsonine, a glycosylation inhibitor, enhances both lymphocyte efficacy and tumour susceptibility in LAK and NK cytotoxicity. **Immunopharmacology,** v. 27, n. 2, p. 165-72, 1994 Mar-Apr 1994. ISSN 0162-3109. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7516929</u> >.

GERBER-LEMAIRE, S.; JUILLERAT-JEANNERET, L. Studies toward new anti-cancer strategies based on alphamannosidase inhibition. **Chimia (Aarau)**, v. 64, n. 9, p. 634-9, 2010. ISSN 0009-4293. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21138109</u> >.

GILLISON, M. L. et al. Human papillomavirus and diseases of the upper airway: head and neck cancer and respiratory papillomatosis. **Vaccine**, v. 30 Suppl 5, p. F34-54, Nov 2012. ISSN 1873-2518. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23199965</u> >.

GIORDANO, R. J. et al. Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands. **Nat Med,** v. 7, n. 11, p. 1249-53, Nov 2001. ISSN 1078-8956. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11689892</u> >.

GORDON, K. M. et al. A simple method for detecting up to five immunofluorescent parameters together with DNA staining for cell cycle or viability on a benchtop flow cytometer. J Immunol Methods, v. 275, n. 1-2, p. 113-21, Apr 2003. ISSN 0022-1759. Disponível em: < <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12667675">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12667675</a> >.

GORDON, S.; MARTINEZ, F. O. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. **Immunity,** v. 32, n. 5, p. 593-604, May 2010. ISSN 1097-4180. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20510870</u> >.

GOSS, P. E. et al. Inhibitors of carbohydrate processing: A new class of anticancer agents. **Clin Cancer Res,** v. 1, n. 9, p. 935-44, Sep 1995. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9816064</u> >.

GOSS, P. E. et al. A phase I study of swainsonine in patients with advanced malignancies. **Cancer Res,** v. 54, n. 6, p. 1450-7, Mar 1994. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8137247</u> >.

GOSS, P. E. et al. Phase IB clinical trial of the oligosaccharide processing inhibitor swainsonine in patients with advanced malignancies. **Clin Cancer Res,** v. 3, n. 7, p. 1077-86, Jul 1997. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9815786</u> >.

GRZEGORZEWSKI, K. et al. Induction of macrophage tumoricidal activity, major histocompatibility complex class II antigen (lak) expression, and interleukin-1 production by swainsonine. **Cancer Commun**, v. 1, n. 6, p. 373-9, 1989. ISSN 0955-3541. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2484638</u> >.

GUERRA, C. et al. Pancreatitis-induced inflammation contributes to pancreatic cancer by inhibiting oncogene-induced senescence. **Cancer Cell,** v. 19, n. 6, p. 728-39, Jun 2011. ISSN 1878-3686. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21665147</u> >.

GUO, C. P. et al. Potent anti-tumor effect generated by a novel human papillomavirus (HPV) antagonist peptide reactivating the pRb/E2F pathway. **PLoS One,** v. 6, n. 3, p. e17734, Mar 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21423621</u> >.

GUO, D. et al. Involvement of ERK1/2/NF-κB signal transduction pathway in TF/FVIIa/PAR2-induced proliferation and migration of colon cancer cell SW620. **Tumour Biol**, v. 32, n. 5, p. 921-30, Oct 2011. ISSN 1423-0380. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21625939</u> >.

HAMMES, L. S. et al. Macrophages, inflammation and risk of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) progression--clinicopathological correlation. **Gynecol Oncol**, v. 105, n. 1, p. 157-65, Apr 2007. ISSN 0090-8258. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17229459</u> >.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell,** v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar 2011. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230</u> >.

HEBNER, C. M.; LAIMINS, L. A. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. **Rev Med Virol**, v. 16, n. 2, p. 83-97, 2006 Mar-Apr 2006. ISSN 1052-9276. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16287204</u> >.

HEFFERNAN, M. et al. Branching beta 1-6N-acetylglucosaminetransferases and polylactosamine expression in mouse F9 teratocarcinoma cells and differentiated counterparts. **J Biol Chem,** v. 268, n. 2, p. 1242-51, Jan 1993. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8419327</u> >.

HEUSINKVELD, M. et al. M2 macrophages induced by prostaglandin E2 and IL-6 from cervical carcinoma are switched to activated M1 macrophages by CD4+ Th1 cells. **J Immunol**, v. 187, n. 3, p. 1157-65, Aug 2011. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21709158</u> >.

HIBBS, J. B. et al. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. **Biochem Biophys Res Commun,** v. 157, n. 1, p. 87-94, Nov 1988. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3196352</u> >.

HIRAIZUMI, S. et al. Altered protein glycosylation of rat 3Y1 cells induced by activated c-myc gene. Int J Cancer, v. 48, n. 2, p. 305-10, May 1991. ISSN 0020-7136. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2019471</u> >.

HJORTOE, G. M. et al. Tissue factor-factor VIIa-specific up-regulation of IL-8 expression in MDA-MB-231 cells is mediated by PAR-2 and results in increased cell migration. **Blood**, v. 103, n. 8, p. 3029-37, Apr 2004. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15070680</u> >.

HOLLINGSWORTH, M. A.; SWANSON, B. J. Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. **Nat Rev Cancer,** v. 4, n. 1, p. 45-60, Jan 2004. ISSN 1474-175X. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14681689</u> >. HU, Y. et al. Swainsonine exposure induces impairment of host immune response in pregnant BALB/c mice. **BMC Immunol,** v. 16, p. 53, Sep 2015. ISSN 1471-2172. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26335138</u> >.

HUMPHRIES, M. J. et al. Augmentation of murine natural killer cell activity by swainsonine, a new antimetastatic immunomodulator. **Cancer Res,** v. 48, n. 6, p. 1410-5, Mar 1988. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3125963</u> >.

HUMPHRIES, M. J. et al. Oligosaccharide modification by swainsonine treatment inhibits pulmonary colonization by B16-F10 murine melanoma cells. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 83, n. 6, p. 1752-6, Mar 1986. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3081900</u> >.

INCA. Programa nacional controle cancer colo útero. 2015. Disponível em:< http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoes\_programas/site/home/nobrasil/programa\_naci onal\_controle\_cancer\_colo\_utero/conceito\_magnitude>.

ITO, Y. et al. Structural approaches to the study of oligosaccharides in glycoprotein quality control. **Curr Opin Struct Biol,** v. 15, n. 5, p. 481-9, Oct 2005. ISSN 0959-440X. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16154739</u> >.

JANIK, M. E.; LITYŃSKA, A.; VEREECKEN, P. Cell migration-the role of integrin glycosylation. **Biochim Biophys Acta,** v. 1800, n. 6, p. 545-55, Jun 2010. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20332015</u> >.

JOHUNG, K.; GOODWIN, E. C.; DIMAIO, D. Human papillomavirus E7 repression in cervical carcinoma cells initiates a transcriptional cascade driven by the retinoblastoma family, resulting in senescence. **J Virol,** v. 81, n. 5, p. 2102-16, Mar 2007. ISSN 0022-538X. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17182682</u> >.

JOYCE, J. A.; POLLARD, J. W. Microenvironmental regulation of metastasis. **Nat Rev Cancer,** v. 9, n. 4, p. 239-52, Apr 2009. ISSN 1474-1768. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19279573</u> >.

KALLURI, R.; NEILSON, E. G. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. **J Clin Invest**, v. 112, n. 12, p. 1776-84, Dec 2003. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14679171</u> >.

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

KHEMTHONGCHAROEN, N. et al. Novel p16 binding peptide development for p16-overexpressing cancer cell detection using phage display. **J Pept Sci,** v. 21, n. 4, p. 265-73, Apr 2015. ISSN 1099-1387. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25754556</u> >.

KLINGELHUTZ, A. J.; FOSTER, S. A.; MCDOUGALL, J. K. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. **Nature,** v. 380, n. 6569, p. 79-82, Mar 1996. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8598912</u> >.

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

KUBOTA, K. et al. CD163. **Sci Rep,** v. 7, n. 1, p. 1755, 05 2017. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28496107</u> >.

KULARATHNA, P. K.; PAGEL, C. N.; MACKIE, E. J. Tumour progression and cancer-induced pain: a role for protease-activated receptor-2? **Int J Biochem Cell Biol**, v. 57, p. 149-56, Dec 2014. ISSN 1878-5875. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25448411</u> >.

KUSMARTSEV, S.; GABRILOVICH, D. I. Immature myeloid cells and cancer-associated immune suppression. **Cancer Immunol Immunother,** v. 51, n. 6, p. 293-8, Aug 2002. ISSN 0340-7004. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12111117</u> >.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature,** v. 227, n. 5259, p. 680-5, Aug 1970. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5432063</u> >.

LEMAIRE, S. et al. Expression of beta 1-6-branched N-linked oligosaccharides is associated with activation in human T4 and T8 cell populations. **J Biol Chem,** v. 269, n. 11, p. 8069-74, Mar 1994. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8132531</u> >.

LEPIQUE, A. P. et al. HPV16 tumor associated macrophages suppress antitumor T cell responses. **Clin Cancer Res,** v. 15, n. 13, p. 4391-400, Jul 2009. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19549768</u> >.

LI, Z. et al. Swainsonine promotes apoptosis in human oesophageal squamous cell carcinoma cells in vitro and in vivo through activation of mitochondrial pathway. **J Biosci,** v. 37, n. 6, p. 1005-16, Dec 2012. ISSN 0973-7138. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23151791</u> >.

LIN, K. Y. et al. Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. **Cancer Res,** v. 56, n. 1, p. 21-6, Jan 1996. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8548765</u> >.

LIU, F. T.; RABINOVICH, G. A. Galectins as modulators of tumour progression. **Nat Rev Cancer,** v. 5, n. 1, p. 29-41, Jan 2005. ISSN 1474-175X. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15630413</u> >.

LU, Y.; CHANEY, W. Induction of N-acetylglucosaminyltransferase V by elevated expression of activated or proto-Ha-ras oncogenes. **Mol Cell Biochem,** v. 122, n. 1, p. 85-92, May 1993. ISSN 0300-8177. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8350868</u> >.

MA, J. et al. Swainsonine Inhibits Invasion and the EMT Process in Esophageal Carcinoma Cells by Targeting Twist1. **Oncol Res,** v. 26, n. 8, p. 1207-1213, Sep 2018. ISSN 1555-3906. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28899457</u> >.

MABUCHI, S. et al. Uterine cervical cancer displaying tumor-related leukocytosis: a distinct clinical entity with radioresistant feature. J Natl Cancer Inst, v. 106, n. 7, Jul 2014. ISSN 1460-2105. Disponível em: < <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24948742">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24948742</a> >.

MANDRUZZATO, S. et al. Toward harmonized phenotyping of human myeloid-derived suppressor cells by flow cytometry: results from an interim study. **Cancer Immunol Immunother**, v. 65, n. 2, p. 161-9, Feb 2016. ISSN 1432-0851. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26728481</u> >.

MANGIA, A. et al. Tissue remodelling in breast cancer: human mast cell tryptase as an initiator of myofibroblast differentiation. **Histopathology,** v. 58, n. 7, p. 1096-106, Jun 2011. ISSN 1365-2559. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21707711</u> >.

MARIGO, I. et al. Tumor-induced tolerance and immune suppression by myeloid derived suppressor cells. **Immunol Rev,** v. 222, p. 162-79, Apr 2008. ISSN 1600-065X. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18364001</u> >.

MAZIBRADA, J. et al. Interaction between inflammation and angiogenesis during different stages of cervical carcinogenesis. **Gynecol Oncol,** v. 108, n. 1, p. 112-20, Jan 2008. ISSN 1095-6859. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17936343</u> >.

MEIROW, Y.; KANTERMAN, J.; BANIYASH, M. Paving the Road to Tumor Development and Spreading: Myeloid-Derived Suppressor Cells are Ruling the Fate. **Front Immunol**, v. 6, p. 523, 2015. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26528286</u> >.

METCALFE, D. D.; BARAM, D.; MEKORI, Y. A. Mast cells. **Physiol Rev,** v. 77, n. 4, p. 1033-79, Oct 1997. ISSN 0031-9333. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9354811</u> >.

MISAGO, M. et al. Suppressive effects of swainsonine and N-butyldeoxynojirimycin on human bone marrow neutrophil maturation. **Biochem Biophys Res Commun,** v. 269, n. 1, p. 219-25, Mar 2000. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10694503</u> >.

MOON, T. C. et al. Degranulation and cytokine expression in human cord blood-derived mast cells cultured in serum-free medium with recombinant human stem cell factor. **Mol Cells,** v. 16, n. 2, p. 154-60, Oct 2003. ISSN 1016-8478. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14651255</u> >.

MOSCICKI, A. B. et al. Updating the natural history of human papillomavirus and anogenital cancers. **Vaccine,** v. 30 Suppl 5, p. F24-33, Nov 2012. ISSN 1873-2518. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23199964</u> >.

MURDOCH, C. et al. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. **Nat Rev Cancer**, v. 8, n. 8, p. 618-31, Aug 2008. ISSN 1474-1768. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18633355</u> >.

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

OLDEN, K. et al. The potential importance of swainsonine in therapy for cancers and immunology. **Pharmacol Ther,** v. 50, n. 3, p. 285-90, 1991. ISSN 0163-7258. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1754603</u> >.

PAHLER, J. C. et al. Plasticity in tumor-promoting inflammation: impairment of macrophage recruitment evokes a compensatory neutrophil response. **Neoplasia**, v. 10, n. 4, p. 329-40, Apr 2008. ISSN 1476-5586. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18392134</u> >.

PALUCKA, A. K.; COUSSENS, L. M. The Basis of Oncoimmunology. **Cell**, v. 164, n. 6, p. 1233-1247, Mar 2016. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26967289</u> >.

PARHAM, P. Functions for MHC class I carbohydrates inside and outside the cell. **Trends Biochem Sci,** v. 21, n. 11, p. 427-33, Nov 1996. ISSN 0968-0004. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8987398</u> >.

PARKIN, D. M.; BRAY, F. Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. **Vaccine**, v. 24 Suppl 3, p. S3/11-25, Aug 2006. ISSN 0264-410X. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16949997</u> >.

PIERSMA, S. J. et al. High number of intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes is associated with the absence of lymph node metastases in patients with large early-stage cervical cancer. **Cancer Res,** v. 67, n. 1, p. 354-61, Jan 2007. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17210718</u> >.

PIRAMI, L.; GIACHÈ, V.; BECCIOLINI, A. Analysis of HPV16, 18, 31, and 35 DNA in pre-invasive and invasive lesions of the uterine cervix. **J Clin Pathol**, v. 50, n. 7, p. 600-4, Jul 1997. ISSN 0021-9746. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9306943</u> >.

PLUMMER, M. et al. Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. Lancet Glob Health, v. 4, n. 9, p. e609-16, 09 2016. ISSN 2214-109X. Disponível em: < <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27470177">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27470177</a> >.

PLUZNIK, D. H.; CUNNINGHAM, R. E.; NOGUCHI, P. D. Colony-stimulating factor (CSF) controls proliferation of CSF-dependent cells by acting during the G1 phase of the cell cycle. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 81, n. 23, p. 7451-5, Dec 1984. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6334308</u> >.

RANIERI, G. et al. Tryptase-positive mast cells correlate with angiogenesis in early breast cancer patients. **Int J Oncol,** v. 35, n. 1, p. 115-20, Jul 2009. ISSN 1019-6439. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19513558</u> >.

RATTMANN, Y. D. et al. Vascular permeability and vasodilation induced by the Loxosceles intermedia venom in rats: involvement of mast cell degranulation, histamine and 5-HT receptors. **Toxicon**, v. 51, n. 3, p. 363-72, Mar 2008. ISSN 0041-0101. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18045636</u> >.

RIBATTI, D. et al. Neovascularization and mast cells with tryptase activity increase simultaneously with pathologic progression in human endometrial cancer. **Am J Obstet Gynecol**, v. 193, n. 6, p. 1961-5, Dec 2005. ISSN 1097-6868. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16325597</u> >.

RIBATTI, D. et al. Mast cells and angiogenesis in gastric carcinoma. **Int J Exp Pathol,** v. 91, n. 4, p. 350-6, Aug 2010. ISSN 1365-2613. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20412338</u> >.

RIBATTI, D. et al. Tryptase and chymase are angiogenic in vivo in the chorioallantoic membrane assay. **Int** J **Dev Biol**, v. 55, n. 1, p. 99-102, 2011. ISSN 1696-3547. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21425085</u> >.

ROSE, D. R. Structure, mechanism and inhibition of Golgi  $\alpha$ -mannosidase II. **Curr Opin Struct Biol,** v. 22, n. 5, p. 558-62, Oct 2012. ISSN 1879-033X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22819743 >.

RUDD, P. M. et al. Roles for glycosylation of cell surface receptors involved in cellular immune recognition. J Mol Biol, v. 293, n. 2, p. 351-66, Oct 1999. ISSN 0022-2836. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10529350</u> >.

SAFARZADEH, E. et al. Myeloid-derived suppressor cells: Important contributors to tumor progression and metastasis. J Cell Physiol, v. 233, n. 4, p. 3024-3036, 04 2018. ISSN 1097-4652. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28661031</u> >.

SAMATOV, T. R.; TONEVITSKY, A. G.; SCHUMACHER, U. Epithelial-mesenchymal transition: focus on metastatic cascade, alternative splicing, non-coding RNAs and modulating compounds. **Mol Cancer**, v. 12,

n. 1, p. 107, Sep 2013. ISSN 1476-4598. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24053443 >.

SAWADA, R.; LOWE, J. B.; FUKUDA, M. E-selectin-dependent adhesion efficiency of colonic carcinoma cells is increased by genetic manipulation of their cell surface lysosomal membrane glycoprotein-1 expression levels. J Biol Chem, v. 268, n. 17, p. 12675-81, Jun 1993. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7685349">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7685349</a> >.

SCHWARTZ, L. B. et al. Quantitation of histamine, tryptase, and chymase in dispersed human T and TC mast cells. **J Immunol**, v. 138, n. 8, p. 2611-5, Apr 1987. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3549903</u> >.

SEVKO, A.; UMANSKY, V. Myeloid-derived suppressor cells interact with tumors in terms of myelopoiesis, tumorigenesis and immunosuppression: thick as thieves. **J Cancer**, v. 4, n. 1, p. 3-11, 2013. ISSN 1837-9664. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23386900</u> >.

SICA, A.; BRONTE, V. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. J Clin Invest, v. 117, n. 5, p. 1155-66, May 2007. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17476345</u> >.

SIERRA-FILARDI, E. et al. CCL2 shapes macrophage polarization by GM-CSF and M-CSF: identification of CCL2/CCR2-dependent gene expression profile. **J Immunol**, v. 192, n. 8, p. 3858-67, Apr 2014. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24639350</u> >.

SOUCEK, L. et al. Mast cells are required for angiogenesis and macroscopic expansion of Myc-induced pancreatic islet tumors. **Nat Med,** v. 13, n. 10, p. 1211-8, Oct 2007. ISSN 1078-8956. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17906636</u> >.

STONE, S. C. et al. HPV16-associated tumors control myeloid cell homeostasis in lymphoid organs, generating a suppressor environment for T cells. **J Leukoc Biol**, v. 96, n. 4, p. 619-31, Oct 2014. ISSN 1938-3673. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24970861</u> >.

STONE, S. C. et al. HPV associated tumor cells control tumor microenvironment and leukocytosis in experimental models. **Immun Inflamm Dis,** v. 2, n. 2, p. 63-75, Aug 2014. ISSN 2050-4527. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25400927</u> >.

STROUCH, M. J. et al. Crosstalk between mast cells and pancreatic cancer cells contributes to pancreatic tumor progression. **Clin Cancer Res,** v. 16, n. 8, p. 2257-65, Apr 2010. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20371681</u> >.

TANCHOT, C. et al. Tumor-infiltrating regulatory T cells: phenotype, role, mechanism of expansion in situ and clinical significance. **Cancer Microenviron**, v. 6, n. 2, p. 147-57, Aug 2013. ISSN 1875-2292. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23104434</u> >.

TCYGANOV, E. et al. Plasticity of myeloid-derived suppressor cells in cancer. **Curr Opin Immunol,** v. 51, p. 76-82, 04 2018. ISSN 1879-0372. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29547768</u> >.

THEOHARIDES, T. C.; CONTI, P. Mast cells: the Jekyll and Hyde of tumor growth. Trends Immunol, v. 25, n.5,p.235-41,May2004.ISSN1471-4906.Disponívelem:<</td>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15099563>.

TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 76, n. 9, p. 4350-4, Sep 1979. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/388439</u> >.

TRIVEDI, N. N.; CAUGHEY, G. H. Mast cell peptidases: chameleons of innate immunity and host defense. **Am J Respir Cell Mol Biol,** v. 42, n. 3, p. 257-67, Mar 2010. ISSN 1535-4989. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19933375</u> >.

TRIVEDI, N. N.; RAYMOND, W. W.; CAUGHEY, G. H. Chimerism, point mutation, and truncation dramatically transformed mast cell delta-tryptases during primate evolution. **J Allergy Clin Immunol,** v. 121, n. 5, p. 1262-8, May 2008. ISSN 1097-6825. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18325577</u> >.

UTRERA-BARILLAS, D. et al. The role of macrophages and mast cells in lymphangiogenesis and angiogenesis in cervical carcinogenesis. **Exp Mol Pathol,** v. 89, n. 2, p. 190-6, Oct 2010. ISSN 1096-0945. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20599941</u> >.

VAN DER BURG, S. H. et al. Association of cervical cancer with the presence of CD4+ regulatory T cells specific for human papillomavirus antigens. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 29, p. 12087-92, Jul 2007. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17615234</u> >.

VITTE, J. Human mast cell tryptase in biology and medicine. **Mol Immunol,** v. 63, n. 1, p. 18-24, Jan 2015. ISSN 1872-9142. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24793463</u> >.

WANG, N.; LIANG, H.; ZEN, K. Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance. **Front Immunol,** v. 5, p. 614, 2014. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25506346</u> >.

WELTERS, M. J. et al. Detection of human papillomavirus type 18 E6 and E7-specific CD4+ T-helper 1 immunity in relation to health versus disease. **Int J Cancer,** v. 118, n. 4, p. 950-6, Feb 2006. ISSN 0020-7136. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16152582</u> >.

WENZEL, C. et al. 3D high-content screening for the identification of compounds that target cells in dormant tumor spheroid regions. **Exp Cell Res,** v. 323, n. 1, p. 131-43, Apr 2014. ISSN 1090-2422. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24480576</u> >.

WERNERSSON, S.; PEJLER, G. Mast cell secretory granules: armed for battle. **Nat Rev Immunol,** v. 14, n. 7, p. 478-94, Jul 2014. ISSN 1474-1741. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24903914</u> >.

WHO. The World Health Organization's Fight Against Cancer: Strategies That Prevent., Cure and Care.2007.Disponível<https://www.who.int/cancer/publicat/WHOCancerBrochure2007.FINALweb.pdf>.

WILCOX, R. A. Cancer-associated myeloproliferation: old association, new therapeutic target. **Mayo Clin Proc,** v. 85, n. 7, p. 656-63, Jul 2010. ISSN 1942-5546. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20592171</u> >.

WINCHESTER, B. et al. The structural basis of the inhibition of human alpha-mannosidases by azafuranose analogues of mannose. **Biochem J,** v. 290 ( Pt 3), p. 743-9, Mar 1993. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8457203</u> >.

WOO, Y. L. et al. Characterising the local immune responses in cervical intraepithelial neoplasia: a cross-sectional and longitudinal analysis. **BJOG**, v. 115, n. 13, p. 1616-21; discussion 1621-2, Dec 2008. ISSN 1471-0528. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19035938</u> >.

WRODNIGG, T. M.; STEINER, A. J.; UEBERBACHER, B. J. Natural and synthetic iminosugars as carbohydrate processing enzyme inhibitors for cancer therapy. **Anticancer Agents Med Chem,** v. 8, n. 1, p. 77-85, Jan 2008. ISSN 1871-5206. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18220507</u> >.

WU, B. et al. Involvement of PKCα activation in TF/VIIa/PAR2-induced proliferation, migration, and survival of colon cancer cell SW620. **Tumour Biol**, v. 34, n. 2, p. 837-46, Apr 2013. ISSN 1423-0380. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23233043</u> >.

YANO, H. et al. Mast cell infiltration around gastric cancer cells correlates with tumor angiogenesis and metastasis. **Gastric Cancer**, v. 2, n. 1, p. 26-32, May 1999. ISSN 1436-3305. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11957067</u> >.

YAYON, A. et al. Isolation of peptides that inhibit binding of basic fibroblast growth factor to its receptor from a random phage-epitope library. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n. 22, p. 10643-7, Nov 1993. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7504274</u> >.

YEO, K. T. et al. Variability in transport rates of secretory glycoproteins through the endoplasmic reticulum and Golgi in human hepatoma cells. **J Biol Chem,** v. 260, n. 13, p. 7896-902, Jul 1985. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2989265</u> >.

YOSHII, M. et al. Mast cell tryptase stimulates DLD-1 carcinoma through prostaglandin- and MAP kinasedependent manners. **J Pharmacol Sci,** v. 98, n. 4, p. 450-8, Aug 2005. ISSN 1347-8613. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16093613</u> >.

YOU, N. et al. Swainsonine inhibits growth and potentiates the cytotoxic effect of paclitaxel in hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. **Oncol Rep,** v. 28, n. 6, p. 2091-100, Dec 2012. ISSN 1791-2431. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22993037</u> >.

YOUSEFI, S. et al. Increased UDP-GlcNAc:Gal beta 1-3GaLNAc-R (GlcNAc to GaLNAc) beta-1, 6-N-acetylglucosaminyltransferase activity in metastatic murine tumor cell lines. Control of polylactosamine synthesis. J Biol Chem, v. 266, n. 3, p. 1772-82, Jan 1991. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1824844">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1824844</a> >.

YU, X. et al. Sialylated β1, 6 branched N-glycans modulate the adhesion, invasion and metastasis of hepatocarcinoma cells. **Biomed Pharmacother**, v. 84, p. 1654-1661, Dec 2016. ISSN 1950-6007. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27847205</u> >.

YU, Y. et al. Non-IgE mediated mast cell activation. **Eur J Pharmacol,** v. 778, p. 33-43, May 2016. ISSN 1879-0712. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26164792</u> >.

ZHANG, C. et al. Protease-activated receptor-2 induces expression of vascular endothelial growth factor and cyclooxygenase-2 via the mitogen-activated protein kinase pathway in gastric cancer cells. **Oncol Rep**, v. 28, n. 5, p. 1917-23, Nov 2012. ISSN 1791-2431. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22941376</u> >.

ZHAO, Y. Y. et al. Functional roles of N-glycans in cell signaling and cell adhesion in cancer. **Cancer Sci,** v. 99, n. 7, p. 1304-10, Jul 2008. ISSN 1349-7006. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18492092</u> >.

# 9. APÊNDICE

(Artigos publicados ou em andamento durante o período do doutorado)

## PLOS ONE

#### Swainsonine, an alpha-mannosidase inhibitor, may worsen cervical cancer progression through the increase in myeloid derived suppressor cells population --Manuscript Draft--

Manuscript Number: PONE-D-18-25887 Article Type: **Research Article** Full Title: Swainsonine, an alpha-mannosidase inhibitor, may worsen cervical cancer progression through the increase in myeloid derived suppressor cells population Short Title: Swainsonine may promote cervical cancer progression Corresponding Author: Ana Paula Lepique Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo Sao Paulo, Sao Paulo BRAZIL Keywords: Abstract: Cervical cancer, which is caused by high oncogenic risk Human Papillomavirus (HPV) infection, continues to be a public health problem, mainly in developing countries. Using peptide phage display as a tool to identify potential molecular targets in HPV associated tumors, we identified -mannosidase, among other enriched sequences. Validation of our biopanning results showed that cervical tumors and cervical cancer derived cell lines expressed -mannosidase. Several studies in experimental models have shown that inhibition of -mannosidase activity with swainsonine (SW) led to inhibition of tumor growth and metastasis. Moreover, data in the literature showed that SW could modulate macrophage phenotype from alternative to cytotoxic, which could lead to anti-tumor activity. HPV associated tumors are infiltrated by macrophages among other cells. Ex vivo experiments with macrophages isolated from an immunocompetent HPV associated tumor experimental model showed that SW could partially modulate macrophage phenotype, decreasing CCL2 secretion and impairing IL-10 and IL-6 upregulation, which prompted us to proceed to in vivo tests. However, in vivo, SW treatment increased tumor growth. Investigation of the mechanisms leading to this result showed that SW treatment significantly induced the accumulation of myeloid derived suppressor cells in the spleen of tumor bearing mice, which inhibited T cell activation. Our results suggested that drugs that may increase the proliferation and accumulation of myeloid cells may contribute to cervical cancer, by exacerbating the systemic effects these tumors have on the immune system. Order of Authors: Ana Paula Lepique Caio Raony Farina Silveira Marcella Cipelli Carolina Mazzine Silvia Helena Rabelo-Santos Luiz Carlos Zeferino Gretel Rodriguez Rodriguez Suellen Hersbter Isabel Cristina Berardinelli Fabio Laginha Enrique Boccardo Luisa Lina Villa Lara Termini **Opposed Reviewers:** 

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

# UM ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE O INFILTRADO INFLAMATÓRIO E A MICROBIOTA DE LESÕES CERVICAIS ASSOCIADAS AO HPV

CAIO RAONY FARINA SILVEIRA, MARIANA BELDI, NOELY PAULA LORENZI, ANA PAULA LEPIQUE.

Breve resumo: A microbiota vaginal parece desempenhar um papel na aquisição e persistência do HPV na vagina humana e no subsequente desenvolvimento e progressão de neoplasias cervicais. Logo existe uma necessidade de mais estudos para comprovar que esta relação direta entre a composição bacteriana da microbiota vaginal e a doença. Além disso, é possível que apenas certas cepas bacterianas sejam capazes de proteger e outras de promover processos de doenças. Portanto estudos buscando entender os mecanismos desta interação são necessários para identificar as espécies mais protetoras (Mitra et al., 2016). Esta informação pode apresentar a oportunidade para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos sob a forma de probióticos, para prevenir a infecção por HPV, promover a eliminação viral em mulheres infectadas, diminuir os riscos de displasia cervical e assim reduzir os efeitos adversos associados aos métodos de tratamento atuais (Kyrgiou et al., 2014; Arbyn et al., 2008).

O Laboratório de Imunomodulação do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo recentemente publicou um trabalho de caracterização do infiltrado inflamatório global de pacientes com lesões precursoras, com carcinoma cervical invasivo e em tecidos controles. Neste trabalho foi observada uma forte correlação negativa entre células T e neutrófilos, o que pode representar um marcador prognóstico. Dados na literatura mostram que apesar da alta frequência de células T no tecido neoplásico o sistema imune não é capaz de eliminar o tumor. Mostrando que o câncer cervical está associado com uma falha na resposta imune das células T helper 1 e da resposta citotóxica das células T CD8<sup>+</sup> (Welters et al. 2003; de Jong A et al. 2004; Nakagawa M et al. 2000). Sendo assim, sabendo que as bactérias interagem constantemente com células inflamatórias e possuem um papel imunomodulador, buscamos utilizar os dados já coletados das frequências de células inflamatórias infiltrantes na busca de um possível perfil de correlação com a microbiota das pacientes e associar com o perfil de expressão de citocinas.

Neste trabalho, estamos coletando citologias líquidas da cérvice uterina de doadoras controle, pacientes com lesões precursoras (baixo e alto grau) e câncer invasivo. Uma vez coletadas, a fração celular é separada da líquida. A fração líquida será utilizada para quantificação de citocinas, enquanto que a fração celular utilizamos para a extração de DNA. Com as amostras de DNA estamos amplificando o fragmento V4 da fração 16S do DNA bacteriano para o levantamento da diversidade nos diferentes graus de progressão da doença. Ao término das amplificações as amostras serão sequenciadas e buscaremos associações entre a expressão de citocinas e a diversidade encontrada. Até o momento conseguimos coletar e preparar a biblioteca 16S de um total de 30 amostras.



Figura 1 - Gráfico demonstrando a distribuição das amostras em que a obtenção da biblioteca 16S foi concluída.



Figura 2 - Gel de agarose 2%. O gel mostra as amostras pósamplificação do fragmento 16S e inserção das sequências de identificação, com o tamanho esperado.

#### (Manuscrito em elaboração)

#### THE ROLE OF RECK SUPER EXPRESSION IN HPV-ASSOCIATED TUMORIGENESIS

<u>Suellen Herbster</u> (1)\*, Marina Trombetta-Lima (2), Andressa Paladino (1), Paulo Thiago de Souza-Santos (3), Caio Raony Farina Silveira (4), Mari Cleide Sogayar (2), Ana Paula Lepique (4), Enrique Boccardo (1).

(1) Laboratory of Oncovirology, Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil. (2) Cell and Molecular Therapy Center (NUCEL) – NETCEM, School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil. (3) Molecular Carcinogenesis Program, Brazilian National Cancer Institute, Rio de Janeiro, Brazil. (4) Laboratory of Immunomodulation, Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

HPV-induced carcinogenesis comprises alterations in extracellular matrix (ECM) components such as matrix metalloproteinases (MMP) and its regulator REversion-inducing Cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK). RECK inhibits MMP-2, MMP-9 and MMP-14 (MT1-MMP) activation and its expression is frequently lost in human cancers. HPV16 E6 and E7 oncoproteins expression is associated with MMP-9 upregulation and RECK down-regulation. Also, RECK expression inversely correlates with lesion grade in cervical samples. Here, we analyzed the effect of RECK super expression in HPV associated tumorigenesis. Nude mice inoculated s.c. with either SiHa, SW756 or C33A super expressing RECK (RECK+) showed extended tumor-free and overall survival period when compared with animals receiving control tumor cells. SiHa RECK+ tumors presented higher relative number of inflammatory infiltrate and NK cells while presented a decreased relative number of macrophages. Tumor cells viability relatively decreased in both SiHa and C33A RECK+ tumors whereas endothelial cells viability was lower in SiHa RECK+ tumors. SiHa RECK+, SW756 RECK+ and C33A RECK+ showed a significant reduction in anchorage independent colony formation efficiency when compared to control cells. However, neither of the cell lines presented differences in cell doubling time or clonogenic potential. In summary, RECK expression was associated with (i) higher tumor free survival for both cell lines, (ii) alterations in intratumoral cells populations frequency and/or viability in SiHa RECK+ tumors and (iii) reduced colony formation efficiency for all cell lines. Our observations indicate that RECK super expression could differently affect tumorigenic potential of HPV positive and negative cervical cancer derived cells.

ETHICAL APPROVAL AND FINANTIAL SUPPORT: CEUA (protocol 138, sheet 13, book 03), Financial support: FAPESP (2013/27006-9; 2010/20002-0) and INCT-HPV (FAPESP 2008/57889-1 / CNPq 573799/2008-3).
# SCIENTIFIC **Reports**

Received: 16 March 2017 Accepted: 19 July 2017 Published online: 21 August 2017

## **OPEN** Local and systemic immunomodulatory mechanisms triggered by Human Papillomavirus transformed cells: a potential role for G-CSF and neutrophils

Karla Lucia Fernandez Alvarez<sup>1</sup>, Mariana Beldi<sup>2</sup>, Fabiane Sarmanho<sup>2</sup>, Renata Ariza Marques Rossetti<sup>1</sup>, Caio Raony Farina Silveira<sup>1</sup>, Giana Rabello Mota<sup>3</sup>, Maria Antonieta Andreoli<sup>8</sup>, Eliana Dias de Carvalho Caruso<sup>2</sup>, Marcia Ferreira Kamillos<sup>2</sup>, Ana Marta Souza<sup>2</sup>, Haydee Mastrocalla<sup>2</sup>, Maria Alejandra Clavijo-Salomon 61, José Alexandre Marzagão Barbuto<sup>1</sup>, Noely Paula Lorenzi<sup>2</sup>, Adhemar Longatto-Filho<sup>5,6,7</sup>, Edmund Baracat<sup>2</sup>, Rossana Verónica Mendoza Lopez<sup>4</sup>, Luisa Lina Villa<sup>3,4</sup>, Maricy Tacla<sup>2</sup> & Ana Paula Lepique<sup>1</sup>

Cervical cancer is the last stage of a series of molecular and cellular alterations initiated with Human Papillomavirus (HPV) infection. The process involves immune responses and evasion mechanisms, which culminates with tolerance toward tumor antigens. Our objective was to understand local and systemic changes in the interactions between HPV associated cervical lesions and the immune system as lesions progress to cancer. Locally, we observed higher cervical leukocyte infiltrate, reflected by the increase in the frequency of T lymphocytes, neutrophils and M2 macrophages, in cancer patients. We observed a strong negative correlation between the frequency of neutrophils and T cells in precursor and cancer samples, but not cervicitis. In 3D tumor cell cultures, neutrophils inhibited T cell activity, displayed longer viability and longer CD16 expression half-life than neat neutrophil cultures. Systemically, we observed higher plasma G-CSF concentration, higher frequency of immature low density neutrophils, and tolerogenic monocyte derived dendritic cells, MoDCs, also in cancer patients. Interestingly, there was a negative correlation between T cell activation by MoDCs and G-CSF concentration in the plasma. Our results indicate that neutrophils and G-CSF may be part of the immune escape mechanisms triggered by cervical cancer cells, locally and systemically, respectively.

Cervical cancer is the fourth most common cancer in women worldwide and, according to the World Health Organization (WHO) responsible for 7.5% of women's death by cancer. HPV infection is the main etiological factor for cervical cancer development<sup>1</sup>. After HPV infection, the natural history of cervical cancer is long and,

<sup>1</sup>Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1730, Ed. Biomédicas IV, 05508-900, São Paulo, SP, Brazil. <sup>2</sup>Department of Gynecologic Clinic, School of Medicine, Universidade de São Paulo; Clinics Hospital at the São Paulo University, R. Dr. Enéas de Carvalho aquiar, 255, 5th floor, 05403-000, São Paulo, SP, Brazil. <sup>3</sup>Department of Radiology and Oncology, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, LIM-24. R. Dr. Ovídio Pires de Campos, 255, Radiology Building, 05403-000, São Paulo, SP, Brazil. <sup>4</sup>Center for Translational Research in Oncology, Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, Av. Dr. Arnaldo, 251, 8th floor, 01246-000, São Paulo, SP, Brazil. <sup>5</sup>Laboratory of Medical Investigation, School of Medicine, University of São Paulo, Av. Dr. Arnaldo, 455, office 1159, 01246-903, São Paulo, SP, Brazil. <sup>6</sup>Molecular Oncology Research Center, Barretos Cancer Hospital, R. Antenor Duarte Vilela, 1331, Barretos, 14784-400, São Paulo, SP, Brazil. <sup>7</sup>Life and Health Sciences Research Institute (ICVS), School of Health Sciences, University of Minho, R. da Universidade and ICVS/3B's - PT Government Associated Laboratory, 4704-553, Braga/Guimarães, Portugal. <sup>8</sup>Hospital AC Camargo, International Research Center, R. Taguá 440, 01508-010, São Paulo, Brazil. Correspondence and requests for materials should be addressed to A.P.L. (email: alepique@icb.usp.br)

Araujo et al. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases (2017) 23:12 DOI 10.1186/s40409-017-0105-z

## RESEARCH

Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases

**Open Access** 

CrossMark

## Can anti-bothropstoxin-I antibodies discriminate between *Bothrops jararaca* and *Bothrops jararacussu* venoms?

Ricardo Teixeira Araujo<sup>1,2</sup>, Carlos Corrêa-Netto<sup>1,2</sup>, Leonora Brazil-Más<sup>2</sup>, Caio Raony Farina Silveira<sup>3</sup>, Irene Fernandes<sup>3</sup> and Russolina Benedeta Zingali<sup>1\*</sup>

## Abstract

**Background:** Snakes of the genus *Bothrops*, popularly known as pit vipers, are responsible for most cases of snakebite in Brazil. Within this genus, *Bothrops jararacussu* and *B. jararaca* deserve special attention due to the severity of their bites and for inhabiting densely populated areas. Regarding the treatment of snakebites by *Bothrops jararacussu*, questions have been raised about the effectiveness of the specific bothropic antivenom in neutralizing myotoxic effects; however, there are no accurate data for humans. Thus, the development of a differential diagnostic kit for this species would be of great interest because it provides, for healthcare professionals, a tool that would allow us to determine whether the accident was caused by *B. jararacussu* or other species of the genus. It would also make it possible to evaluate the specificity of the treatment and to provide data for epidemiological studies.

**Methods:** First, we produced a species-specific polyclonal antibody – a potential biomarker of *Bothrops jararacussu* venom – against bothropstoxin-I (BthTx-I), which is also found in smaller quantities in the venoms of *B. jararaca* from southern Brazil.

**Results:** Polyclonal antibodies against bothropstoxin-I could be separated into several species-specific immunoglobulins. Then, aiming to develop a system of safe and standardized immunoassay, we produced monoclonal antibodies. Seven hybridomas were obtained. Five of them were specific to the venom of *B. jararacussu* and two recognized the venom of *B. jararaca* from the southeastern population. The use of monoclonal antibodies also made it possible to differentiate *B. jararacussu* from *B. jararaca* venom obtained from the southern population. Analyzing the reactivity of monoclonal antibodies against other bothropic venoms, we found mAb Bt-3 to be more specific than others for *B. jararacussu* venom.

**Conclusions:** These results show the potential of BthTx-I for producing monoclonal antibodies that differentiate between *B. jararacussu* and other *Bothrops* species venoms.

Keywords: Bothrops jararacussu, Bothrops jararaca, Bothropstoxin-I, Monoclonal antibodies, Species specificity

<sup>1</sup>Laboratório de Hemostase e Venenos, Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2017 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

<sup>\*</sup> Correspondence: lzingali@bioqmed.ufrj.br; lzingali@gmail.com



#### RESEARCH ARTICLE

## Single Chain Variable Fragments Produced in Escherichia coli against Heat-Labile and Heat-Stable Toxins from Enterotoxigenic E. coli

Christiane Y. Ozaki<sup>1°¤</sup>, Caio R. F. Silveira<sup>1°</sup>, Fernanda B. Andrade<sup>1</sup>, Roberto Nepomuceno<sup>1</sup>, Anderson Silva<sup>1</sup>, Danielle D. Munhoz<sup>1</sup>, Bruno B. Yamamoto<sup>1</sup>, Daniela Luz<sup>1</sup>, Patrícia A. E. Abreu<sup>1</sup>, Denise S. P. Q. Horton<sup>1</sup>, Waldir P. Elias<sup>1</sup>, Oscar H. P. Ramos<sup>2</sup>, Roxane M. F. Piazza<sup>1</sup>\*

1 Laboratório de Bacteriologia, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brasil, 2 CEA, iBiTecs, SIMOPRO, Gif sur Yvette, France

These authors contributed equally to this work.

¤ Current address: Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, SP, Brasil

\* roxane@butantan.gov.br

## Abstract

## Background

Diarrhea is a prevalent pathological condition frequently associated to the colonization of the small intestine by enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) strains, known to be endemic in developing countries. These strains can produce two enterotoxins associated with the manifestation of clinical symptoms that can be used to detect these pathogens. Although several detection tests have been developed, minimally equipped laboratories are still in need of simple and cost-effective methods. With the aim to contribute to the development of such diagnostic approaches, we describe here two mouse hybridoma-derived single chain fragment variable (scFv) that were produced in *E. coli* against enterotoxins of ETEC strains.

#### Methods and Findings

Recombinant scFv were developed against ETEC heat-labile toxin (LT) and heat-stable toxin (ST), from previously isolated hybridoma clones. This work reports their design, construction, molecular and functional characterization against LT and ST toxins. Both antibody fragments were able to recognize the cell-interacting toxins by immunofluorescence, the purified toxins by ELISA and also LT-, ST- and LT/ST-producing ETEC strains.

## Conclusion

The developed recombinant scFvs against LT and ST constitute promising starting point for simple and cost-effective ETEC diagnosis.



## OPEN ACCESS

Citation: Ozaki CY, Silveira CRF, Andrade FB, Nepomuceno R, Silva A, Munhoz DD, et al. (2015) Single Chain Variable Fragments Produced in *Escherichia coli* against Heat-Labile and Heat-Stable Toxins from Enterotoxigenic *E. coli*. PLoS ONE 10(7): e0131484. doi:10.1371/journal.pone.0131484

Editor: Michel R. Popoff, Institute Pasteur, FRANCE

Received: March 24, 2015

Accepted: June 1, 2015

Published: July 8, 2015

Copyright: © 2015 Ozaki et al. This is an open access article distributed under the terms of the <u>Creative Commons Altribution License</u>, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: This research was supported by grants 11/ 12928-2 from São Paulo Research Foundation (FAPESP) and from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – 301302/2013-8) to RMFP and by grants 04/08297-3 from São Paulo Research Foundation (FAPESP) to OHPR. CYO, CRFS, DDM and FBA were recipients of FAPESP fellowships (06/60258-8, 10/14659-6, 11/ 24111-0 and 11/22108-2, respectively). The funders had no role in study design, data collection and