



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José do Rio Preto

Bruna Stuqui

**Altered immune response in benign HPV positive genital
lesions**

São José do Rio Preto
2017

Bruna Stuqui

Altered immune response in benign HPV positive genital lesions

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof^a. Dr^a. Paula Rahal

Coorientadora: Paola Jocelan Scarin
Provazzi Trabulsi

São José do Rio Preto

Coorientadora: Paola Jocelan Scarin Provazzi Trabulsi

Stuqui, Bruna.

Altered immune response in benign HPV positive genital lesions /
Bruna Stuqui. – São José do Rio Preto, 2017
67 f.

Orientadora: Paula Rahal

Coorientadora: Paola Jocelan Scarin Provazzi Trabulsi

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de
Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia. 2. Papillomaviridae. 3. Doença do vírus papiloma. 4.
Virologia. 5. Condiloma acuminado. 6. Resposta imune. 7. Virus. I.
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de
Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 576.858

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Bruna Stuqui

Altered immune response in benign HPV positive genital lesions

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Paula Rahal
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof^a. Dr^a Tatiana Rabachini

Prof^a. Dr^a Cristiane Damas Gil

Prof^a. Dr^a Patricia Simone Leite Vilamaior

Prof^a. Dr^a Rejane Maira Góes

São José do Rio Preto
15 de setembro de 2017

“A vida deveria ser uma celebração contínua, um festival de luzes por todo o ano. Somente então você pode se desenvolver, você pode florir.

Transforme pequenas coisas em celebração... Tudo o que você faz deveria expressar a si próprio; deveria ter a sua assinatura. Então a vida se torna uma celebração contínua.”

Osho

Dedico este trabalho à minha família, aos meus pais Rubens Stuqui e Elisabete José Marchezini Stuqui, as minhas irmãs Tamires Stuqui e Maiara Stuqui e ao meu marido André Luis Giacometti Conceição!

Em especial aos meus pais, Rubens e Elisabete, anjos que Deus escolheu para me educar e me amar e que cumprem sua missão muito bem. Obrigada por todos os esforços para que eu atingisse meus objetivos, o respeito às minhas decisões e o apoio aos meus sonhos. Amo vocês e sempre estarei presente para ajudá-los!!!

Sou super grata a Deus por fazer parte desta família!!!

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar claramente presente na minha vida, me dando força e sabedoria para conduzir cada dia.

À minha orientadora Profa. Dra. Paula Rahal e à minha coorientadora Dra. Paola Jocelan Scarin Provazzi Trabulsi, pela oportunidade e por contribuírem com este trabalho.

À CAPES pelo apoio financeiro.

À minha amiga Mari (Mariana Marcielo de Jesus) por entender minhas restrições durante a minha gestação e me ajudar no manuseio dos reagentes tóxicos durante os experimentos de imuno-histoquímica. Obrigada por ajudar na bancada e nas discussões para delinear os experimentos.

À Dra. Silvana Maria Quintana e à Dra. Patrícia Pereira dos Santos Melli, por cederem gentilmente as amostras de condiloma e estarem sempre disponíveis a ajudar.

Ao Dr. Gilberto Vaughan e à Dra. Lívia Maria Gonçalves Rossi, por cederem gentilmente as placas e reagentes para os ensaios de TaqMan Array.

À Dra. Márcia Guimarães Silva, por ceder gentilmente as amostras parafinadas de condiloma e pela contribuição com a montagem do Tissue Microarray.

Ao Dr. Flávio de Oliveira Lima pelas análises histopatológicas e pela contribuição com a montagem do Tissue Microarray.

Ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE -UNESP), pela oportunidade de adquirir conhecimentos valiosos e pela permissão do uso de suas dependências para realização de meu Doutorado.

Aos professores do Curso de Ciências Biológicas e do Programa de Pós Graduação em Microbiologia, pelo papel essencial na minha formação.

Ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia, pela disponibilidade e apoio.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo, por estimular a formação continuada de seus servidores permitindo que utilizem parte da sua carga horária semanal para a realização de pós-graduação.

Aos queridos companheiros de Laboratório de Estudos Genômicos pela amizade e desabafos.

À Lenira, pela amizade e dedicação ao seu trabalho que é fundamental ao laboratório.

Ao meu marido, amigo, companheiro, cúmplice, André Luis Giacometti Conceição. Meu braço direito, esquerdo e tudo o que sempre precisei para seguir em frente. Obrigada pelos incentivos, compreensão, amor e ajuda em vários experimentos e análises. Que nossa união se fortaleça a cada dia.

“Sem você sou pá-furada” – Los Hermanos / Rodrigo Amarante

Te amo!

A minha filha, Lara, que ainda no seu desenvolvimento intrauterino precisou conviver com toda adrenalina e estresse relacionados à vida acadêmica. Você trouxe muito mais brilho e motivação para as fases finais do meu doutorado.

Aos meus familiares e demais amigos, pelo apoio, pelo companheirismo e pelos momentos alegres proporcionados em minha vida.

RESUMO

Introdução. A infecção por Papilomavírus humano (HPV) está relacionada a doenças benignas e malignas, sendo o grau de patologia dependente do tipo viral, da resposta imune do hospedeiro e de fatores ambientais. O condiloma acuminado são lesões hiperproliferativas benignas encontradas principalmente em epitélios não queratinizados. O objetivo deste estudo foi identificar genes e vias celulares associadas às alterações imunes em indivíduos que não eliminaram espontaneamente o vírus e, assim, desenvolveram verrugas genitais. Material e Métodos. Vinte e sete biópsias de condiloma foram genotipadas por sequenciamento direto e seus cDNAs foram organizados em três *pools* - HPV 6, HPV 11 e *pool* HPV negativo (margem). Noventa e dois genes relacionados à resposta imune foram analisados por meio da metodologia de TaqMan Array. Seis genes com expressão diferencial obtidos a partir do ensaio de expressão foram validados por qPCR. Além disso, cinquenta e seis amostras parafinadas de condiloma foram submetidas a imunohistoquímica com anticorpos primários para CD1a, FOXP3, CD3, CD4, CD8 e interferon gama (IFNG). Resultados. Todas as vinte e sete amostras foram HPV positivas e apresentaram HPV 6 (70,4%) ou HPV 11 (29,6%). A análise de expressão gênica resultou em 31 genes diferencialmente expressos em lesões de condiloma acuminado. Seis desses genes tiveram a expressão validada por qPCR. O gene *GZMB* foi regulado positivamente em 63% das amostras, enquanto o *IFNG*, *IL12B* e *IL8* foram superexpressos em 81,5%, 55,5% e 78% respectivamente. Por outro lado, o gene *NFATC4* apresentou baixa expressão em 63% das amostras e *IL7* em 30% delas. As análises imunohistoquímicas mostraram maior abundância de leucócitos polimorfonucleares em todas as amostras. Células de Langerhans e células T reguladoras (Tregs) foram encontradas em poucas biópsias de condiloma acuminado.

Conclusão. A grande quantidade de leucócitos polimorfonucleares, citocinas pró-inflamatórias e redução de células de Langerhans observadas neste trabalho sugerem uma tentativa de resposta imune que falha em induzir eficientemente uma resposta adaptativa.

Palavras-chave: HPV, condiloma acuminado, resposta imune.

ABSTRACT

Background. Human papillomavirus (HPV) infection is related to several benign and malignant diseases, the pathology degree is dependent of viral type, host immune response and local environmental factors. Condyloma acuminata are benign proliferative disease, a category of anogenital warts, found mainly on non-keratinized epithelia. The aim of this study was highlight candidate genes and pathways associated with the immune changes in individuals that not eliminated spontaneously the virus and thus developed genital warts. Methods. Twenty-seven condyloma biopsies were genotyped by sequencing and their cDNAs were arranged in three pools - HPV 6, HPV 11 and HPV negative pool (margin). Ninety-two immune-related genes were analyzed by TaqMan Array Immune Response assay. Six genes with differential expression in the TaqMan Array were validated by qPCR. Fifty-six condyloma paraffin-embedded were submitted a immunostaining with primary antibodies to CD1a, FOXP3, CD3, CD4, CD8 and interferon gamma (IFNG). Results. All the twenty-seven samples were HPV positive and presented HPV 6 (70,4%) or HPV 11 (29,6%). Gene expression analysis (TaqMan Array) resulted in 31 differentially expressed genes in condyloma acuminata lesions. Six of these genes had the expression validated by qPCR. The GZMB gene was up-regulated in 63% of the samples, while IFNG, IL12B and IL8 were upregulated in 81.5%, 55.5% and 78%, respectively. On the other hand, the NFATC4 gene was down-regulated in 63% of the samples and IL7 in 30% of them. The immunohistochemical analyzes showed greater abundance of polymorphonuclear leukocytes in all samples. Langerhans and regulatory T cells were found in few biopsies of condyloma acuminata. Conclusion. The large amounts polymorphonuclear cells, cytokines and lack of Langerhans cells observed in this work suggest an attempt immune response that fails to induce efficiently an adaptive response.

Keywords: HPV, condyloma acuminata, immune response.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----|
| Capítulo I..... | 175 |
| 1. INTRODUÇÃO | 16 |
| 1.1. Papilomavírus..... | 16 |
| 1.2. Papilomavírus Humano (HPV)..... | 17 |
| 1.3. Ciclo replicativo e patogênese..... | 19 |
| 1.4. Condiloma acuminado..... | 21 |
| 1.5. Transmissão e prevenção | 23 |
| 1.6. Resposta imunológica | 25 |
| 2. OBJETIVO | 27 |
| 3. REFERÊNCIAS | 28 |
| Capítulo II..... | 36 |
| 1. ARTIGO CIENTÍFICO | 37 |
| 2. SUPPLEMENTARY MATERIAL..... | 63 |
| Capítulo III..... | 66 |
| 1. CONCLUSÕES | 67 |

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

| | |
|----------------|--|
| AGTR1 | <i>Angiotensin II receptor type 1</i> |
| BCL2 | <i>B-cell CLL/lymphoma 2</i> |
| C3 | <i>Complement C3</i> |
| CA | Condiloma acuminado |
| CCL3 | <i>Chemokine (C-C motif) ligand 3</i> |
| CCL19 | <i>C-C motif chemokine ligand 19</i> |
| CCL21 | <i>C-C motif chemokine ligand 21</i> |
| CCR7 | <i>C-C chemokine receptor type 7</i> |
| CD1a | Molécula de membrana CD1a |
| CD3 | Molécula de membrana CD3 |
| CD4 | Molécula de membrana CD4 |
| CD8 | Molécula de membrana CD8 |
| CD19 | <i>CD19 molecule</i> |
| CD38 | <i>CD38 molecule</i> |
| CD80 | <i>CD80 molecule</i> |
| CD83 | <i>CD83 molecule</i> |
| CD86 | <i>CD86 molecule</i> |
| CSF3 | <i>Colony stimulating factor 3</i> |
| CXCL10 | <i>C-X-C motif chemokine ligand 10</i> |
| CXCL11 | <i>C-X-C motif chemokine ligand 11</i> |
| CYP1A2 | <i>Cytochrome P450 family 1 subfamily A member 2</i> |
| DAB | Solução 3,3'-diaminobenzidina |
| DC | <i>Dendritic cell</i> |
| dNTP | Desoxirribonucleótidos 5'-trifosfatados |
| FOXP3 | Molécula nuclear FOXP3 |
| HPV | Papilomavírus humano |
| FN1 | Fibronectina 1 |
| GZMB | <i>Granzyme B</i> |
| HLADRB1 | <i>Major Histocompatibility Complex, class II, DR beta 1</i> |

| | |
|---------------|--|
| ICAM1 | <i>Intercellular adhesion molecule 1</i> |
| ICOS | <i>Inducible T-cell costimulator</i> |
| IFNG | <i>Interferon gamma</i> |
| IL12A | <i>Interleukin 12B</i> |
| IL12B | <i>Interleukin 12B</i> |
| IL17A | <i>Interleukin 17A</i> |
| IL1A | <i>Interleukin 1A</i> |
| IL1B | <i>Interleukin 1B</i> |
| IL7 | <i>Interleukin 7</i> |
| IL8 | <i>Interleukin 8</i> |
| IL9 | <i>Interleukin 9</i> |
| INCA | Instituto Nacional do Câncer |
| LC | <i>Langerhans cells</i> |
| LCR | <i>Long Control Region</i> |
| LTA | <i>Lymphotoxin alpha</i> |
| MHC | Complexo principal de histocompatibilidade |
| NFATC4 | <i>Nuclear factor of activated T-cells 4</i> |
| NFκB | <i>Factor nuclear kappa B</i> |
| NOS2 | <i>Nitric oxide synthase 2, inducible</i> |
| ORF | <i>Opening Reading Frame</i> |
| pb | Pares de bases |
| PAMPs | Padrões moleculares associados a patógenos |
| PCR | Reação em cadeia da polymerase |
| PF4 | <i>Platelet factor 4</i> |
| PRR | Receptores de Reconhecimento de padrões |
| PV | Papilomavírus |
| qPCR | PCR quantitativo |
| SELE | <i>Selectin E</i> |
| SKI | <i>SKI proto-oncogene</i> |
| TLRs | <i>Toll-like Receptors</i> |
| URR | <i>Upper regulatory region</i> |

1. INTRODUÇÃO

1.1. Papilomavírus

Os papilomavírus (PV) são vírus que infectam o epitélio dos vertebrados, como aves, répteis e mamíferos, podendo permanecer assintomáticos ou desencadear o desenvolvimento de neoplasias (BERNARD et al., 2010). Possuem um capsídeo icosaédrico de 52–55 nm e DNA dupla fita circular com genoma entre 6,953 pares de bases (bp) (*Chelonia mydas* papillomavirus type 1) a 8,607 bp (Cotton rabbit papillomavirus type 1) (DUNOWSKA et al., 2014; VAN DOORSLAER, 2013). O gene *L1*, um dos 8 genes tipicamente presentes neste genoma, é responsável por codificar a proteína principal do capsídeo e possui alto nível de conservação de sua sequência nucleotídica, dessa forma homologias em sua sequência são utilizadas na classificação e construção de filogenias dos PVs (FAUQUET et al., 2005).

Novos papilomavírus são reconhecidos quando a sequência de nucleotídeos da região *L1* diverge em mais de 10% dos outros tipos já conhecidos. Diferenças na identidade de *L1* entre 2% e 10% definem um novo subtipo, e aqueles com menos de 2% de diferença de nucleotídeos identificam variantes moleculares de HPV (BERNARD, 2005; DE VILLIERS et al., 2004). No entanto, entre variantes moleculares a variabilidade de nucleotídeos pode ser de até 5% na LCR, sendo esta região genômica comumente utilizada para caracterização de variantes (HO et al., 1993).

Os PVs pertencem a família *Papillomaviridae* e apresentam tropismo por tecido epitelial e mucoso. Mais de 280 tipos de PVs foram descritos sendo que destes mais de 200 infectam humanos e são conhecidos como Papilomavírus Humano (HPV) (MUNDAY, 2014). Estudos baseados em filogenia molecular sugerem que estes vírus se originaram na África e se disseminaram para todos os continentes (BERNARD, 1994). A domesticação animal favoreceu a transmissão dos

PVs e, com isso, novas estratégias de adaptação foram necessárias para garantir a infecção e coevolução com novos hospedeiros (GOTTSCHLING et al., 2011; GOTTSCHLING et al., 2007).

1.2. Papilomavírus Humano (HPV)

Os HPVs pertencem aos gêneros *Alphapapillomavirus*, HPVs que infectam preferencialmente mucosa oral ou anogenital em humanos e primatas; *Betapapillomavirus*; *Gammapapillomavirus*; *Nupapillomavirus* e *Mupapillomavirus*, HPVs que infectam preferencialmente pele de humanos (FAUQUET et al., 2005).

O genoma do HPV, com aproximadamente oito mil pares de base, possui oito sequências abertas de leitura, do inglês *open reading frames* (ORFs), as quais codificam seis proteínas precoces (E1, E2, E4, E5, E6 e E7), associadas com a regulação dos genes virais e transformação celular, e duas tardias (L1 e L2), que originam o capsídeo viral (KUMARASWAMY; VIDHYA, 2011; PALEFSKY; HOLLY, 1995) (Figura 1). Existe ainda uma região regulatória, não codificadora, de 400 a 1.000 pares de bases que é conhecida pelas denominações *long control region* (LCR) ou *upper regulatory region* (URR), situada entre os genes L1 e E6 (TYRING, 2000).

Os HPVs são classificados como cutâneos ou mucosos de acordo com o sítio de infecção (BERNARD et al., 2010). Os tipos mucosos possuem diferenças genótípicas, decorrentes de alterações na sequência de bases de E6 e E7, que permitem classificá-los como de baixo risco, risco intermediário ou alto risco oncogênico (TANG, 2002). A infecção por HPVs de alto risco, com tropismo por tecido mucoso (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, e 68) (JOSHI et al., 2014), pode sofrer progressão neoplásica para lesões intra-epiteliais de alto grau e cânceres, especificamente de colo de útero, peniano, anal e orofaringe. No entanto, infecções por HPV de baixo risco, como HPV 6 e 11, raramente

desencadeiam carcinogênese, sendo responsáveis por lesões benignas (HAWLEY-NELSON et al., 1989).

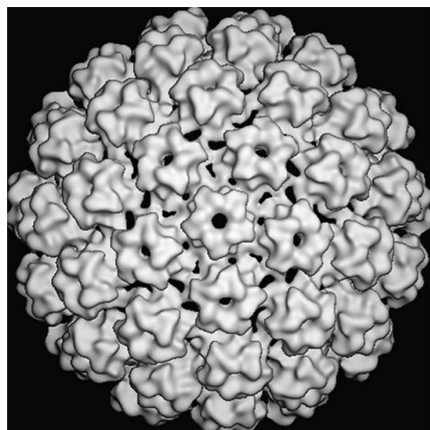
Em muitas populações, mais de 50% das mulheres (até 80%) (EINSTEIN et al., 2009; MYERS et al., 2000) e homens sexualmente ativos são infectados por HPV em algum momento da vida (GIULIANO et al., 2008). Os HPVs de alto risco são frequentemente associados a diversos cânceres, como o de colo de útero, um dos principais tipos de câncer que causam a morte de mulheres em todo mundo (ARBYN et al., 2011; COGLIANO et al., 2005). Infecções com os tipos de HPV de baixo-risco, como o HPV 6, 11 e 42, estão ligadas a lesões benignas, como as verrugas e papilomas, as quais não tem risco de transformação carcinogênica (JOSHI et al., 2014; PARK et al., 2014).

O grau da patologia desencadeada pelo HPV depende do tipo viral, da resposta imune do hospedeiro e de fatores ambientais. A maioria das infecções são transientes, com cura espontânea dentro de um ano em 60 a 70% dos casos e em 2 anos em 91% dos casos (GRAVITT, 2011; RODRIGUEZ et al., 2008).

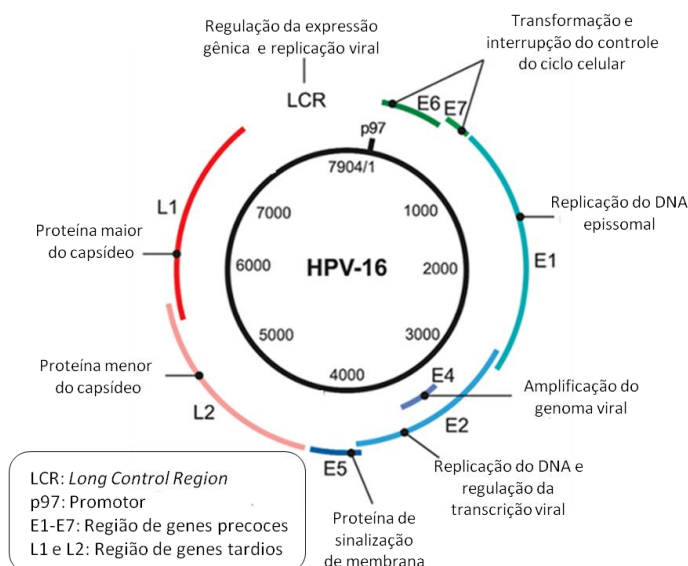
No Brasil, foram relatados 16.340 novos casos de câncer de colo de útero somente no ano de 2016 (INCA, 2017). Embora a maioria das infecções por HPV são eliminadas espontaneamente, as lesões cervicais podem se desenvolver em mulheres com infecção persistente por HPVs de alto risco (VILLA, 2003). Entre os HPVs de alto risco, o HPV 16 é o mais frequente em câncer cervical, sendo detectado em mais da metade dos casos (ZUR HAUSEN, 2009).

Figura 1. Reconstrução por criomicroscopia eletrônica do capsídeo icosaédrico do Papilomavírus humano **(A)** e do genoma de HPV 16 **(B)**. Adaptado de Buck, Day e Trus (BUCK; DAY; TRUS, 2013) **(A)** e de Rautava e Syrjänen (RAUTAVA; SYRJANEN, 2011) **(B)**.

A



B



1.3. Ciclo replicativo e patogênese

O ciclo replicativo do Papilomavírus humano está fortemente ligado a diferenciação celular dos queratinócitos do hospedeiro. A entrada do HPV no corpo humano requer um ferimento epitelial que permita que o vírus entre nas camadas basais do epitélio (SYRJÄNEN; SYRJÄNEN, 2000). Eventos no início da prófase do ciclo celular, como desintegração do envoltório nuclear, são críticos para estabelecimento da infecção por HPV, por isso o Papilomavírus Humano infecta somente células do epitélio basal (células não diferenciadas em processo de divisão) (PYEON et al., 2009).

Após a infecção, o vírus se estabelece como um epissomo no núcleo, com baixo número de cópias. Neste estágio, a replicação viral é considerada não produtiva; proteínas E1, E2, E6 e E7 são expressas em níveis baixos e os vírions não são formados (RAUTAVA; SYRJANEN, 2011). À medida que as células infectadas se diferenciam e atingem camadas superiores do epitélio, o vírus inicia a fase produtiva de seu ciclo

replicativo, caracterizada pela replicação do episssomo viral em mais de 1000 cópias por célula (LEHOUX et al., 2012). Os níveis de proteínas virais necessárias à replicação aumentam (E1, E2, E4, E5) e proteínas do capsídeo (L1 e L2) são produzidas em células epiteliais maduras. Nas células terminalmente diferenciadas, o DNA viral é empacotado em capsídeos e liberado na superfície do epitélio. As infecções persistentes por HPV aumentam a possibilidade de transformação, levando primeiro à imortalização celular e mais tarde à malignidade (RAUTAVA; SYRJANEN, 2011).

A integração do genoma do HPV no cromossomo da célula hospedeira representa um evento frequente durante a progressão maligna em infecções por HPV de alto risco. Aparentemente não existem *hotspots* para integração do genoma viral no cromossomo do hospedeiro (ZIEGERT et al., 2003), entretanto, em 40% dos cânceres de colo de útero a integração do genoma viral ocorre em regiões transcricionalmente ativas, resultando na perda da expressão gênica (KRAUS et al., 2008; SCHMITZ et al., 2012).

A integração frequentemente leva a deleções nas sequências virais. As proteínas E6 e E7 são proteínas virais consistentemente expressas em carcinomas cervicais (BAKER et al., 1987). A expressão dos genes E6/E7 é desregulada após integração do genoma viral, devido à frequente perda do repressor transcricional, E2. Além disso, a integração do DNA viral no genoma da célula hospedeira leva ao aumento da estabilidade do RNAm codificado pelos oncogenes E6/E7, contribuindo para o aumento da expressão dessas proteínas (JEON; LAMBERT, 1995).

Um dos mecanismos bem documentados pelo qual os HPVs de alto risco causam câncer de colo de útero é a inativação do supressor de tumor retinoblastoma (Rb), mediada pela proteína E7, que desencadeia progressão do ciclo celular (JONES; THOMPSON; MUNGER, 1997). Entretanto, este não é o único mecanismo de imortalização celular pelos

HPVs de alto risco. A proteína viral E6 estimula a degradação de p53, um supressor de tumor. E6 complexada com a proteína de associação a E6 (E6-AP) funciona como ubiquitina ligase e desencadeia a ubiquitinação de p53 para degradação (SCHEFFNER et al., 1993).

Além da degradação de p53, a proteína viral E6 interfere na função de enzimas chaves de regulação epigenética. A atividade de histonas metiltransferases em promotores responsivos a p53 é importante para interação desse supressor de tumor com a cromatina e ativação da transcrição de genes (HSU et al., 2012). Entretanto, em células infectadas por HPV, a proteína E6 interage com essas enzimas e inibe sua função, desencadeando a repressão de genes controlados por p53, como genes apoptóticos. Em adição aos efeitos de proliferação celular, E6 e E7 interferem em componentes específicos da resposta imune inata, inibindo, por exemplo, NF- κ B e facilitando a persistência da infecção e imortalização celular (VANDERMARK et al., 2012).

A proteína E6 também participa da regulação transcricional de alguns genes, positivamente ou negativamente, por mecanismos dependentes ou independentes de p53 (CULLMANN et al., 2009; PARROCHE et al., 2011; VELDMAN et al., 2001). A região carboxi-terminal da proteína E6 de todos HPVs de alto risco possui um domínio, conhecido como PBM, capaz de reconhecer e se ligar a proteínas humanas com domínios PDZ (LEE; WEISS; JAVIER, 1997) e desencadear alterações no ciclo celular (STUQUI et al., 2016).

1.4. Condiloma acuminado

O condiloma acuminado (CA) também conhecido como verrugas genitais refere-se a lesões benignas atribuídas principalmente a infecção pelos HPVs do tipo 6 e 11, embora a co-infecção com HPVs de alto risco seja possível (BROWN et al., 1999; STUREGARD et al., 2013). Os CAs são uma categoria de verrugas anogenitais que se desenvolvem em epitélio não queratinizado, caracterizadas como pápulas únicas ou

múltiplas na vulva, períneo, área perianal, ânus, vagina, cervix, pênis, escroto e uretra (PATEL et al., 2013). Representam o tipo de doença sexualmente transmissível (DST) mais comum, sendo que até 20% dos indivíduos portadores de verrugas genitais podem apresentar outros tipos de DSTs (LEONARD et al., 2014).

Além da infecção por HPVs do tipo 6 e 11, múltiplos parceiros sexuais, relações sexuais não protegidas, história de infecções sexualmente transmissíveis, tabagismo, uso de contraceptivos orais e imunodeficiência são fatores de risco para o condiloma (NELSON; STOCKDALE, 2013). Embora o uso correto do preservativo possa diminuir a transmissão do HPV, a proteção não é totalmente eficiente uma vez que o HPV pode infectar áreas não cobertas pelo látex do preservativo (MANHART; KOUTSKY, 2002; WINER et al., 2006).

Esse tipo de lesão pode ser assintomática, entretanto, pacientes que desenvolvem CA frequentemente relatam dor, prurido ou sangramento. A doença em sua forma latente pode se tornar ativa, principalmente na gestação e imunossupressão (LEONARD et al., 2014). Geralmente há um longo período de incubação viral, sendo que o aparecimento clínico das verrugas genitais pode ocorrer somente após 2,9 meses da infecção, o que facilita a transmissão viral para novos parceiros sexuais (WINER et al., 2005).

Em 30% a 40% dos casos de condiloma não tratados ocorre regressão, nos demais casos a lesão pode permanecer inalterada ou aumentar o tamanho e número das verrugas genitais. As terapias disponíveis envolvem destruição da lesão por meio de podofilox, crioterapia, ácido bórico ou ácido tricloroacético, excisão cirúrgica ou modulação imunológica. Entretanto, mesmo após o tratamento o índice de recorrência das lesões é alto (13 a 65%) (HU; GOLDIE, 2008).

O diagnóstico de CA é feito principalmente na rotina clínica por análise visual, somente nos casos de diagnóstico incerto ou de lesões que não respondem a terapia a amostra é submetida a análise

histopatológica (GORMLEY; KOVARIK, 2012). Embora os condilomas não representem altas taxas de morbidade e mortalidade, estão frequentemente associados a desconfortos médicos e psicológicos durante o diagnóstico e tratamento (NELSON; STOCKDALE, 2013).

1.5. Transmissão e prevenção

A transmissão de HPVs do tipo cutâneo envolve contato físico entre verrugas presentes na região epitelial queratinizada e pele normal, gerando microlesões que permitem o alcance do epitélio basal pelas partículas virais. A liberação dos vírions inclui uma combinação de filamentos de queratina, a atuação da proteína viral E4, além de proteases do hospedeiro (DOORBAR, 2013; SINGH et al., 2012). Da mesma maneira, as infecções por HPV do tipo mucoso ocorrem após o desenvolvimento de microabrasões na região genital e anal durante as relações sexuais. A maturação vertical dos queratinócitos infectados completa o ciclo replicativo viral culminando com a liberação dos vírions nas camadas superiores das verrugas (CHRISTENSEN, 2016). O uso de preservativo é recomendado, entretanto, o grau de proteção oferecida pelo látex não é claro (MANHART; KOUTSKY, 2002; WINER et al., 2006).

Durante a gestação, a proliferação de verrugas genitais pode ocorrer como consequência da imunossupressão induzida pela gravidez. Entretanto, a rota de transmissão vertical não é completamente compreendida (KENNEDY; BOARDMAN, 2008; SANCHEZ-TORICES; CORRALES-MILLAN; HIJONA-ELOSEGUI, 2016). Não existem evidências que o parto cesariano evite transmissão viral e previna o desenvolvimento de doenças causadas pelo HPV, como a papilomatose respiratória infantil. Dessa forma, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC/EUA) recomenda cesariana somente nos casos em que as verrugas genitais estejam obstruindo o canal de parto ou que ofereçam

risco de sangramento excessivo durante o parto vaginal (KENNEDY; BOARDMAN, 2008).

Sabe-se que o tratamento dos CAs reduz a quantidade de partículas virais no epitélio, diminuindo assim a transmissão do HPV, uma vez que a infectividade desse vírus está relacionada com a carga viral (BURCHELL et al., 2006). Entretanto, mesmo depois da erradicação das verrugas, o paciente pode continuar com o vírus latente no seu epitélio (GORMLEY; KOVARIK, 2012). Neste período de latência a transmissão pode ocorrer sem a presença de lesões visíveis (GOON; SONNEX, 2008).

A vacinação é considerada a melhor forma de prevenção, controle e erradicação de doenças virais (RIBEIRO-MULLER; MULLER, 2014). Desde 2006 duas vacinas baseadas em VLPs (partículas semelhantes a vírus) utilizando a proteína L1 do HPV estão disponíveis no mercado (ARALDI et al., 2017). Cervarix (Glaxo-Smith Klein - GSK) é uma vacina bivalente capaz de conferir proteção contra os HPVs de alto risco 16 e 18. Já a vacina Gardasil (Merck) confere proteção contra quatro tipos de HPV, dois de baixo risco (HPV 6 e 11) e dois de alto risco (HPV 16 e 18) (RIBEIRO-MULLER; MULLER, 2014).

A produção de anticorpos contra HPV é maior após vacinação quando comparado com uma infecção natural (OLSSON et al., 2009; VILLA et al., 2005). Além disso, mesmo em pacientes HPV positivos há proteção contra lesões cervicais, anogenitais e de laringe associadas ao HPV após administração da vacina quadrivalente (OLSSON et al., 2009; TJON PIAN GI et al., 2016). Estudos reportam 100% de proteção contra lesões associadas ao HPV, como verrugas genitais e lesões pré-cancerosas no colo do útero, vagina e vulva após administração profilática de três doses da vacina quadrivalente (SATTLER, 2005; (VILLA et al., 2006). Dessa forma, espera-se que a vacinação de adolescentes e adultos jovens resulte em grande redução dos cânceres associados ao HPV, além das neoplasias intraepiteliais de diferentes graus e verrugas genitais (VILLA et al., 2006).

1.6. Resposta imunológica

Os queratinócitos, células consideradas sentinelas na resposta imune inata, expressam Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRR) que reconhecem DNA ou RNA viral (NESTLE et al., 2009). Esses receptores, conhecidos como *Toll-like Receptors* (TLRs) são expressos na superfície celular ou em endossomos e reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Os TLRs presentes em endossomos são essenciais no controle de infecções virais, por meio do reconhecimento do ácido nucleico viral, sendo o TLR-9 responsável por reconhecer DNA dupla fita rico em regiões CpGs (NASU; NARAHARA, 2010). A ativação desses receptores promove a produção de citocinas gerando um microambiente pró-inflamatório (YANG et al., 2005).

Em uma infecção cutânea viral genérica a ligação nos TLRs resulta na produção de interferon (IFN) tipo I e citocinas pró-inflamatórias via fator regulatório de IFN (IRF) e fator nuclear *kappa-light-chain-enhancer* de células B ativadas (NFkB), ativando diferentes vias imunológicas (MA; MELIEF; VAN DER BURG, 2017).

As células de Langerhans, principal subtipo de células dendríticas encontradas no tecido epitelial, tem papel essencial em recrutar a resposta imune inata e adaptativa para eliminar o patógeno (PAHNE-ZEPPENFELD et al., 2014). Durante a maturação, após reconhecimento viral, essas células dendríticas iniciam a superexpressão de moléculas de superfície como CD83 e MHC (classe I e II), requeridas para a apresentação de antígenos, assim como moléculas coestimulatórias, CD80 e CD86, e liberação de citocinas pró-inflamatórias. Essas células se tornam responsivas as quimiocinas CCL19 e CCL21 através do receptor CCR7, permitindo sua migração até o linfonodo. Após a migração, as células de Langerhans ativam células T naive que se direcionarão para o tecido infectado a fim de iniciar uma resposta imunológica adaptativa (PAHNE-ZEPPENFELD et al., 2014; SAEKI et al., 1999).

As células T, linfócitos T helper (Th) e linfócitos T citotóxicos, são responsáveis por regular a resposta imunológica adaptativa em cooperação com células apresentadoras de antígeno. A liberação de diferentes citocinas durante um processo infeccioso regula a síntese e ação de outras citocinas. As respostas imunológicas conhecidas como Th1 são responsáveis pela liberação de citocinas imunoestimulatórias como interferon gamma (IFNG), TNF alfa, interleucina 2, interleucina 12, as quais induzem principalmente a imunidade mediada por células. Já as citocinas do tipo Th2 (IL 4, IL 5, IL 6 e IL 10) induzem predominantemente uma resposta imunológica humoral (SPELLBERG; EDWARDS, 2001).

Na infecção pelo HPV a resposta imune inata, caracterizada pela presença de células de Langerhans, células dendríticas, natural killer (NK) e queratinócitos, tem o objetivo de estabelecer uma eficiente resposta adaptativa ao HPV, seja ela humoral ou celular (AMADOR-MOLINA et al., 2013). Os TLR 9 expressos pelos queratinócitos, células alvo do HPV, são importantes no reconhecimento viral e produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF alfa, IL 8, CCL 2, CCL20, CXCL9 e interferon I (MILLER; MODLIN, 2007). As células NK, por sua vez, são capazes de eliminar diretamente células infectadas pelo HPV (RENOUX et al., 2011). A maioria das lesões HPV positivas regride espontaneamente, como resultado de uma resposta mediada por células do tipo Th1, seguida de uma memória imunológica que protege o hospedeiro contra futuras infecções (STANLEY, 2009).

Entretanto, mesmo com a possibilidade de eliminação viral, muitos indivíduos imunocompetentes apresentam infecção persistente pelo HPV e desenvolvem lesões hiperproliferativas, muitas delas recorrentes (LE POOLE; DENMAN; ARBISER, 2008). Os HPVs desenvolveram uma variedade de estratégias de escape da imunidade inata e adaptativa, alcançadas principalmente pela ação das proteínas E6 e E7 (KANODIA; FAHEY; KAST, 2007). Entre os mecanismos de evasão estão a escassez de eventos inflamatórios, infecção localizada ao epitélio, modulação da

expressão de citocinas e quimioatraentes que alteram a apresentação de antígeno, degradação do precursor de IL1-beta e supressão da via do IFN e de E-caderina (NIEBLER et al., 2013; HONG; LAIMINS, 2017; HUBERT et al., 2005).

As células HPV positivas também conseguem evitar o ataque por células NK através da regulação da expressão de seus marcadores de ativação. Em pacientes com lesões cervicais ou lesões precursoras são encontradas células NK com baixa citotoxicidade, evidenciada pelos baixos níveis de receptores NKp30 e NKp46 (GARCIA-IGLESIAS et al., 2009). Em concordância com esses achados, a vacinação com a vacina quadrivalente, além de aumentar os níveis de anticorpos neutralizantes, induz aumento da população de células NK ativas, expressando os receptores NKG2D, NKp30, Nkp46, sendo esta uma via de proteção imunológica (COLMENARES et al., 2012).

Alguns trabalhos descrevem que a infecção crônica pelo HPV envolve uma manipulação viral do microambiente imunológico da lesão, caracterizada pela alteração da proporção de citocinas Th1/Th2, com predominância de células Th2 e células T regulatórias (BAIS et al., 2005; MANGINO et al., 2016). Dessa forma, mesmo em indivíduos saudáveis, uma imunossupressão local poderia explicar a não eliminação da infecção viral, além do desenvolvimento e regressão de condiloma acuminado.

2. OBJETIVO

Identificar, por meio de expressão gênica e análise qualitativa de células imunológicas, alterações locais no sistema imune de indivíduos que não eliminaram espontaneamente o vírus e, com isso, desenvolveram condiloma acuminado.

2.1. Objetivos específicos:

- I. Identificar os genótipos do vírus HPV em DNA obtidos de biópsias frescas de condiloma acuminado;
- II. Obter o padrão de expressão de genes relacionados à resposta imunológica por meio de ensaios de Taqman Array e validação por PCR quantitativo;
- III. Identificar populações de células do sistema imune presentes em amostras parafinadas de condiloma acuminado por meio de imunohistoquímica;

3. REFERÊNCIAS

AMADOR-MOLINA, A. et al. Role of innate immunity against human papillomavirus (HPV) infections and effect of adjuvants in promoting specific immune response. **Viruses**, v. 5, n. 11, p. 2624-42, Oct 28 2013.

ARALDI, R. P. et al. Papillomaviruses: a systematic review. **Genet Mol Biol**, v. 40, n. 1, p. 1-21, Jan-Mar 2017.

ARBYN, M. et al. Worldwide burden of cervical cancer in 2008. **Ann Oncol**, v. 22, n. 12, p. 2675-86, Dec 2011.

BAIS, A. G. et al. A shift to a peripheral Th2-type cytokine pattern during the carcinogenesis of cervical cancer becomes manifest in CIN III lesions. **J Clin Pathol**, v. 58, n. 10, p. 1096-100, Oct 2005.

BAKER, C. C. et al. Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. **J Virol**, v. 61, n. 4, p. 962-71, Apr 1987.

BERNARD, H. U. Coevolution of papillomaviruses with human populations. **Trends Microbiol**, v. 2, n. 4, p. 140-3, Apr 1994.

_____. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. **J Clin Virol**, v. 32 Suppl 1, p. S1-6, Mar 2005.

BERNARD, H. U. et al. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. **Virology**, v. 401, n. 1, p. 70-9, May 25 2010.

BROWN, D. R. et al. Detection of multiple human papillomavirus types in Condylomata acuminata lesions from otherwise healthy and immunosuppressed patients. **J Clin Microbiol**, v. 37, n. 10, p. 3316-22, Oct 1999.

BUCK, C. B.; DAY, P. M.; TRUS, B. L. The papillomavirus major capsid protein L1. **Virology**, v. 445, n. 1-2, p. 169-74, Oct 2013.

BURCHELL, A. N. et al. Chapter 6: Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. **Vaccine**, v. 24 Suppl 3, p. S3/52-61, Aug 31 2006.

CHRISTENSEN, N. D. HPV disease transmission protection and control. **Microb Cell**, v. 3, n. 9, p. 476-490, Sep 05 2016.

COGLIANO, V. et al. Carcinogenicity of human papillomaviruses. **Lancet Oncol**, v. 6, n. 4, p. 204, Apr 2005.

COLMENARES, V. et al. Human papillomavirus immunization is associated with increased expression of different innate immune regulatory receptors. **Clin Vaccine Immunol**, v. 19, n. 7, p. 1005-11, Jul 2012.

CULLMANN, C. et al. Oncogenic human papillomaviruses block expression of the B-cell translocation gene-2 tumor suppressor gene. **Int J Cancer**, v. 125, n. 9, p. 2014-20, Nov 01 2009.

DE VILLIERS, E. M. et al. Esophageal squamous cell cancer in patients with head and neck cancer: Prevalence of human papillomavirus DNA sequences. **Int J Cancer**, v. 109, n. 2, p. 253-8, Mar 20 2004.

DOORBAR, J. The E4 protein; structure, function and patterns of expression. **Virology**, v. 445, n. 1-2, p. 80-98, Oct 2013.

DUNOWSKA, M. et al. Genomic characterisation of *Felis catus* papillomavirus 4, a novel papillomavirus detected in the oral cavity of a domestic cat. **Virus Genes**, v. 48, n. 1, p. 111-9, Feb 2014.

EINSTEIN, M. H. et al. Clinician's guide to human papillomavirus immunology: knowns and unknowns. **Lancet Infect Dis**, v. 9, n. 6, p. 347-56, Jun 2009.

GARCIA-IGLESIAS, T. et al. Low NKp30, NKp46 and NKG2D expression and reduced cytotoxic activity on NK cells in cervical cancer and precursor lesions. **BMC Cancer**, v. 9, p. 186, Jun 16 2009.

GIULIANO, A. R. et al. The human papillomavirus infection in men study: human papillomavirus prevalence and type distribution among men residing in Brazil, Mexico, and the United States. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 17, n. 8, p. 2036-43, Aug 2008.

GOON, P.; SONNEX, C. Frequently asked questions about genital warts in the genitourinary medicine clinic: an update and review of recent literature. **Sex Transm Infect**, v. 84, n. 1, p. 3-7, Feb 2008.

GORMLEY, R. H.; KOVARIK, C. L. Human papillomavirus-related genital disease in the immunocompromised host: Part I. **J Am Acad Dermatol**, v. 66, n. 6, p. 867 e1-14; quiz 881-2, Jun 2012.

GOTTSCHLING, M. et al. Quantifying the phylodynamic forces driving papillomavirus evolution. **Mol Biol Evol**, v. 28, n. 7, p. 2101-13, Jul 2011.

GOTTSCHLING, M. et al. Multiple evolutionary mechanisms drive papillomavirus diversification. **Mol Biol Evol**, v. 24, n. 5, p. 1242-58, May 2007.

GRAVITT, P. E. The known unknowns of HPV natural history. **J Clin Invest**, v. 121, n. 12, p. 4593-9, Dec 2011.

HAWLEY-NELSON, P. et al. HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. **EMBO J**, v. 8, n. 12, p. 3905-10, Dec 01 1989.

HO, L. et al. The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations. **J Virol**, v. 67, n. 11, p. 6413-23, Nov 1993.

HONG, S.; LAIMINS, L. A. Manipulation of the innate immune response by human papillomaviruses. **Virus Res**, v. 231, p. 34-40, Mar 02 2017.

HSU, C. H. et al. The HPV E6 oncoprotein targets histone methyltransferases for modulating specific gene transcription. **Oncogene**, v. 31, n. 18, p. 2335-49, May 03 2012.

HU, D.; GOLDIE, S. The economic burden of noncervical human papillomavirus disease in the United States. **Am J Obstet Gynecol**, v. 198, n. 5, p. 500 e1-7, May 2008.

HUBERT, P. et al. E-cadherin-dependent adhesion of dendritic and Langerhans cells to keratinocytes is defective in cervical human papillomavirus-associated (pre)neoplastic lesions. **J Pathol**, v. 206, n. 3, p. 346-55, Jul 2005.

JEON, S.; LAMBERT, P. F. Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 5, p. 1654-8, Feb 28 1995.

JONES, D. L.; THOMPSON, D. A.; MUNGER, K. Destabilization of the RB tumor suppressor protein and stabilization of p53 contribute to HPV type 16 E7-induced apoptosis. **Virology**, v. 239, n. 1, p. 97-107, Dec 08 1997.

JOSHI, S. et al. Human papillomavirus infection among human immunodeficiency virus-infected women in Maharashtra, India. **Vaccine**, v. 32, n. 9, p. 1079-85, Feb 19 2014.

KANODIA, S.; FAHEY, L. M.; KAST, W. M. Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. **Curr Cancer Drug Targets**, v. 7, n. 1, p. 79-89, Feb 2007.

KENNEDY, C. M.; BOARDMAN, L. A. New approaches to external genital warts and vulvar intraepithelial neoplasia. **Clin Obstet Gynecol**, v. 51, n. 3, p. 518-26, Sep 2008.

KRAUS, I. et al. The majority of viral-cellular fusion transcripts in cervical carcinomas cotranscribe cellular sequences of known or predicted genes. **Cancer Res**, v. 68, n. 7, p. 2514-22, Apr 01 2008.

KUMARASWAMY, K. L.; VIDHYA, M. Human papilloma virus and oral infections: an update. **J Cancer Res Ther**, v. 7, n. 2, p. 120-7, Apr-Jun 2011.

LE POOLE, C.; DENMAN, C. J.; ARBISER, J. L. Immunosuppression may be present within condyloma acuminata. **J Am Acad Dermatol**, v. 59, n. 6, p. 967-74, Dec 2008.

LEE, S. S.; WEISS, R. S.; JAVIER, R. T. Binding of human virus oncoproteins to hDIg/SAP97, a mammalian homolog of the Drosophila discs large tumor suppressor protein. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 13, p. 6670-5, Jun 24 1997.

LEHOUX, M. et al. Inhibition of human papillomavirus DNA replication by an E1-derived p80/UAF1-binding peptide. **J Virol**, v. 86, n. 7, p. 3486-500, Apr 2012.

LEONARD, B. et al. A clinical and pathological overview of vulvar condyloma acuminatum, intraepithelial neoplasia, and squamous cell carcinoma. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 480573, 2014.

MA, W.; MELIEF, C. J.; VAN DER BURG, S. H. Control of immune escaped human papilloma virus is regained after therapeutic vaccination. **Curr Opin Virol**, v. 23, p. 16-22, Mar 07 2017.

MANGINO, G. et al. Inflammatory microenvironment and human papillomavirus-induced carcinogenesis. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 30, p. 103-11, Aug 2016.

MANHART, L. E.; KOUTSKY, L. A. Do condoms prevent genital HPV infection, external genital warts, or cervical neoplasia? A meta-analysis. **Sex Transm Dis**, v. 29, n. 11, p. 725-35, Nov 2002.

MILLER, L. S.; MODLIN, R. L. Human keratinocyte Toll-like receptors promote distinct immune responses. **J Invest Dermatol**, v. 127, n. 2, p. 262-3, Feb 2007.

MUNDAY, J. S. Bovine and human papillomaviruses: a comparative review. **Vet Pathol**, v. 51, n. 6, p. 1063-75, Nov 2014.

MYERS, E. R. et al. Mathematical model for the natural history of human papillomavirus infection and cervical carcinogenesis. **Am J Epidemiol**, v. 151, n. 12, p. 1158-71, Jun 15 2000.

NAGASAKA, K. et al. PDZ domains and viral infection: versatile potentials of HPV-PDZ interactions in relation to malignancy. **Biomed Res Int**, v. 2013, p. 369712, 2013.

NASU, K.; NARAHARA, H. Pattern recognition via the toll-like receptor system in the human female genital tract. **Mediators Inflamm**, v. 2010, p. 976024, 2010.

NELSON, E. L.; STOCKDALE, C. K. Vulvar and vaginal HPV disease. **Obstet Gynecol Clin North Am**, v. 40, n. 2, p. 359-76, Jun 2013.

NESTLE, F. O. et al. Skin immune sentinels in health and disease. **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 10, p. 679-91, Oct 2009.

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

OLSSON, S. E. et al. Evaluation of quadrivalent HPV 6/11/16/18 vaccine efficacy against cervical and anogenital disease in subjects with

serological evidence of prior vaccine type HPV infection. **Hum Vaccin**, v. 5, n. 10, p. 696-704, Oct 2009.

PAHNE-ZEPPENFELD, J. et al. Cervical cancer cell-derived interleukin-6 impairs CCR7-dependent migration of MMP-9-expressing dendritic cells. **Int J Cancer**, v. 134, n. 9, p. 2061-73, May 01 2014.

PALEFSKY, J. M.; HOLLY, E. A. Molecular virology and epidemiology of human papillomavirus and cervical cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 4, n. 4, p. 415-28, Jun 1995.

PARK, S. J. et al. Prevalence and determinants of high-risk human papillomavirus infection in male genital warts. **Korean J Urol**, v. 55, n. 3, p. 207-12, Mar 2014.

PARROCHE, P. et al. Human papillomavirus type 16 E6 inhibits p21(WAF1) transcription independently of p53 by inactivating p150(Sal2). **Virology**, v. 417, n. 2, p. 443-8, Sep 01 2011.

PATEL, H. et al. Systematic review of the incidence and prevalence of genital warts. **BMC Infect Dis**, v. 13, p. 39, Jan 25 2013.

PYEON, D. et al. Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression. **PLoS Pathog**, v. 5, n. 2, p. e1000318, Feb 2009.

RAUTAVA, J.; SYRJANEN, S. Human papillomavirus infections in the oral mucosa. **J Am Dent Assoc**, v. 142, n. 8, p. 905-14, Aug 2011.

RENOUX, V. M. et al. Human papillomavirus entry into NK cells requires CD16 expression and triggers cytotoxic activity and cytokine secretion. **Eur J Immunol**, v. 41, n. 11, p. 3240-52, Nov 2011.

RIBEIRO-MULLER, L.; MULLER, M. Prophylactic papillomavirus vaccines. **Clin Dermatol**, v. 32, n. 2, p. 235-47, Mar-Apr 2014.

RODRIGUEZ, A. C. et al. Rapid clearance of human papillomavirus and implications for clinical focus on persistent infections. **J Natl Cancer Inst**, v. 100, n. 7, p. 513-7, Apr 02 2008.

SAEKI, H. et al. Cutting edge: secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) and CC chemokine receptor 7 (CCR7) participate in the emigration pathway of mature dendritic cells from the skin to regional lymph nodes. **J Immunol**, v. 162, n. 5, p. 2472-5, Mar 01 1999.

SANCHEZ-TORICES, M. S.; CORRALES-MILLAN, R.; HIJONA-ELOSEGUI, J. J. Oropharyngeal perinatal colonization by human papillomavirus. **Acta Otorrinolaringol Esp**, v. 67, n. 3, p. 135-41, May-Jun 2016.

SCHEFFNER, M. et al. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. **Cell**, v. 75, n. 3, p. 495-505, Nov 05 1993.

SCHMITZ, M. et al. Loss of gene function as a consequence of human papillomavirus DNA integration. **Int J Cancer**, v. 131, n. 5, p. E593-602, Sep 01 2012.

SINGH, B. et al. Human pathogens utilize host extracellular matrix proteins laminin and collagen for adhesion and invasion of the host. **FEMS Microbiol Rev**, v. 36, n. 6, p. 1122-80, Nov 2012.

SPELLBERG, B.; EDWARDS, J. E., JR. Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. **Clin Infect Dis**, v. 32, n. 1, p. 76-102, Jan 2001.

STANLEY, M. A. Immune responses to human papilloma viruses. **Indian J Med Res**, v. 130, n. 3, p. 266-76, Sep 2009.

STUQUI, B. et al. The differential role of HTRA1 in HPV-positive and HPV-negative cervical cell line proliferation. **BMC Cancer**, v. 16, n. 1, p. 840, Nov 03 2016.

STUREGARD, E. et al. Human papillomavirus typing in reporting of condyloma. **Sex Transm Dis**, v. 40, n. 2, p. 123-9, Feb 2013.

TJON PIAN GI, R. E. et al. Immunological response to quadrivalent HPV vaccine in treatment of recurrent respiratory papillomatosis. **Eur Arch Otorhinolaryngol**, v. 273, n. 10, p. 3231-6, Oct 2016.

TYRING, S. K. Human papillomavirus infections: epidemiology, pathogenesis, and host immune response. **J Am Acad Dermatol**, v. 43, n. 1 Pt 2, p. S18-26, Jul 2000.

VAN DOORSLAER, K. Evolution of the papillomaviridae. **Virology**, v. 445, n. 1-2, p. 11-20, Oct 2013.

VANDERMARK, E. R. et al. Human papillomavirus type 16 E6 and E7 proteins alter NF- κ B in cultured cervical epithelial cells and inhibition of NF- κ B promotes cell growth and immortalization. **Virology**, v. 425, n. 1, p. 53-60, Mar 30 2012.

VELDMAN, T. et al. Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. **J Virol**, v. 75, n. 9, p. 4467-72, May 2001.

VILLA, L. L. Vaccines against papillomavirus infections and disease. **Salud Publica Mex**, v. 45 Suppl 3, p. S443-8, 2003.

VILLA, L. L. et al. Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. **Lancet Oncol**, v. 6, n. 5, p. 271-8, May 2005.

VILLA, L. L. et al. High sustained efficacy of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus types 6/11/16/18 L1 virus-like particle vaccine through 5 years of follow-up. **Br J Cancer**, v. 95, n. 11, p. 1459-66, Dec 04 2006.

WINER, R. L. et al. Condom use and the risk of genital human papillomavirus infection in young women. **N Engl J Med**, v. 354, n. 25, p. 2645-54, Jun 22 2006.

WINER, R. L. et al. Development and duration of human papillomavirus lesions, after initial infection. **J Infect Dis**, v. 191, n. 5, p. 731-8, Mar 01 2005.

YANG, K. et al. Human TLR-7-, -8-, and -9-mediated induction of IFN-alpha/beta and -lambda is IRAK-4 dependent and redundant for protective immunity to viruses. **Immunity**, v. 23, n. 5, p. 465-78, Nov 2005.

ZIEGERT, C. et al. A comprehensive analysis of HPV integration loci in anogenital lesions combining transcript and genome-based amplification techniques. **Oncogene**, v. 22, n. 25, p. 3977-84, Jun 19 2003.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. **Virology**, v. 384, n. 2, p. 260-5, Feb 20 2009.

1. ARTIGO CIENTÍFICO

Altered immune response in benign HPV positive genital lesions

¹STUQUI, Bruna; ¹PROVAZZI, Paola Jocelan Scarin; ¹CANDIDO, Natalia Maria; ¹BONFIM, Caroline Measso; ¹CALMON, Marília de Freitas; ¹DE JESUS, Mariana Marcielo; ¹CONCEIÇÃO, André Luis Giacometti; ¹DE MATOS, Renata Prandini Adum; ²ROSSI, Lívia Maria Gonçalves; ²VAUGHAN, Gilberto; ³SILVA, Márcia Guimarães; ³LIMA, Flávio de Oliveira; ⁴QUINTANA, Silvana Maria; ⁴MELLI, Patrícia Pereira dos Santos; ¹RAHAL, Paula.

1. Dept of Biology, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - IBILCE/UNESP, Rua Cristóvão Colombo nº 2265, Jardim Nazareth, CEP 15054-000, São José do Rio Preto- SP, Brazil.

2. Dept of Viral Hepatitis, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, United States.

3. Dept of Patology, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina de Botucatu, Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro, s/n, CEP 18618687, Botucatu – SP, Brazil.

4. Dept of Gynecology and obstetric, Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP), Av. Bandeirantes nº 3900, Monte Alegre, CEP 14049-900, Ribeirão Preto - SP, Brazil.

Email: Bruna Stuari - bru.stuari@gmail.com; Paola Jocelan Scarin Provazzi - paolaprovazzi@gmail.com; Natalia Maria Candido - naty_candido@ig.com.br; Caroline Measso Bonfim - carol.unespbio@yahoo.com.br, Marília de Freitas Calmon - macal131@gmail.com, Mariana Marcielo de Jesus - marianamarcielo@gmail.com, André Luís Giacometti Conceição - andre4487@gmail.com, Renata Prandini Adum de Matos -

renatapram@hotmail.com, Livia Maria Gonçalves Rossi - liv.rossi@yahoo.com, Gilberto Vaughan - jiv9@cdc.gov, Márcia Guimarães Silva - mgsilva@fmb.unesp.br, Flávio de Oliveira Lima - flaviodolima@gmail.com, Silvana Maria Quintana - smquintana64@gmail.com, Patrícia Pereira dos Santos Melli - patimelli@gmail.com, Paula Rahal - rahalp@yahoo.com.br.

*Corresponding author

Written correspondence to:

Paula Rahal, PhD

Department of Biology

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - IBILCE/UNESP

Rua Cristóvão Colombo, 2265,

15054-000 - São José do Rio Preto, SP, Brazil

e-mail: rahalp@yahoo.com.br

Phone: +55 17 3221-2379

Fax: +55 17 3221-2390

ABSTRACT

Background: Human papillomavirus (HPV) infection is related to several benign and malignant diseases, the pathology degree is dependent of viral type, host immune response and local environmental factors. Condyloma acuminata are benign proliferative disease found mainly on non-keratinized epithelia. The aim of this study was highlight candidate genes and pathways associated with the immune changes in female individuals that not eliminated spontaneously the virus and thus developed genital warts.

Methods: Twenty-seven condyloma biopsies were genotyped by sequencing and their cDNAs were arranged in three pools - HPV 6, HPV 11 and HPV negative pool (margin). Ninety-two immune-related genes were analyzed by TaqMan Array Immune Response assay. Six genes with differential expression in the TaqMan Array were validated by qPCR. Fifty-six condyloma paraffin-embedded were submitted a immunostaining with primary antibodies to CD1a, FOXP3, CD3, CD4, CD8 and interferon gamma (IFNG).

Results: All the twenty-seven samples were HPV positive and presented HPV 6 (70,4%) or HPV 11 (29,6%). Gene expression analysis (TaqMan Array) resulted in 31 differentially expressed genes in condyloma acuminata lesions. Six of these genes had the expression validated by qPCR. The *GZMB* gene was up-regulated in 63% of the samples, while *IFNG*, *IL12B* and *IL8* were upregulated in 81.5%, 55.5% and 78%, respectively. On the other hand, the *NFATC4* gene was down-regulated in 63% of the samples and *IL7* in 30% of them. The immunohistochemical analyzes showed greater abundance of polymorphonuclear leukocytes in all samples. Langerhans and regulatory T cells were found in few biopsies of condyloma acuminata.

Conclusion: The large amounts polymorphonuclear cells, cytokines and lack of Langerhans cells observed in this work suggest an attempt immune response that fails to induce efficiently an adaptive response.

Keywords: HPV, condyloma acuminata, immune response.

BACKGROUND

Human papillomavirus (HPV) infection is related to several benign and malignant diseases (BRIANTI; DE FLAMMINEIS; MERCURI, 2017; ERMAN-VLAHOVIC et al., 2017; YOSHIMATSU et al., 2017). The pathology degree in HPV infections depends on viral type, host immune response and local environmental factors (NELSON; STOCKDALE, 2013). These virus are the most frequent virus sexually transmitted in the world. The anogenital warts are benign proliferative diseases that manifest as visible lesions, namely as single or multiple papules on the vulva, perineum, perianal area, vagina, cervix, penis, anus, scrotum and urethra (GROSS; PFISTER, 2004). Condyloma acuminata or genital warts are a category of anogenital warts found mainly on non-keratinized epithelia (PATEL, H. et al., 2013).

The majority of condyloma acuminata is caused by low-risk HPV, mainly HPV 6 and 11 (BALL et al., 2011; BROWN et al., 1999). In a study with 621 subjects, HPV 6 was identified in 61.7%, HPV 11 in 10.3% and either of these HPV types in 71.0% of the condylomas, besides other types of low risk HPV (types 40, 42, 43, 54, 70, and 81). Combination with 16, 18, 31, 33 and 35 type of high risk HPV also was observed (STUREGARD et al., 2013).

Although it is a benign disease, the condyloma causes significant psychosocial distress and anxiety (NELSON; STOCKDALE, 2013). The treatments involve tissue destruction (podofilox, cryotherapy, bichloroacetic or trichloroacetic acid); surgical excision; or immune modulation (imiquimod, sinecatechins) and can result in scarring, pain, disfigurement, and sexual dysfunction. There is a high incidence of recurrence (13%–65%) with condyloma, thus multiple treatments are required (HU, D.; GOLDIE, 2008; NELSON; STOCKDALE, 2013).

Both innate and adaptive immunity play key roles in protecting host against epithelium invading viruses. Resident antigen presenting cells,

Langerhans cells (LCs) and keratinocytes are important in viral recognition and in bridging innate and adaptive immune responses (DA SILVA et al., 2015).

Antigenic stimulation of LC results in activation of signaling cascades, up-regulation of costimulatory molecules, and the release of pro-inflammatory cytokines as interferon I (IFN I) and interleukin-12 (IL-12) (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998; MUTYAMBIZI; BERGER; EDELSON, 2009). These activated LCs migrate to lymph nodes and interact with antigen specific naïve T cells initiating an adaptive T cell response. Effector T cells travel to tissue and destroy infected epithelial cells (RANDOLPH; OCHANDO; PARTIDA-SANCHEZ, 2008). However, respecting to HPV infections, previous studies have demonstrated that the occurrence, remission, relapse and cancerization of condyloma acuminata are associated with immune disorders in patients (LE POOLE; DENMAN; ARBISER, 2008; SHI; YANG; YANG, 2013). Even in patients not immunosuppressed, benign HPV-mediated lesions are difficult to eradicate, so in healthy individuals these lesions could exhibit local immunosuppression (LE POOLE et al., 2008).

In the present study, we performed gene expression profiling of 92 immune-related genes in condyloma acuminata biopsies and in control biopsies (HPV negative margin tissue), besides evaluating populations of immune cells present in condyloma microenvironment, aiming to highlight candidate genes and pathways associated with the immune changes in individuals that not eliminated spontaneously the virus and thus developed genital warts.

MATERIALS AND METHODS

Ethics Statement and samples

The study was approved by the Research Ethics Committee of Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto (IBILCE/UNESP), State of São Paulo.

The analyses were carried out with 27 fresh condyloma biopsies and normal tissue (margins) obtained by surgical section of female patients attended at Hospital das Clínicas of FMRP-USP. To analyze the immune-related genes expression, these samples were arranged in three cDNAs pools, prepared with six samples of HPV 6, HPV 11 and HPV negative. The same 27 cDNA samples were used to validate the results. Additional 56 condyloma biopsies paraffin-embedded were used to evaluate the immune cells present in these lesions by immunohistochemistry. These samples were obtained in Ribeirão Preto Medical School (FMRP-USP) and Botucatu Medical School (UNESP).

The patients carry out in this study were HIV negative and the biopsies were classified as condyloma acuminata after histopathological analyzes performed by a experient pathologist (F.O.L.).

Total DNA and RNA isolation

Total RNA and DNA were extracted using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) following the manufacturer's protocol. The RNA and DNA purity (A260/280 nm) were assessed using NanoDrop ND- 1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware, USA).

Nested Polymerase Chain Reaction (NESTED-PCR) and HPV Genotyping

The polymerase chain reaction (PCR) methodology was used to amplify the DNA of HPV present in 27 condyloma samples. The oligonucleotides PGMY09 (5-CGT CCM ARR GGA WAC TGATC- 3) and PGMY11 (5-GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG-3) were used, which are degenerated sequences to detect viral DNA. The amplification products

were used in a nested PCR with the oligonucleotides GP5+ (5-TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC-3) and GP6+ (5-CTTATACTAAATGTCAAATAAAAA-3), which amplify a sequence of internal 150 bp to the fragment produced by the pair of oligonucleotides PGMY09/PGMY11 (FUESSEL HAWS et al., 2004). The products of the amplifications were electrophoretic run on 1% agarose gel.

The sequencing reaction was carried out to assess the HPV genotype, according to the Sanger technique (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977), using the BigDye terminator kit (Applied Biosystems/Life Technologies, Foster City, CA, USA). A sequence of 34 bases downstream of the GP5+ binding site was used for accurate genotyping of HPV types (LEE et al., 2009). The obtained sequences were quality assessed by use of PHRED/PHRAP/CONSED software and were then aligned and checked for similarity with the sequences deposited in GenBank using the BLAST tool - Basic Local Alignment System (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi) and BioEdit – Biological Sequence Alignment Editor (www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html).

Quantitative real-time PCR

cDNA samples were prepared from total RNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA) and subsequently the cDNA pools were prepared for the study groups (HPV 6 pool, HPV 11 pool and HPV negative pool). For each cDNA pool qPCR reactions were carried out using 20 ng of cDNA and a TaqMan Array Fast 96-well Human Immune Response Plate (cat. 4418718, Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA) (Table S1), representing 92 immune-related genes and four reference genes, according to the manufacturer's instructions.

For TaqMan array validation the cDNA of 27 condyloma samples was analyzed individually using TaqMan Fast Advanced Master Mix (cat. 4444963, Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA) and TaqMan

Gene Expression Assays (cat. 4331182, Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA) (Table 1) following the manufacturer's protocol. The HPV negative cDNA pool was used as reference sample and *HPRT1* was the endogenous gene.

All the qPCR reactions were performed using a Quanti-Studio 12K Flex Real Time PCR System (Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA). The samples were tested in triplicate. The relative expression of each specific gene was calculated using the following formula: $R = (E_{\text{target}})^{\Delta C_{\text{t target}} (\text{control} - \text{sample})} / (E_{\text{endogenous}})^{\Delta C_{\text{t endogenous}} (\text{control} - \text{sample})}$, which was published previously (PFAFFL, 2001); a cutoff higher than a 2-fold change was considered significant.

Table 1. TaqMan Gene Expression Assays identification (cat. 4331182, Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA).

| Gene symbol | Assay ID |
|----------------|---------------|
| <i>HPRT1</i> * | Hs99999909_m1 |
| <i>GZMB</i> | Hs00188051_m1 |
| <i>IFNG</i> | Hs00174143_m1 |
| <i>NFATC4</i> | Hs00190037_m1 |
| <i>IL7</i> | Hs00174202_m1 |
| <i>IL12B</i> | Hs00233688_m1 |
| <i>IL8</i> | Hs00174103_m1 |

*Endogenous gene

Immunostaining

The 56 condyloma paraffin-embedded samples were used to a Tissue Microarray (1 mm) production. Tissue Microarray sections (4 μm) were submitted to an antigen-retrieval step using a citrate buffer (pH 6.0) at 96°C for 20 min. The endogenous peroxide activity was blocked with 3% hydrogen peroxide for 20 min followed by incubation with BSA 2% for

30 min. The sections were incubated overnight at 4°C with the following Abcam (Cambridge, UK) primary antibodies: to Langerhans cells (anti-CD1a, ab708, 1:100), regulatory T cells (anti-FOXP3, ab20034, 1:100), T cells (anti-CD3, ab16669, 1:100), helper T cells (anti-CD4, ab846, 1:25), cytotoxic T cells (anti-CD8, ab17147, 1:50) or cytokine interferon gamma (anti-IFNG, ab9657, 1:500). Some sections were incubated with 1% BSA instead of the primary antibody to provide a negative control for the reaction. After washing, the CD1a, FOXP3, CD4 and CD8 sections were incubated with a HRP-polymer (ab210059) for 30 min at room temperature and staining with the DAB substrate (ab210059). Some sections (CD3 and IFNG) were incubated with a biotinylated secondary antibody (sc2018, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA) for 45 min at 37°C and revealed with ImmunoCruz rabbit ABC Staining System (sc2018, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA). The sections were washed in distilled water, counterstained with hematoxylin and mounted. The analysis was conducted on Olympus BX60 microscope with digital camera Olympus DP71 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan), using the Image Pro Plus Media Cybernetics software for qualitative analysis.

All immunohistochemical reactions were standardized using as a positive control tonsil, following the antibody manufacturer's suggestion.

RESULTS

HPV genotyping

The patients carry out in this study were HIV negative. All the 27 samples were HPV positive and presented HPV 6 or HPV 11 (Table 2). HPV 6 type was the most prevalent in the samples.

Table 2. Prevalence of HPV 6 and 11 in fresh condyloma acuminata samples.

| HPV type | Number of Patients | Percentage |
|----------|--------------------|------------|
| HPV 6 | 19 | 70,4% |
| HPV 11 | 8 | 29,6% |

Immune-related genes expression

Array analysis of gene expression in condyloma pools compared to controls resulted in 31 genes with significant differential expression, considering the threshold for significance of 2 or -2 expression level (Log_2). Eight of them, *AGTR1*, *BCL2*, *CYP1A2*, *FN1*, *IL7*, *NFATC4*, *SELE*, *SKI*, were down-regulated in HPV 6 samples, and nine, *AGTR1*, *BCL2*, *C3*, *CSF3*, *CYP1A2*, *FN1*, *IL12A*, *NFATC4*, *PF4*, in HPV 11 samples. Five of them (*AGTR1*, *BCL2*, *CYP1A2*, *FN1*, *NFATC4*) were down-regulated in both HPV types samples. While eight genes were up-regulated in condyloma samples HPV 6 and 11 (*CD38*, *CXCL10*, *CXCL11*, *GZMB*, *IFNG*, *IL12B*, *IL17A*, *IL8*), nine were up-regulated (*CD19*, *CCL3*, *CD80*, *HLADRB1*, *ICAM1*, *IL1A*, *IL1B*, *LTA*, *NOS2*) only in HPV 6 samples and two (*ICOS* and *IL9*) only in HPV 11 samples (Table 3).

Six of these genes, *GZMB*, *IFNG*, *NFATC4*, *IL12B*, *IL7* and *IL8* were selected to qPCR validation using the 27 condyloma samples individually. The genes choice was based on literature. Sixty three percent of the samples (17/27) were up-regulated to *GZMB* gene just like the TaqMan Array assay (Figure 1A). Similarly, the *IFNG* gene was up-regulated in 81.5% (22/27) of the samples (Figure 1B) and *IL8* gene was up-regulated in 78% (21/27) of them (Figure 1C). Sixty three percent of the samples (17/27) were down-regulated to *NFATC4* gene (Figure 1D). The gene *IL12B* was up-regulated in 55.5% of biopsies (15/27) (Figure 1E), while the gene *IL7* was down-regulated only in 30% (8/27) of the samples (Figure 1F).

Table 3. Relative mRNA expression level (Log₂) of immune-related genes differentially expressed in condyloma acuminata biopsies compared to controls.

| Gene | Description | HPV 6 samples (Log₂) | HPV 11 samples (Log₂) |
|----------------|--|--|---|
| <i>AGTR1</i> | Angiotensin II receptor type 1 | -5,1 | -2,2 |
| <i>BCL2</i> | B-cell CLL/lymphoma 2 | -2,7 | -2,4 |
| <i>C3</i> | Complement C3 | -0,6 | -2,9 |
| <i>CCL3</i> | Chemokine (C-C motif) ligand 3 | 3,9 | 0,8 |
| <i>CD19</i> | CD19 molecule | 4,2 | 1,1 |
| <i>CD38</i> | CD38 molecule | 4,6 | 2,6 |
| <i>CD80</i> | CD80 molecule | 2,2 | 1,4 |
| <i>CSF3</i> | Colony stimulating factor 3 | 1,9 | -2,7 |
| <i>CXCL10</i> | C-X-C motif chemokine ligand 10 | 3,8 | 3,7 |
| <i>CXCL11</i> | C-X-C motif chemokine ligand 11 | 4,4 | 4,3 |
| <i>CYP1A2</i> | Cytochrome P450 family 1 subfamily A member 2 | -6,3 | -2,8 |
| <i>FN1</i> | Fibronectin 1 | -3,3 | -2,2 |
| <i>GZMB</i> | Granzyme B | 3,1 | 2,1 |
| <i>HLADRB1</i> | Major Histocompatibility Complex, class II, DR beta 1 | 12 | -1,7 |
| <i>ICAM1</i> | Intercellular adhesion molecule 1 | 2 | -1,1 |
| <i>ICOS</i> | Inducible T-cell costimulator | 1,98 | 2,7 |
| <i>IFNG</i> | Interferon gamma | 4,8 | 3,3 |
| <i>IL12A</i> | Interleukin 12B | 0,98 | -2,6 |
| <i>IL12B</i> | Interleukin 12B | 3,5 | 2,5 |
| <i>IL17A</i> | Interleukin 17A | 4,6 | 3,5 |
| <i>IL1A</i> | Interleukin 1A | 5,5 | 1,4 |

| | | | |
|---------------|---------------------------------------|-------|-------|
| <i>IL1B</i> | Interleukin 1B | 4,6 | 0,5 |
| <i>IL7</i> | Interleukin 7 | -2,6 | -1,99 |
| <i>IL8</i> | Interleukin 8 | 10,6 | 6,2 |
| <i>IL9</i> | Interleukin 9 | -1,7 | 3,9 |
| <i>LTA</i> | Lymphotoxin alpha | 2,6 | 0 |
| <i>NFATC4</i> | Nuclear factor of activated T-cells 4 | -3,55 | -3,1 |
| <i>NOS2</i> | Nitric oxide synthase 2, inducible | 5,7 | -0,9 |
| <i>PF4</i> | Platelet factor 4 | -0,99 | -4,6 |
| <i>SELE</i> | Selectin E | -2,1 | -0,84 |
| <i>SKI</i> | SKI proto-oncogene | -2 | -1 |

Immune cells in the lesion microenvironment

The condyloma acuminata lesions presented low number of immune cells related to adaptive response. We observed rare CD3⁺ and CD8⁺, they are found in at most two samples and in small number (Fig 2C and 2D). Cells CD4 positive were not observed.

The cells observed with greater abundance in all samples were polymorphonuclear leukocytes (Fig. 2F). Dendritic cells (CD1a⁺) were observed in 34% of the samples and T regulatory cells (FOXP3⁺) in 23% of them (Fig. 2A and B).

Confirming the findings in gene expression analysis to IFNG cytokine, all samples presented epithelial cells immuno-marked in the cytoplasm for IFNG (Fig. 2E).

DISCUSSION

In benign or malignant lesions caused by HPV, the innate and adaptive immune response pathways failed at some point. The HPV infections are very common, most of them are asymptomatic, subclinical and transient. It is estimated that more than 50% of sexually active persons were infected with HPV at least once in their lifetime (MYERS et

al., 2000). However most of these infections are controlled by host adaptive immunity (CHRISTENSEN, 2016; VELDHUIJZEN et al., 2010). The high incidence of HPV infections and the quick clearance of infections indicate that in lesions provoked by persistent infections is due to immune escape mechanisms with lack of inflammatory events (FRISCH; BIGGAR; GOEDERT, 2000; KREUTER et al., 2008).

In the present study were analyzed HPV positive genital warts from hosts without known immunosuppressive diseases. The samples were histologically classified as condyloma acuminata. All the samples were HPV 6 or 11 positive as described by other authors (BALL et al., 2011; BROWN et al., 1999), with predominance of HPV type 6 (BROWN et al., 1999).

The expression analysis of 92 genes related to immune system revealed mainly pro-inflammatory (*IL1A*, *IL1B*, *IL8*, *IL12B*, *IFNG*, *GZMB*, *CXCL10*, *CXCL11*) genes with expression altered positively in condyloma samples. On the other hand, genes whose products are essential for the activation of an innate and adaptive immune response like *TNF- α* , *CD40*, *CD40LG* and *CD86* (LAIDLAW et al., 2017; MA et al., 2017; PAHNE-ZEPPENFELD et al., 2014; TUMMERS et al., 2014) did not have their expression altered compared to control. In the same way, genes that indicate T cell activation were downregulated (*IL7* and *NFATC4*) (BIKKER et al., 2012; MINEMATSU et al., 2011). Confirming these findings, immunohistochemical analysis showed few inflammatory cells in the lesion, except polymorphonuclear leukocytes.

Some previous studies of benign and malignant HPV positive lesions showed alterations in localized immune environment in spite of a normal immune systemic profile (BONAGURA et al., 2010; PAHNE-ZEPPENFELD et al., 2014; SASAGAWA; TAKAGI; MAKINODA, 2012). Zeppenfeld et al. (2014) observed in cervical cancers biopsies and cell lines HPV 16 or HPV 18 positive that the induction of the chemokine receptor CCR7 in mature dendritic cells (DCs) is suppressed and this

impair their migration toward a lymph node, required to initiate adaptive immune responses (PAHNE-ZEPPENFELD et al., 2014). They confirmed the presence of CD83⁺ in cancer biopsies, suggesting that cervical cancer cells can dissociate CCR7 regulation from the regulation of other maturation markers, including CD83 (PAHNE-ZEPPENFELD et al., 2014).

In lesions triggered by low-risk HPV, mainly in recurrent respiratory papillomatosis (RRP), studies propose that inability of RRP patients to eliminate HPV-infection is due to a suppression of effective Th1-like responses (IFNG, IL-6, TNF- α , IL-12 and IL-8) and a predominance of regulatory T cells (Tregs), Th2-like and IL-10 cytokines microenvironment within papillomas (BONAGURA et al., 2010; DEVOTI, J. et al., 2014). IL-10 is considered a master negative regulator of inflammation (ROJAS et al., 2017). However, in the present study this cytokine did not show an altered expression in the condyloma samples compared to control tissue, which may explain the findings of proinflammatory cytokines overexpression. In the same way IFNG, IL-12B and IL-8, Th-1 like cytokines presented overexpression. These findings indicate a partial activation of the immune response.

Most authors agree with our findings that LC numbers are reduced in lesions caused by HPV 6 and 11 (BHAWAN; DAYAL; BHAN, 1986; DA SILVA et al., 2015; FAUSCH et al., 2005). In addition to a few LCs, we found few Tregs, suggesting that the absence of Langerhans cells, as observed in most studies, may be more important for viral persistence and lesion development than the presence of Tregs. LCs are migratory cells that are specialized in processing, presentation of antigens to T cells and initiate an adaptive T cell response (MERAD; GINHOUX; COLLIN, 2008). The decrease observed in condyloma could explain the rare T cells found in the lesion.

The T cells absence was also confirmed by the downregulation of IL-7, a cytokine secreted during T cells activation by many cells as DCs and keratynocytes (BIKKER et al., 2012); besides the downregulation of

NFATC4 in the condyloma samples, a transcription factor originally found in activated T lymphocytes and implicated in regulation of IL-2, IL-4 and TNF- α gene transcription (JAIN; LOH; RAO, 1995; MCCAFFREY; GOLDFELD; RAO, 1994; ROONEY; HOEY; GLIMCHER, 1995).

Although IFNG cytokine has antitumor and antiviral properties (MIYAKI et al., 2017), in most of condyloma acuminata analyzed samples this gene was overexpressed. The immunohistochemical analysis revealed the presence of this cytokine in keratinocytes, cells that play an important role during the initiation of the HPV infection (AMADOR-MOLINA et al., 2013; NESTLE et al., 2009). Despite this seems paradoxical, more studies are necessary to understand the role of this protein in HPV positive lesions. Some data suggest that IFNG can play a role in local immunosuppression (MATTAROLLO et al., 2010; MULLER-HERMELINK et al., 2008; WANG et al., 2006).

The high expression of *IL17* and *IL8* in our samples could explain the polymorphonuclear abundance in the tissue, once IL8 protein is a potent neutrophil-attracting chemokine that is potently induced by IL17 (VANAUDENAERDE et al., 2008). On the other hand, the polymorphonuclear may be the IL-17 source. In squamous cervical cancer, Punt et al. (2015) confirmed that predominant cell type expressing IL-17 is the neutrophilic granulocyte and mast cells (PUNT et al., 2015). Interestingly, recent data indicate an immunosuppressive role for IL-17 (GOSMANN et al., 2014; PUNT et al., 2015). Gossman et al (2014) suggested that blocking IL-17 in persistent viral infection could promote antiviral immunity and prevent progression of HPV-associated epithelial hyperplasia (GOSMANN et al., 2014). Punt et al. (2015) showed that IL-17 promotes tumor growth and it is correlated with poor prognosis in cervical cancer (PUNT et al., 2015).

Thus, large amounts polymorphonuclear cells, cytokines and lack of Langerhans cells observed in this work suggest an attempt immune response that fails to induce efficiently an adaptive response, however

more studies are needed to understand the role of each cell and cytokine in the low risk HPV-induced genital lesions.

CONCLUSION

The condyloma acuminata samples studied exhibit a partial immune response, with overexpression of cytokines described in the literature sometimes as pro-inflammatory and others as immunosuppressive. There is a predominance of polymorphonuclear cells presented in early stages of the immune response, and a lack of Langerhans cells, essential to stimulate effective innate and adaptive immune responses.

REFERENCES

AMADOR-MOLINA, A. et al. Role of innate immunity against human papillomavirus (HPV) infections and effect of adjuvants in promoting specific immune response. **Viruses**, v. 5, n. 11, p. 2624-42, Oct 28 2013.

BALL, S. L. et al. Analyses of human papillomavirus genotypes and viral loads in anogenital warts. **J Med Virol**, v. 83, n. 8, p. 1345-50, Aug 2011.

BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v. 392, n. 6673, p. 245-52, Mar 19 1998.

BHAWAN, J.; DAYAL, Y.; BHAN, A. K. Langerhans cells in molluscum contagiosum, verruca vulgaris, plantar wart, and condyloma acuminatum. **J Am Acad Dermatol**, v. 15, n. 4 Pt 1, p. 645-9, Oct 1986.

BIKKER, A. et al. Interleukin-7: a key mediator in T cell-driven autoimmunity, inflammation, and tissue destruction. **Curr Pharm Des**, v. 18, n. 16, p. 2347-56, 2012.

BONAGURA, V. R. et al. Recurrent respiratory papillomatosis: a complex defect in immune responsiveness to human papillomavirus-6 and -11. **APMIS**, v. 118, n. 6-7, p. 455-70, Jun 2010.

BRIANTI, P.; DE FLAMMINEIS, E.; MERCURI, S. R. Review of HPV-related diseases and cancers. **New Microbiol**, v. 40, n. 2, p. 80-85, Apr 2017.

BROWN, D. R. et al. Detection of multiple human papillomavirus types in Condyloma acuminata lesions from otherwise healthy and immunosuppressed patients. **J Clin Microbiol**, v. 37, n. 10, p. 3316-22, Oct 1999.

CHRISTENSEN, N. D. HPV disease transmission protection and control. **Microb Cell**, v. 3, n. 9, p. 476-490, Sep 05 2016.

DA SILVA, D. M. et al. Langerhans cells from women with cervical precancerous lesions become functionally responsive against human papillomavirus after activation with stabilized Poly-I:C. **Clin Immunol**, v. 161, n. 2, p. 197-208, Dec 2015.

DEVOTI, J. et al. Decreased Langerhans cell responses to IL-36gamma: altered innate immunity in patients with recurrent respiratory papillomatosis. **Mol Med**, v. 20, p. 372-80, Aug 28 2014.

ERMAN-VLAHOVIC, M. et al. Coexistence of Condyloma Acuminata with Warty Squamous Cell Carcinoma and Squamous Cell Carcinoma. **Med Arch**, v. 71, n. 1, p. 72-75, Feb 2017.

FAUSCH, S. C. et al. Human papillomavirus can escape immune recognition through Langerhans cell phosphoinositide 3-kinase activation. **J Immunol**, v. 174, n. 11, p. 7172-8, Jun 01 2005.

FRISCH, M.; BIGGAR, R. J.; GOEDERT, J. J. Human papillomavirus-associated cancers in patients with human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome. **J Natl Cancer Inst**, v. 92, n. 18, p. 1500-10, Sep 20 2000.

FUESSEL HAWS, A. L. et al. Nested PCR with the PGMY09/11 and GP5(+)/6(+) primer sets improves detection of HPV DNA in cervical samples. **J Virol Methods**, v. 122, n. 1, p. 87-93, Dec 01 2004.

GOSMANN, C. et al. IL-17 suppresses immune effector functions in human papillomavirus-associated epithelial hyperplasia. **J Immunol**, v. 193, n. 5, p. 2248-57, Sep 01 2014.

GROSS, G.; PFISTER, H. Role of human papillomavirus in penile cancer, penile intraepithelial squamous cell neoplasias and in genital warts. **Med Microbiol Immunol**, v. 193, n. 1, p. 35-44, Feb 2004.

HU, D.; GOLDIE, S. The economic burden of noncervical human papillomavirus disease in the United States. **Am J Obstet Gynecol**, v. 198, n. 5, p. 500 e1-7, May 2008.

JAIN, J.; LOH, C.; RAO, A. Transcriptional regulation of the IL-2 gene. **Curr Opin Immunol**, v. 7, n. 3, p. 333-42, Jun 1995.

KREUTER, A. et al. Penile intraepithelial neoplasia is frequent in HIV-positive men with anal dysplasia. **J Invest Dermatol**, v. 128, n. 9, p. 2316-24, Sep 2008.

LAILAW, S. M. et al. Tumor Necrosis Factor Inhibits Spread of Hepatitis C Virus Among Liver Cells, Independent from Interferons. **Gastroenterology**, Apr 26 2017.

LE POOLE, C.; DENMAN, C. J.; ARBISER, J. L. Immunosuppression may be present within condyloma acuminata. **J Am Acad Dermatol**, v. 59, n. 6, p. 967-74, Dec 2008.

LEE, S. H. et al. Validation of human papillomavirus genotyping by signature DNA sequence analysis. **BMC Clin Pathol**, v. 9, p. 3, May 22 2009.

MATTAROLLO, S. R. et al. Invariant NKT cells in hyperplastic skin induce a local immune suppressive environment by IFN-gamma production. **J Immunol**, v. 184, n. 3, p. 1242-50, Feb 01 2010.

MCCAFFREY, P. G.; GOLDFELD, A. E.; RAO, A. The role of NFATp in cyclosporin A-sensitive tumor necrosis factor-alpha gene transcription. **J Biol Chem**, v. 269, n. 48, p. 30445-50, Dec 02 1994.

MERAD, M.; GINHOUX, F.; COLLIN, M. Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. **Nat Rev Immunol**, v. 8, n. 12, p. 935-47, Dec 2008.

MINEMATSU, H. et al. Nuclear presence of nuclear factor of activated T cells (NFAT) c3 and c4 is required for Toll-like receptor-activated innate inflammatory response of monocytes/macrophages. **Cell Signal**, v. 23, n. 11, p. 1785-93, Nov 2011.

MIYAKI, E. et al. Interferon alpha treatment stimulates interferon gamma expression in type I NKT cells and enhances their antiviral effect against hepatitis C virus. **PLoS One**, v. 12, n. 3, p. e0172412, 2017.

MULLER-HERMELINK, N. et al. TNFR1 signaling and IFN-gamma signaling determine whether T cells induce tumor dormancy or promote multistage carcinogenesis. **Cancer Cell**, v. 13, n. 6, p. 507-18, Jun 2008.

MUTYAMBIZI, K.; BERGER, C. L.; EDELSON, R. L. The balance between immunity and tolerance: the role of Langerhans cells. **Cell Mol Life Sci**, v. 66, n. 5, p. 831-40, Mar 2009.

MYERS, E. R. et al. Mathematical model for the natural history of human papillomavirus infection and cervical carcinogenesis. **Am J Epidemiol**, v. 151, n. 12, p. 1158-71, Jun 15 2000.

NELSON, E. L.; STOCKDALE, C. K. Vulvar and vaginal HPV disease. **Obstet Gynecol Clin North Am**, v. 40, n. 2, p. 359-76, Jun 2013.

NESTLE, F. O. et al. Skin immune sentinels in health and disease. **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 10, p. 679-91, Oct 2009.

PAHNE-ZEPPEFELD, J. et al. Cervical cancer cell-derived interleukin-6 impairs CCR7-dependent migration of MMP-9-expressing dendritic cells. **Int J Cancer**, v. 134, n. 9, p. 2061-73, May 01 2014.

PATEL, H. et al. Systematic review of the incidence and prevalence of genital warts. **BMC Infect Dis**, v. 13, p. 39, Jan 25 2013.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res**, v. 29, n. 9, p. e45, May 01 2001.

PUNT, S. et al. Angels and demons: Th17 cells represent a beneficial response, while neutrophil IL-17 is associated with poor prognosis in squamous cervical cancer. **Oncoimmunology**, v. 4, n. 1, p. e984539, Jan 2015.

RANDOLPH, G. J.; OCHANDO, J.; PARTIDA-SANCHEZ, S. Migration of dendritic cell subsets and their precursors. **Annu Rev Immunol**, v. 26, p. 293-316, 2008.

ROJAS, J. M. et al. IL-10: A Multifunctional Cytokine in Viral Infections. **J Immunol Res**, v. 2017, p. 6104054, 2017.

ROONEY, J. W.; HOEY, T.; GLIMCHER, L. H. Coordinate and cooperative roles for NF-AT and AP-1 in the regulation of the murine IL-4 gene. **Immunity**, v. 2, n. 5, p. 473-83, May 1995.

SAEKI, H. et al. Cutting edge: secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) and CC chemokine receptor 7 (CCR7) participate in the emigration pathway of mature dendritic cells from the skin to regional lymph nodes. **J Immunol**, v. 162, n. 5, p. 2472-5, Mar 01 1999.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 74, n. 12, p. 5463-7, Dec 1977.

SASAGAWA, T.; TAKAGI, H.; MAKINODA, S. Immune responses against human papillomavirus (HPV) infection and evasion of host defense in cervical cancer. **J Infect Chemother**, v. 18, n. 6, p. 807-15, Dec 2012.

SHI, Y. J.; YANG, J.; YANG, W. Mechanistic investigation of immunosuppression in patients with condyloma acuminata. **Mol Med Rep**, v. 8, n. 2, p. 480-6, Aug 2013.

STUREGARD, E. et al. Human papillomavirus typing in reporting of condyloma. **Sex Transm Dis**, v. 40, n. 2, p. 123-9, Feb 2013.

TUMMERS, B. et al. CD40-mediated amplification of local immunity by epithelial cells is impaired by HPV. **J Invest Dermatol**, v. 134, n. 12, p. 2918-27, Dec 2014.

VANAUDENAERDE, B. M. et al. The role of the IL23/IL17 axis in bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. **Am J Transplant**, v. 8, n. 9, p. 1911-20, Sep 2008.

VELDHUIJZEN, N. J. et al. Factors affecting transmission of mucosal human papillomavirus. **Lancet Infect Dis**, v. 10, n. 12, p. 862-74, Dec 2010.

WANG, Z. et al. Role of IFN-gamma in induction of Foxp3 and conversion of CD4+ CD25- T cells to CD4+ Tregs. **J Clin Invest**, v. 116, n. 9, p. 2434-41, Sep 2006.

YOSHIMATSU, Y. et al. Roles of the PDZ-binding motif of HPV 16 E6 protein in oncogenic transformation of human cervical keratinocytes. **Cancer Sci**, Apr 25 2017.

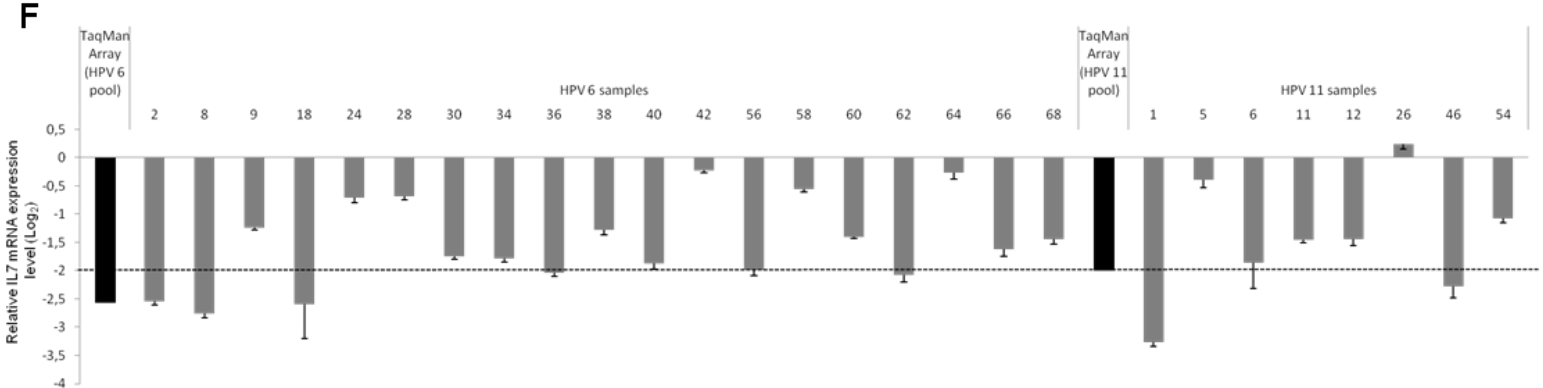
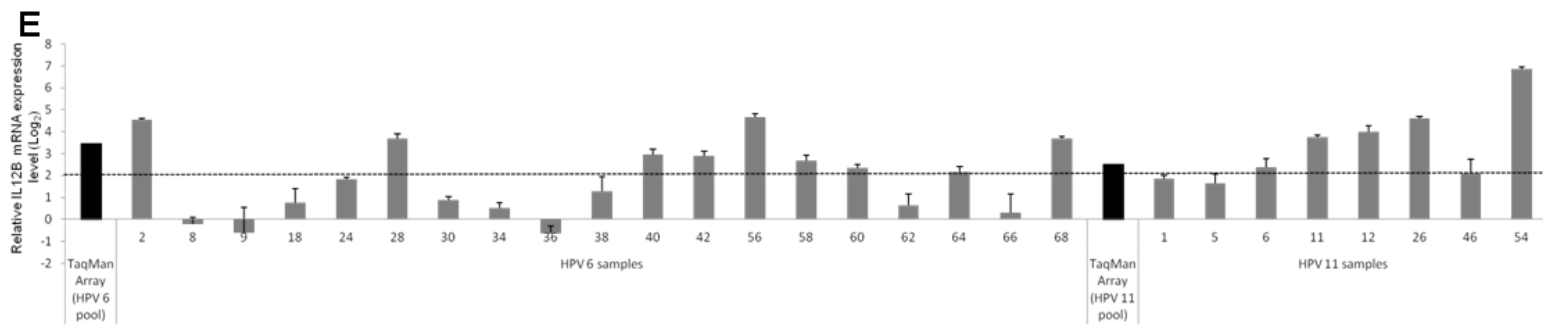
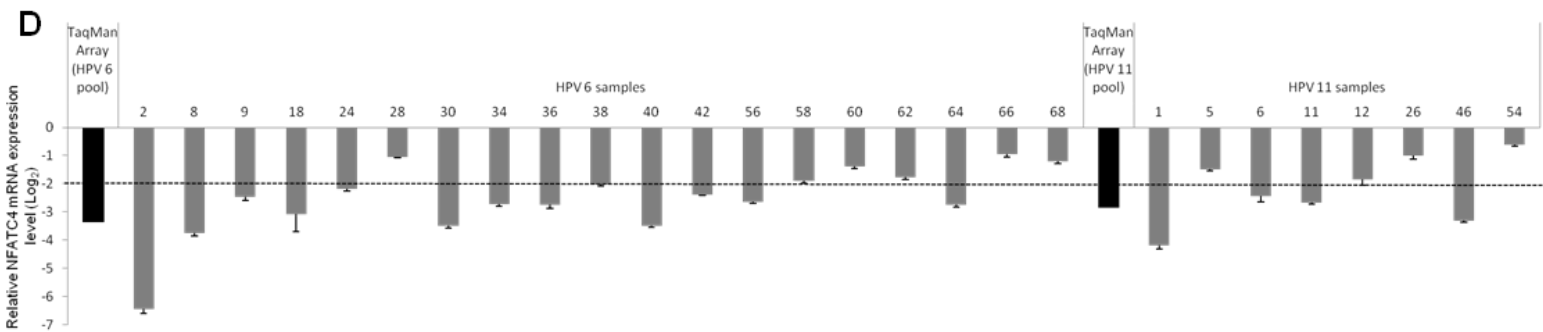
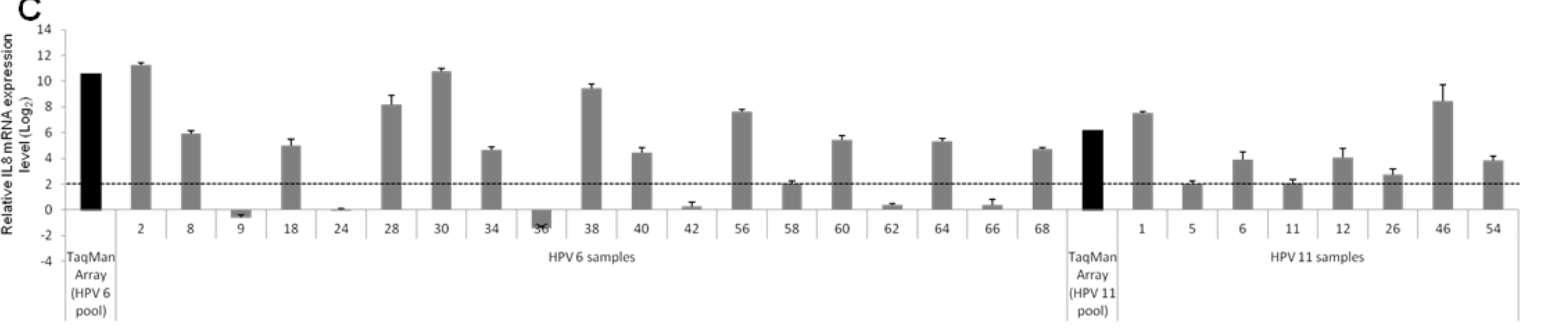
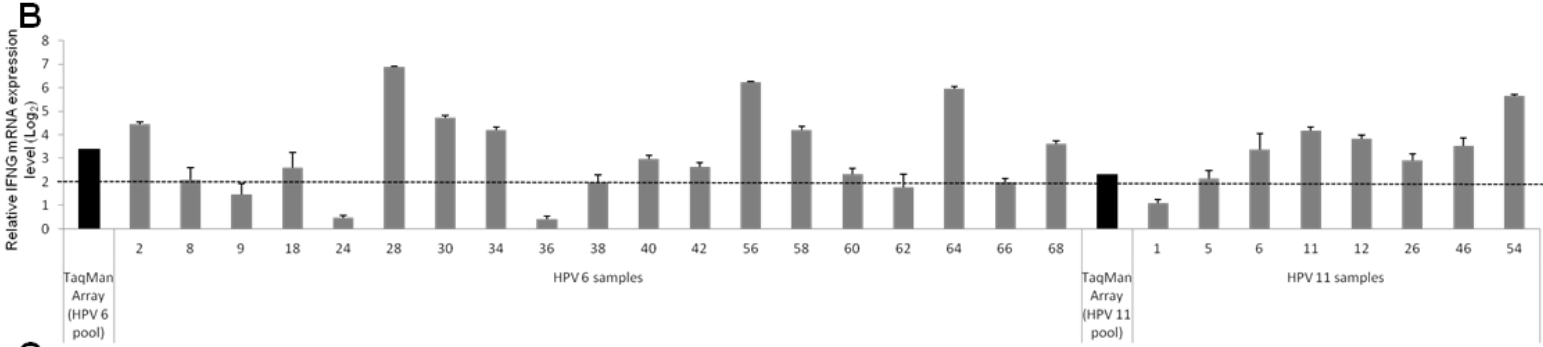
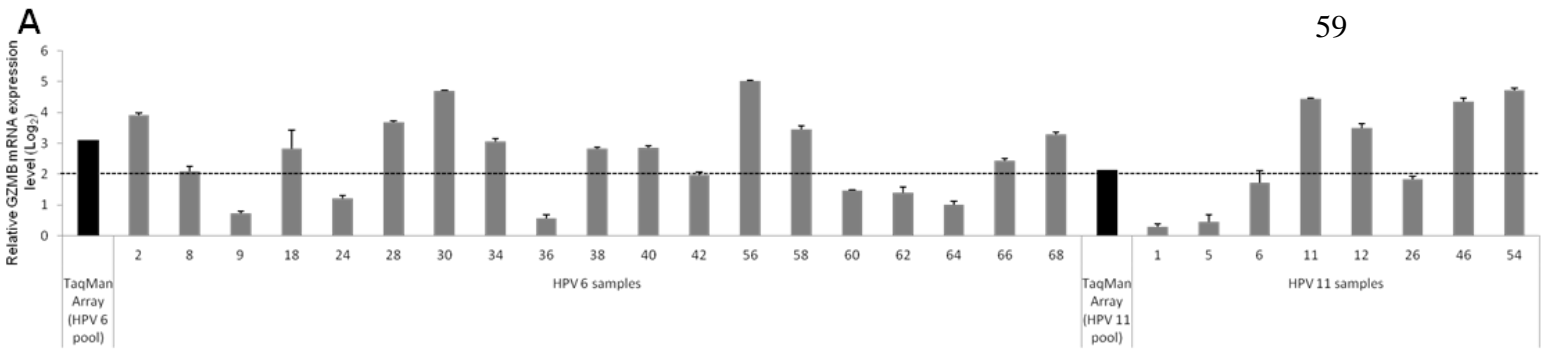


Figure 1. Validation by qPCR of immune-related genes differentially expressed in condyloma acuminata. The expression of the genes *GZMB*(A), *IFNG* (B), *IL8* (C), *NFATC4* (D), *IL12B* (E) and *IL7* (F) in condyloma samples (HPV6 positive and HPV 11 positive) compared to control (HPV negative samples) are shown as the fold change (log2) relative to expression.

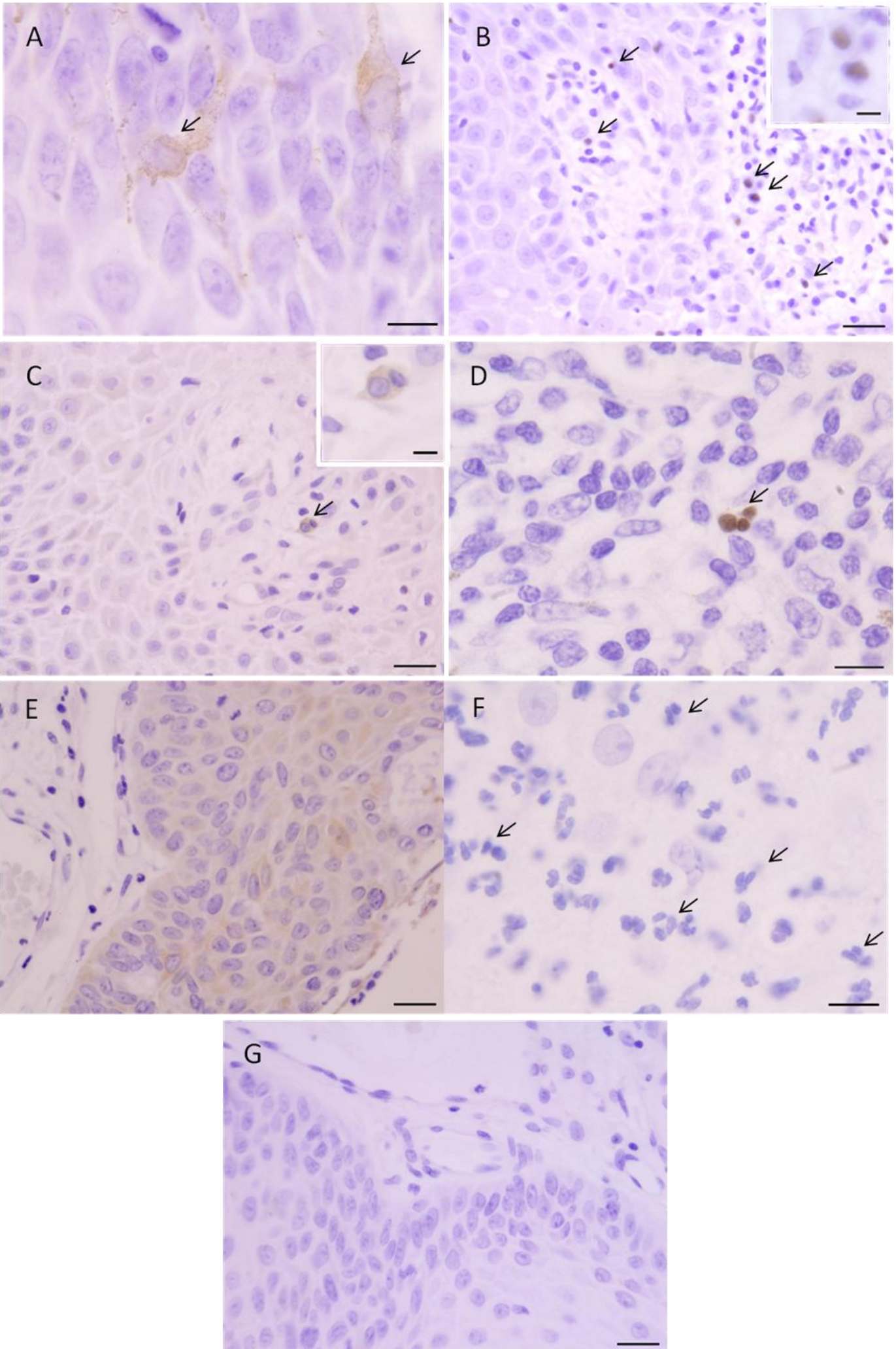


Figure 2. Qualitative analysis of immune cells in the lesion microenvironment. Dendritic cells (CD1a+) (arrows) were found in almost all samples (A). On the other hand cells FOXP3+ (arrows) were observed only in some patients (B). CD3+ (C) and CD8+ (D) cells (arrows). were presented only in two warts and CD4⁺ cells not observed. Condyloma's epithelial cells were IFNG positive (E). The innate immune cells, polymorphonuclear leukocytes (arrows), were the more frequent in the lesions, presented in all patients with variable abundance (F). Negative control without primary antibody (G). Bars: 20 μ M (B, C, E and G), 10 μ M (A, D and F), 5 μ M (B and C insets).

2. SUPPLEMENTARY MATERIAL

Table S1. Immune genes contained in the TaqMan Array Human Immune, Fast 96-Well Plate (Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA).

| Assay ID | Gene Symbol |
|-----------------|--------------------|
| Hs99999905_m1 | <i>GAPDH</i> |
| Hs99999909_m1 | <i>HPRT1</i> |
| Hs99999908_m1 | <i>GUSB</i> |
| Hs00174092_m1 | <i>IL1A</i> |
| Hs00174097_m1 | <i>IL1B</i> |
| Hs00174114_m1 | <i>IL2</i> |
| Hs00174117_m1 | <i>IL3</i> |
| Hs00174122_m1 | <i>IL4</i> |
| Hs00174200_m1 | <i>IL5</i> |
| Hs00174131_m1 | <i>IL6</i> |
| Hs00174202_m1 | <i>IL7</i> |
| Hs00174103_m1 | <i>IL8</i> |
| Hs00174125_m1 | <i>IL9</i> |
| Hs00174086_m1 | <i>IL10</i> |
| Hs00168405_m1 | <i>IL12A</i> |
| Hs00233688_m1 | <i>IL12B</i> |
| Hs00174379_m1 | <i>IL13</i> |
| Hs00174106_m1 | <i>IL15</i> |
| Hs00174383_m1 | <i>IL17A</i> |
| Hs00155517_m1 | <i>IL18</i> |
| Hs00234142_m1 | <i>CCL3</i> |
| Hs00171149_m1 | <i>CCL19</i> |
| Hs00234140_m1 | <i>CCL2</i> |
| Hs00174575_m1 | <i>CCL5</i> |
| Hs00174150_m1 | <i>CCR2</i> |
| Hs99999919_m1 | <i>CCR4</i> |
| Hs00152917_m1 | <i>CCR5</i> |
| Hs00171054_m1 | <i>CCR7</i> |
| Hs00171041_m1 | <i>CXCR3</i> |
| Hs00171042_m1 | <i>CXCL10</i> |
| Hs00171138_m1 | <i>CXCL11</i> |
| Hs00174164_m1 | <i>CSF1</i> |
| Hs00171266_m1 | <i>CSF2</i> |
| Hs00357085_g1 | <i>CSF3</i> |
| Hs00234174_m1 | <i>STAT3</i> |
| Hs00174517_m1 | <i>NFKB2</i> |
| Hs00233284_m1 | <i>IKBKB</i> |

| | |
|---------------|-----------------|
| Hs00167894_m1 | <i>CD3E</i> |
| Hs00181217_m1 | <i>CD4</i> |
| Hs00233520_m1 | <i>CD8A</i> |
| Hs00174333_m1 | <i>CD19</i> |
| Hs00166229_m1 | <i>IL2RA</i> |
| Hs00174796_m1 | <i>CD28</i> |
| Hs00233552_m1 | <i>CD38</i> |
| Hs00374176_m1 | <i>CD40</i> |
| Hs00365634_g1 | <i>PTPRC</i> |
| Hs00154355_m1 | <i>CD68</i> |
| Hs00175478_m1 | <i>CD80</i> |
| Hs00199349_m1 | <i>CD86</i> |
| Hs00175480_m1 | <i>CTLA4</i> |
| Hs00163934_m1 | <i>CD40LG</i> |
| Hs00219575_m1 | <i>HLA DRA</i> |
| Hs99999917_m1 | <i>HLA DRB1</i> |
| Hs00203436_m1 | <i>TBX21</i> |
| Hs00188346_m1 | <i>TNFRSF18</i> |
| Hs00359999_m1 | <i>ICOS</i> |
| Hs00167248_m1 | <i>NOS2</i> |
| Hs00153350_m1 | <i>BCL2</i> |
| Hs00169141_m1 | <i>BCL2L1</i> |
| Hs00180269_m1 | <i>BAX</i> |
| Hs00164932_m1 | <i>ICAM1</i> |
| Hs00174583_m1 | <i>SELP</i> |
| Hs00174057_m1 | <i>SELE</i> |
| Hs00157965_m1 | <i>HMOX1</i> |
| Hs00153133_m1 | <i>PTGS2</i> |
| Hs00189742_m1 | <i>LRP2</i> |
| Hs00167927_m1 | <i>CYP1A2</i> |
| Hs00167982_m1 | <i>CYP7A1</i> |
| Hs00174143_m1 | <i>IFNG</i> |
| Hs00169473_m1 | <i>PRF1</i> |
| Hs00188051_m1 | <i>GZMB</i> |
| Hs00246266_m1 | <i>GNLY</i> |
| Hs00163653_m1 | <i>FAS</i> |
| Hs00181225_m1 | <i>FASLG</i> |
| Hs00171257_m1 | <i>TGFB1</i> |
| Hs00232222_m1 | <i>SMAD3</i> |
| Hs00178696_m1 | <i>SMAD7</i> |
| Hs00161707_m1 | <i>SKI</i> |
| Hs00365052_m1 | <i>FN1</i> |
| Hs00163811_m1 | <i>C3</i> |
| Hs00174128_m1 | <i>TNF</i> |
| Hs00236874_m1 | <i>LTA</i> |
| Hs00174179_m1 | <i>ACE</i> |

| | |
|---------------|---------------|
| Hs00173626_m1 | <i>VEGFA</i> |
| Hs00156373_m1 | <i>CD34</i> |
| Hs00241341_m1 | <i>AGTR1</i> |
| Hs00169126_m1 | <i>AGTR2</i> |
| Hs00174961_m1 | <i>EDN1</i> |
| Hs00171455_m1 | <i>LIF</i> |
| Hs00209771_m1 | <i>LY96</i> |
| Hs00236988_g1 | <i>MIF</i> |
| Hs00190046_m1 | <i>NFATC3</i> |
| Hs00190037_m1 | <i>NFATC4</i> |
| Hs00236998_m1 | <i>PF4</i> |
| Hs00374292_m1 | <i>SYK</i> |

1. CONCLUSÕES

Conclui-se que as amostras de condiloma acuminado estudadas exibem uma resposta imune parcial, uma vez que apresentaram:

- i. Superexpressão de citocinas descritas na literatura tanto como pró-inflamatórias quanto imunossupressoras.
- ii. Predominância de células polimorfonucleares, representando a resposta imune inata.
- iii. Poucas células de Langerhans, essenciais para estimular respostas imunes inatas e adaptativas efetivas.
- iv. Poucas células T regulatórias.
- v. Ausência de células T.