



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**BÁRBARA RAFAELA DA SILVA BARROS**

**AVALIAÇÃO *IN VIVO* DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA PROMOVIDA PELA**  
**LINHAGEM TUMORAL C3 EM CAMUNDONGOS C57BL/6**

**RECIFE**  
**2026**

BÁRBARA RAFAELA DA SILVA BARROS

**AVALIAÇÃO *IN VIVO* DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA PROMOVIDA PELA  
LINHAGEM TUMORAL C3 EM CAMUNDONGOS C57BL/6**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Farmácia da  
Universidade Federal de Pernambuco,  
Centro Acadêmico de Recife, como  
requisito para a obtenção do grau de  
Bacharel em Farmácia.

**Orientador(a):** Profa. Dra. Cristiane  
Moutinho Lagos de Melo

RECIFE  
2026

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Barros, Bárbara Rafaela da Silva.

Avaliação in vivo da resposta imunológica promovida pela linhagem tumoral C3 em camundongos C57BL/6 / Bárbara Rafaela da Silva Barros. - Recife, 2026.

60 : il., tab.

Orientador(a): Cristiane Moutinho Lagos de Melo

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Farmácia - Bacharelado, 2026.

Inclui referências.

1. C3. 2. Câncer do Colo do Útero. 3. HPV. 4. Microambiente Tumoral. I. Melo, Cristiane Moutinho Lagos de. (Orientação). II. Título.

610 CDD (22.ed.)



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**CURSO DE BACHARELADO EM FARMÁCIA**



Aprovada em: 15/01/2026.

**BANCA EXAMINADORA**

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** CRISTIANE MOUTINHO LAGOS DE MELO  
Data: 16/01/2026 12:34:57-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Profa. Dra. Cristiane Moutinho Lagos De Melo  
(Orientadora)  
Universidade Federal de Pernambuco

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** DANIELLE PATRICIA CERQUEIRA MACEDO  
Data: 15/01/2026 22:32:05-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Profa. Dra. Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo  
(Presidente e Examinadora)  
Universidade Federal de Pernambuco

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** GEORON FERREIRA DE SOUSA  
Data: 15/01/2026 15:22:29-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Me. Georon Ferreira De Sousa  
(Examinador)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof. Dr. Jeymesson Raphael Cardoso Vieira  
(Suplente)  
Universidade Federal de Pernambuco



## **AGRADECIMENTOS**

Antes de tudo, agradeço a Deus pelas oportunidades que me deu até hoje. Tudo isso não seria possível sem Ele.

À minha família, especialmente aos meus Avós: Lozinha (em memória) e Zé Lopes (em memória), que me ampararam, cuidaram de mim, e me ofereceram a melhor coisa que qualquer filho pode ter por herança: a oportunidade de estudar. Meus avós priorizaram o que eu mais desejei na minha infância e juventude: conhecimento. Graças a eles dois, minha vida tomou o rumo que trilho hoje. O meu amor será deles enquanto eu viver. Sou grata também à minha mãe Eunice, por suas orações e conselhos.

Ao meu esposo Heverson, que sempre me apoiou e me amou com toda a intensidade do seu coração. Você está comigo em todos os momentos da minha vida. Obrigada por teu amor e carinho. Eu amo você.

À minha sogra Juraci que nunca me deixou desistir dos meus sonhos. Obrigada por sempre me lembrar de como eu sou gigante, e por muitas vezes segurar o espelho da vida e me mostrar o quanto sou capaz. A senhora é um presente de Deus para mim.

À minha orientadora Cristiane Moutinho que me acolheu por tantos anos. Você sempre esteve ali. Sempre me fazendo lembrar de que eu sou forte e capaz. Obrigada por seus conselhos, sua confiança e seu orgulho por mim. Jamais esquecerei de tudo o que você foi e é para mim. Você é incrível! Amo você.

Às minhas amigas da graduação (Jujubinha, Gabizinha e Tatá) por terem sido como um barco e um porto seguro em todos esses anos. Às vezes tento imaginar como teria sido essa jornada sem a companhia de vocês, e me convenço de que seriam anos tenebrosos e muito mais dolorosos do que realmente foram. Vocês foram socorro, esperança e alento nas maiores tempestades que vivi na graduação. E sempre que pensei que não conseguiria, vocês estavam ali, nas madrugadas, nas bibliotecas, no LAIA, na rua, nos caminhos pela Federal, no Meet, estudando junto comigo, segurando a minha mão, me ajudando nos assuntos mais difíceis e me abraçando nos momentos de dor. Vocês enxugaram muitas lágrimas, e me ouviram

nos momentos de angústia. A vocês, a minha gratidão, minha amizade genuína e todo o meu amor.

Ao meu Geoh que compartilha comigo a sua amizade há tantos anos. Você é aquele socorro, aquele conselho em momentos de urgência. Você é aquele amigo que é luz no meu caminho. Tua ausência machuca muito, mas sei que vc sempre estará aí por mim, assim como eu sempre estarei aqui por você. Eu amo você, bisha. Amo demais.

Ao meu amigo João que sempre teve uma palavra de apoio e conselhos ricos de afeto e de Deus para a minha vida. Muito obrigada por ser essa pessoa incrível. Deus te preserve como vc é, amigo. As minhas amigas Duda, Alina, Pamela, Luana, Sara e Evelen por serem tão essenciais na minha vida. Minha gratidão eterna pelo amor de vcs e por todo carinho que dispensam a mim.

Agradeço também aos meus professores do DCFAR, em especial à Profa Dra Dani Macedo, à Profa Dra Betania Hatzlhofer, o prof. Dr. Lucas Danda, profa. Dra Silvana Maggi, prof. Dr. Ricardo Brandao, profa. Dra. Valdenia Souza, profa. Dra. Marina Oliveira e prof. Dr. Rodrigo Caiana, por fazerem parte da minha formação de formação tão brilhante. Hoje estou a um passo de ser a profissional farmacêutica que construíram. A vocês todo o meu respeito, orgulho e admiração.

Também sou grata aos meus colegas da turma 2021.2 que sempre estiveram unidos e foram bons companheiros nessa jornada tão desafiadora.

Não podia esquecer também de todos os meus preceptores dos 6 (seis) estágios supervisionados obrigatórios e as respectivas instituições: a Farmacêutica Dra Josi (Farmácia Pague Menos); ao Dr. Rogério, Dra Marcela Lira e as técnicas Flor e Vitória (Dermatoflora – Manipulacao); os Farmacêuticos Oncológicos Dr. Raí Nogueira e Dr. Douglas Tavares (HC/UFPE); os técnicos de oncologia Pietra Beltrão e Zé Carlos (HC/UFPE); os Analistas Clínicos Doutores Madi Diniz e Alexandro Silva (Hematologia HC/UFPE); Monica Lima, Wendel César e Will (Sorologia HC/UFPE); René, Elaine e Márcio (Bacteriologia HC/UFPE); Jaqueline e Andrea (Bioquímica HC/UFPE); Eliane (Uroanálises HC/UFPE); à técnica e Farmacêutica Dra Ircilla que um dia foi minha aluna e hoje também contribuiu para a minha formação no setor de Coleta do HC/UFPE; Além desses, minha gratidão aos demais servidores do

Hospital das Clínicas da UFPE. Todos vocês somaram mais um tijolinho na minha construção. Obrigada por tudo!

Agradeço também aos demais profissionais e servidores que compõem a coordenação do curso de farmácia e também do Centro de Ciências da Saúde e Centro de Biociências da UFPE. Dos profissionais de limpeza aos das secretarias, devo a minha gratidão pelo suporte, apoio e auxílio que foram essenciais para a minha formação.

A todos os que direta e indiretamente contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional, minha eterna gratidão.

*"Nada na vida deve ser temido, apenas compreendido. Agora é hora de compreender mais, para que possamos temer menos."*

CURIE, Marie. *Discurso na Sorbonne*. Paris, 1933.

## RESUMO

O câncer cervical associado ao papilomavírus humano (HPV) caracteriza-se por mecanismos complexos de evasão imune e por um microambiente tumoral frequentemente pouco inflamatório, o que justifica o uso de modelos experimentais imunocompetentes para o estudo de sua biologia e da resposta imune antitumoral. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar o crescimento tumoral, os efeitos sistêmicos e o perfil imunológico associados ao desenvolvimento tumoral no modelo murino C3, amplamente utilizado como representação experimental de neoplasias HPV-associadas. Para isso, camundongos C57BL/6 foram distribuídos em grupos experimentais com e sem tumor, sendo monitorados quanto ao crescimento tumoral, consumo alimentar e peso corporal ao longo do experimento. Ao final, foram realizadas análises hematológicas, avaliação histopatológica de órgãos periféricos e das massas tumorais, além de imunofenotipagem de células imunes por citometria de fluxo, com foco em linfócitos T e células NK. Os resultados demonstraram crescimento tumoral progressivo nos animais inoculados, mais acentuado em um dos grupos experimentais, associado à perda ponderal tardia sem redução proporcional do consumo alimentar. Os parâmetros hematológicos globais permaneceram preservados, embora tenha sido observada modulação seletiva da resposta leucocitária periférica. A análise histopatológica evidenciou preservação estrutural dos órgãos avaliados, enquanto as massas tumorais apresentaram heterogeneidade morfológica, necrose central, estroma reativo e infiltrado inflamatório escasso. A imunofenotipagem revelou redução relativa de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e de células NK nos animais portadores de tumor, sem alterações detectáveis na expressão de marcadores citotóxicos avaliados. Em conjunto, os achados indicam que o modelo C3 reproduz características relevantes do microambiente tumoral associado ao câncer cervical HPV-dependente, incluindo crescimento tumoral consistente, imunossupressão seletiva e baixa infiltração inflamatória, validando sua aplicabilidade para estudos de imunologia tumoral e avaliação pré-clínica de estratégias imunoterapêuticas.

**Palavras-chave:** C3. Câncer do colo do útero. HPV. Microambiente tumoral.

## ABSTRACT

Cervical cancer associated with human papillomavirus (HPV) is characterized by complex mechanisms of immune evasion and a frequently poorly inflammatory tumor microenvironment, which justifies the use of immunocompetent experimental models to study its biology and antitumor immune responses. In this context, the present study aimed to characterize tumor growth, systemic effects, and the immunological profile associated with tumor development in the murine C3 model, widely used as an experimental representation of HPV-associated neoplasms. For this purpose, C57BL/6 mice were allocated into experimental groups with and without tumors and monitored for tumor growth, food intake, and body weight throughout the experiment. At the end of the experimental period, hematological analyses, histopathological evaluation of peripheral organs and tumor masses, and immunophenotyping of immune cells by flow cytometry were performed, focusing on T lymphocytes and NK cells. The results demonstrated progressive tumor growth in inoculated animals, more pronounced in one of the experimental groups, associated with late body weight loss without a proportional reduction in food intake. Global hematological parameters remained preserved, although selective modulation of the peripheral leukocyte response was observed. Histopathological analysis showed preserved structural integrity of the evaluated organs, whereas tumor masses exhibited marked morphological heterogeneity, central necrosis, reactive stroma, and scarce inflammatory infiltrate. Immunophenotyping revealed a relative reduction in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes and NK cells in tumor-bearing animals, with no detectable changes in the expression of the evaluated cytotoxic markers. Taken together, these findings indicate that the C3 model reproduces relevant features of the tumor microenvironment associated with HPV-dependent cervical cancer, including consistent tumor growth, selective immunosuppression, and low inflammatory infiltration, supporting its applicability for studies in tumor immunology and for the preclinical evaluation of immunotherapeutic strategies.

**Keywords:** C3. Cervical cancer. HPV. Tumor microenvironment.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Figura 1.** Esquema dos principais mecanismos moleculares da oncogênese cervical associada ao HPV, destacando a ação das oncoproteínas virais E6 e E7 na inativação de p53 e pRB, com consequente desregulação do ciclo celular e promoção da transformação neoplásica.

**Figura 2.** Resposta imunológica à infecção pelo papilomavírus humano (HPV) no epitélio cervical e dos principais mecanismos de evasão imune mediados pelas oncoproteínas virais E6 e E7, que favorecem a persistência viral e a progressão tumoral.

**Figura 3.** Evolução histopatológica do câncer cervical associada à infecção persistente pelo papilomavírus humano (HPV), ilustrando a progressão do epitélio cervical normal para lesões intraepiteliais cervicais de baixo e alto grau (NIC 1, NIC 2 e NIC 3) e, subsequentemente, para o carcinoma invasivo.

**Figura 4.** Representação do microambiente tumoral imunossupressor no câncer cervical associado ao papilomavírus humano (HPV), evidenciando a interação entre células tumorais e populações imunes regulatórias e a inibição funcional de células efetoras, favorecendo a evasão da resposta imune, a persistência tumoral e a progressão da doença.

**Figura 5.** Esquema ilustrativo da origem e caracterização da linhagem tumoral C3, derivada de células embrionárias de camundongos C57BL/6 transfectadas com o genoma completo do HPV16 e um oncogene *ras* ativado, resultando em transformação maligna e capacidade tumorigênica em camundongos imunocompetentes.

**Figura 6.** Representação esquemática do modelo tumoral C3 em camundongos C57BL/6, destacando a inoculação subcutânea das células, a formação da massa tumoral e a interação com o sistema imune, além da comparação conceitual entre os modelos C3 e TC-1 e suas aplicações em estudos pré-clínicos de imunoterapia e evasão imune.

**Figura 7.** Tamanho tumoral ao longo do tempo nos grupos portadores de tumor (Grupo A e Grupo B) e nos grupos controle (CTR e NT).

**Figura 8.** Consumo alimentar médio dos animais ao longo do tempo nos grupos experimentais CTR, NT, Grupo A e Grupo B.

**Figura 9.** Peso corporal dos animais ao longo do tempo nos grupos experimentais CTR, NT, Grupo A e Grupo B.

**Figura 10.** Comparação dos parâmetros hematológicos entre grupos com e sem tumor. Foram avaliados a contagem total de leucócitos (A) e o percentual de linfócitos (B), neutrófilos (C), monócitos (D), eosinófilos (E) e basófilos (F) nos grupos CTR e NT (sem tumor) e GA e GB (com tumor). Diferenças significativas foram observadas para linfócitos (B,  $p = 0,0159$ ) e neutrófilos (C,  $p = 0,0286$ ), sem alterações nos demais parâmetros.

**Figura 11.** Análise histopatológica dos órgãos dos grupos teste e controle negativo, incluindo coração (A), baço (B), intestino (C), rim (D) e fígado (E), evidenciando preservação estrutural e ausência de alterações histomorfológicas ou infiltrados inflamatórios em todos os grupos. Ampliação microscópica: 100×.

**Figura 12.** Avaliação histopatológica das massas tumorais. As amostras B1, B2, B4, B6 e B7 apresentaram áreas tumorais restritas, com células neoplásicas organizadas de forma concêntrica ou difusa, associadas a edema e detritos necróticos, com infiltrado inflamatório ausente ou discreto. A amostra B3 exibiu área tumoral difusa com aumento de capilares, sugerindo vascularização tumoral. Na amostra B5, não foram observadas células neoplásicas. Ampliação microscópica: 500×.

**Figura 13.** Análise imunofenotípica das populações imunes nos grupos experimentais (CTR, NT, Grupo A e Grupo B), incluindo linfócitos T totais ( $CD3^+CD45^+$ , A), linfócitos T auxiliares ( $CD3^+CD45^+CD4^+$ , B), linfócitos T auxiliares citotóxicos ( $CD3^+CD45^+CD4^+GRANZ^+$ , C) e células NK ( $CD45^+CD16/32^+$ , D), bem



como subpopulações citotóxicas positivas para perforina (E) e granzima (F). Diferenças significativas estão indicadas pelos valores de  $p$ , evidenciando alterações específicas em linfócitos T auxiliares e células NK entre os grupos.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Parâmetros hematológicos dos Grupos A, B, CTR e NT.

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

**ABX** – Analisador hematológico automatizado

**APC** – Alocianina

**C57BL/6** – Camundongos da linhagem black

**CD** – Grupamento de diferenciação

**CEUA** – Comitê de Ética no Uso de Animais

**CTR** – Controle

**CXCL** – Ligante de Quimiocina C-X-C

**DNA** – Ácido desoxirribonucleico

**EDTA** – Ácido etilenodiamino tetra-acético

**EUA** – Estados Unidos da América

**FITC** – Fluoresceína isotiocianato

**FOXP3** – Fator de transcrição forkhead box P3

**GA** – Grupo A

**GB** – Grupo B

**HCM** – Hemoglobina Corpuscular Média

**HE** – Hematoxilina/Eosina

**HPV** – Papilomavírus Humano

**IDH** – Índice de Desenvolvimento Humano

**IFN** – Interferon

**IL** – Interleucina

**INCA** – Instituto Nacional de Câncer

**ISGs** – Genes estimulados por interferon

**LIKA** – Laboratório de Imunologia Keizo Asami

**MHC** – Complexo Principal de Histocompatibilidade

**NK** – Células Natural Killer

**NT** – Sem Tumor

**OMS** – Organização Mundial da Saúde

**PAMPs** – Padrões Moleculares Associados a Patógenos

**PBMC** – Células Mononucleares do Sangue Periférico

**PD-1** – Receptor de Morte Programada 1

**PE** – Ficoeritrina

**PECy** – Ficoeritrina conjugada à cianina

**PERF** – Perforina

**PRRs** – Receptores de Reconhecimento de Padrões

**pRB** – Proteína do Retinoblastoma

**RB1** – Gene Retinoblastoma 1

**RPMI** – Meio Roswell Park Memorial Institute

**TGF- $\beta$**  – Fator de Crescimento Transformador beta

**Th1** – Linfócitos T auxiliares do tipo 1

**TLR** – Receptor do tipo Toll

**TME** – Microambiente tumoral

**TNF- $\alpha$**  – Fator de Necrose Tumoral alfa

**Treg** – Linfócitos T Reguladores

**UFPE** – Universidade Federal de Pernambuco

**VCM** – Volume Corpuscular Médio

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>9</b>
1.1 OBJETIVOS.....	11
1.1.1 Objetivo Geral.....	11
1.1.2 Objetivos Específicos.....	11
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>12</b>
2.1 EPIDEMIOLOGIA E RELEVÂNCIA CLÍNICA.....	12
2.2 ETIOLOGIA VIRAL E O PAPEL DO HPV NA ONCOGÊNESE CERVICAL.....	13
2.3 RESPOSTA IMUNOLÓGICA NA INFECÇÃO PELO HPV.....	16
2.4 PROGRESSÃO HISTOPATOLÓGICA DO CÂNCER CERVICAL ASSOCIADA AO HPV.....	19
2.5 IMUNOPATOLOGIA DO CÂNCER CERVICAL: MICROAMBIENTE TUMORAL E IMUNOSSUPRESSÃO.....	20
2.6 LINHAGEM TUMORAL C3: HISTÓRICO E PRINCIPAIS APLICAÇÕES.....	24
2.7 IMPORTÂNCIA DA CARACTERIZAÇÃO IMUNOLÓGICA DO MODELO C3.....	25
<b>3 METODOLOGIA.....</b>	<b>28</b>
3.1 POPULAÇÃO AMOSTRAL E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	28
3.2 INOCULAÇÃO DAS CÉLULAS C3.....	28
3.3 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	29
3.4 ANÁLISE HEMATOLÓGICA.....	29
3.5 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	29
3.6 ENSAIO DE IMUNOFENOTIPAGEM.....	30
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>32</b>
4.1 CRESCIMENTO TUMORAL SOBRE O PESO CORPORAL E O CONSUMO ALIMENTAR DOS ANIMAIS.....	32
4.2 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E ANÁLISE DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS.....	34
4.3 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DE ÓRGÃOS E TUMORES.....	35
4.4 IMUNOFENOTIPAGEM.....	39
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>41</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>44</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>45</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer do colo do útero permanece como uma importante causa de morbimortalidade feminina em nível global, mesmo diante dos avanços na vacinação contra o papilomavírus humano (HPV). Estimativas recentes indicam cerca de 615.000 novos casos e aproximadamente 340.000 óbitos por câncer cervical em 2023, evidenciando que a doença ainda representa um relevante desafio em saúde pública (Siegel et al., 2023). Nesse contexto, estratégias baseadas na prevenção primária e no rastreamento continuam sendo fundamentais para o controle da doença. A Organização Mundial da Saúde (OMS) enfatiza a vacinação precoce e o rastreamento como elementos essenciais para a sua eliminação (Yuan et al., 2023).

A etiologia do câncer cervical está associada à infecção por tipos oncogênicos do Papilomavírus Humano (HPV), especialmente as variantes HPV16 e HPV18. Dos 200 genótipos conhecidos, 12 são classificados como carcinogênicos, incluindo os tipos 16, 18, 31 e 33, conforme identificado pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (Johnson et al., 2019). O HPV16 é responsável por 50% dos casos, seguido pelo HPV18, com 10% (Kurmar et al., 2022), o que ressalta sua relevância na etiologia e prevenção do câncer cervical (Quinlan, 2021).

De modo geral, aproximadamente 90% desses cânceres são carcinomas de células escamosas, enquanto 10% correspondem a adenocarcinomas, originados a partir de células glandulares do colo uterino (Islam et al., 2023). Em casos graves, o câncer cervical pode tornar-se metastático, disseminando-se para os ossos, pulmões, fígado e cérebro. Além disso, pode migrar para linfonodos pélvicos e para-aórticos por meio da via linfática (Saleh et al., 2020). A doença progride lentamente e pode ser inicialmente assintomática, evoluindo para sangramento vaginal, secreção anormal e dor abdominal nos estágios avançados (INCA, 2021). O tratamento depende de fatores como o estadiamento da doença, incluindo o potencial metastático, o tamanho da massa tumoral, o comprometimento linfático, bem como a idade e o estado geral de saúde da paciente (Cohen et al., 2019).

A infecção pelo HPV apresenta um ciclo replicativo lento e baixa expressão de proteínas virais, o que permite escapar da resposta inflamatória e dificulta a eliminação pelo sistema imune (Yousefi et al., 2022). Durante a replicação, o vírus suprime genes associados a citocinas pró-inflamatórias, receptores como TLRs e MHC-I, desregula a metilação do DNA e modifica histonas (SONG et al., 2020). As

oncoproteínas virais, como E6 e E7, interferem na imunidade inata e inativam genes supressores tumorais, incluindo p53 e RB1, promovendo a transformação celular e o desenvolvimento tumoral no local da infecção (Gardella et al., 2023).

A busca por novos fármacos e imunoterapias impulsiona o desenvolvimento de modelos experimentais inovadores para o estudo do câncer e de seu microambiente tumoral. Um modelo relevante para o câncer cervical humano baseia-se na linhagem celular C3, desenvolvida em 1993 na Faculdade de Medicina da Universidade de Leiden (Feltkamp et al., 1993). Esse modelo experimental deriva de células embrionárias de camundongos C57BL/6 B6 MEC, transfectadas com o genoma completo do HPV16 e um gene *ras* ativado, a fim de simular os padrões de expressão oncogênica do HPV em infecções humanas (Kayyal et al., 2012; Paolini et al., 2021).

Até o momento, estudos vêm utilizando a linhagem C3 como modelo experimental no desenvolvimento de estratégias terapêuticas e vacinais contra tumores (Loddenkemper et al., 2009). No entanto, nenhum estudo avaliou de forma abrangente o perfil imunológico desse modelo experimental *in vivo*, com o objetivo de confirmar as características fundamentais que estabelecem a linhagem C3 como um modelo experimental consistente e confiável. Isso inclui a capacidade de mimetizar o câncer cervical não apenas quanto à expressão de oncoproteínas, já comprovada na literatura, mas também em relação ao seu perfil de resposta imune.

Este estudo fornece uma análise do perfil imunológico do microambiente tumoral e da resposta sistêmica durante o desenvolvimento de tumores da linhagem C3. Os achados visam identificar novos alvos terapêuticos e biomarcadores, contribuindo para o desenvolvimento de futuras estratégias contra o câncer do colo do útero.

## **1.1 OBJETIVOS**

### **1.1.1 Objetivo Geral**

Investigar os perfis de resposta imunológica e de desenvolvimento tumoral promovidos pela linhagem C3 em camundongos C57BL/6.

### **1.1.2 Objetivos Específicos**

- Acompanhar o desenvolvimento dos tumores promovidos pela C3 no tecido subcutâneo dos animais até o momento das eutanásias;
- Investigar possíveis alterações hematológicas promovidas pelo tumor em seus aspectos morfológicos e pelo hemograma;
- Identificar possíveis alterações histopatológicas nos órgãos e tumores coletados dos animais;
- Compreender o tipo de perfil imunológico induzido pelo tumor.



## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 EPIDEMIOLOGIA E RELEVÂNCIA CLÍNICA

O câncer do colo do útero permanece como um dos principais desafios de saúde pública, especialmente em países de baixa e média renda, mesmo diante dos avanços em rastreamento citológico e vacinação contra o Papilomavírus Humano (HPV) (Fielding et al., 2021; Chan et al., 2019). De acordo com estimativas globais recentes, trata-se do quarto câncer mais comum entre mulheres, com cerca de 615.000 novos casos e aproximadamente 340.000 óbitos por câncer cervical em 2023, dos quais cerca de 94% ocorreram em países de baixa e média renda, refletindo desigualdades no acesso ao diagnóstico precoce e ao tratamento adequado (OMS, 2025).

No Brasil, excluídos os tumores de pele não melanoma, o câncer do colo do útero configura-se como a terceira neoplasia maligna mais incidente entre mulheres, mantendo elevada relevância epidemiológica e clínica. Para o triênio 2023–2025, são estimados 17.010 casos novos por ano, correspondendo a uma taxa ajustada de incidência de 13,25 casos por 100 mil mulheres. Em relação à mortalidade, 7.209 óbitos foram registrados em 2023, com taxa ajustada de 4,79 óbitos por 100 mil mulheres, evidenciando a persistência do impacto da doença no cenário nacional (INCA, 2025).

Na análise regional, observa-se maior carga da doença nas regiões Norte e Nordeste, associada a barreiras estruturais no acesso aos serviços de saúde, o que contribui para diagnóstico tardio e maior letalidade (Che et al., 2020). Em Pernambuco, por exemplo, o câncer do colo do útero permanece como importante causa de mortalidade feminina, reforçando a relevância regional do problema (Cavalcanti, 2022).

Além de seu impacto epidemiológico, o câncer do colo do útero apresenta significativa relevância clínica. Cerca de 90% dos casos são classificados como carcinomas de células escamosas, enquanto aproximadamente 10% correspondem ao tipo adenocarcinoma, originado a partir de células glandulares do colo uterino (Islam et al., 2023). Em estágios avançados, a doença pode apresentar metástases em ossos, pulmões, fígado e cérebro, e, por via linfática, alcançar linfonodos pélvicos e periaórticos (Saleh et al., 2020). Trata-se de uma patologia de progressão

lenta, frequentemente assintomática nas fases iniciais, mas que evolui com sintomas como sangramento vaginal anormal, dor pélvica e alterações urinárias ou intestinais nas fases mais avançadas (Cohen et al., 2019).

O tratamento é multifatorial e depende do estadiamento tumoral, da presença de metástases, da idade e das condições clínicas da paciente, envolvendo cirurgia, radioterapia e quimioterapia, isoladas ou combinadas (Cohen et al., 2019). Além disso, o tratamento de formas avançadas da doença é consideravelmente mais oneroso do que sua prevenção, gerando sobrecarga ao sistema público de saúde (Deshmukh et al., 2024).

Nesse contexto, estratégias de prevenção primária e secundária assumem papel central no controle da doença. O rastreamento por exame citopatológico do colo do útero (Papanicolau) permite a detecção de lesões precursoras e a interrupção da progressão para o câncer invasivo quando associado ao tratamento oportuno. Paralelamente, a vacinação contra o HPV, recomendada prioritariamente para meninas de 9 a 14 anos, constitui uma medida eficaz na prevenção de infecções persistentes por genótipos oncogênicos, sendo reconhecida pela Organização Mundial da Saúde e pelo INCA como uma ferramenta fundamental na redução da incidência e da mortalidade por câncer do colo do útero (OMS, 2025; INCA, 2025).

## 2.2 ETIOLOGIA VIRAL E O PAPEL DO HPV NA ONCOGÊNESE CERVICAL

A infecção persistente pelo papilomavírus humano (HPV) é reconhecida como o principal fator etiológico do câncer do colo do útero, estando associada a mais de 95% dos casos diagnosticados globalmente (Horst et al., 2024). Entre os diversos genótipos descritos, os tipos HPV16 e HPV18 apresentam maior potencial oncogênico e são responsáveis por aproximadamente 60% dos casos de câncer cervical invasivo (Tadlaoui et al., 2020). Esses genótipos pertencem ao grupo de HPVs de alto risco, caracterizados pela capacidade de induzir alterações celulares persistentes que favorecem a transformação maligna.

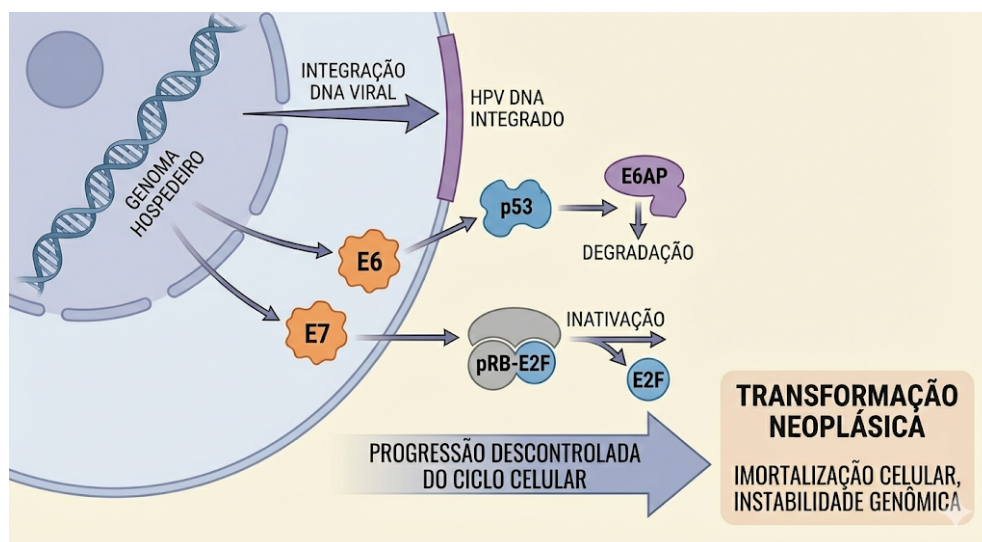
O HPV é uma infecção sexualmente transmissível amplamente disseminada, capaz de infectar epitélios escamosos da região genital, anal e orofaríngea. Estima-se que a maioria das pessoas sexualmente ativas será exposta ao vírus ao longo da vida, sendo que, na maior parte dos casos, a infecção é transitória e eliminada

espontaneamente pelo sistema imunológico (Quinlan, 2021). Contudo, a persistência da infecção por genótipos oncogênicos, especialmente no epitélio cervical, constitui o principal fator para o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas e, eventualmente, do câncer do colo do útero (Johnson et al., 2019).

O ciclo de vida do HPV está intimamente associado ao processo de diferenciação do epitélio escamoso. A infecção ocorre preferencialmente em células basais, acessadas por microlesões do epitélio, onde o genoma viral é mantido, inicialmente, de forma episomal. À medida que as células infectadas se diferenciam e migram para as camadas mais superficiais, ocorre a amplificação do genoma viral e a expressão regulada de proteínas virais, culminando na produção de novos vírions. Esse processo ocorre sem lise celular significativa, o que contribui para a ausência de inflamação local e dificulta o reconhecimento precoce pelo sistema imunológico (Jian, 2019; Kurmar et al., 2022).

A transformação maligna associada ao HPV está relacionada, principalmente, à expressão sustentada das oncoproteínas virais E6 e E7 (Figura 1), evento geralmente associado à integração do DNA viral ao genoma da célula hospedeira, sobretudo em estágios mais avançados da carcinogênese cervical (Grange et al., 2024). A oncoproteína E6 promove a degradação da proteína supressora tumoral p53, por meio de sua interação com a ubiquitina ligase E6AP, comprometendo mecanismos de reparo do DNA e apoptose celular (Zhuang et al., 2020). Além disso, a oncoproteína E7 interage com a proteína do retinoblastoma (pRB), levando à sua inativação funcional e à liberação de fatores de transcrição da família E2F, resultando em progressão descontrolada do ciclo celular (Zhao et al., 2020).

**Figura 1.** Esquema dos principais mecanismos moleculares da oncogênese cervical associada ao HPV, destacando a ação das oncoproteínas virais E6 e E7 na inativação de p53 e pRB, com consequente desregulação do ciclo celular e promoção da transformação neoplásica.



Fonte: Da Autora. Editado em BioRender (2025)

Esses eventos moleculares resultam na imortalização celular, instabilidade genômica e acúmulo progressivo de alterações genéticas, características centrais do processo de transformação neoplásica. Embora a integração do DNA viral seja um evento frequente em carcinomas invasivos, lesões precursoras podem se desenvolver mesmo na presença de genomas virais episomais, desde que haja expressão sustentada de E6 e E7, reforçando o papel funcional dessas oncoproteínas na oncogênese cervical (Grange et al., 2024).

Além de seu potencial transformador direto, o HPV apresenta estratégias que favorecem sua persistência no hospedeiro e contribuem para a progressão tumoral. A infecção viral não induz citólise nem resposta inflamatória robusta, o que reduz o recrutamento de células do sistema imune inato ao sítio de infecção (Mohammed et al., 2024). Ademais, as oncoproteínas E6 e E7 interferem em vias celulares críticas, modulando negativamente processos de vigilância celular e favorecendo um ambiente permissivo à transformação maligna (Peta et al., 2018).

Modificações epigenéticas também desempenham papel relevante nesse contexto. A infecção persistente pelo HPV está associada a alterações no padrão de

metilação do DNA, tanto do genoma viral quanto do genoma da célula hospedeira, além da superexpressão de reguladores epigenéticos, como o complexo EZH2. Essas alterações impactam a expressão gênica celular e contribuem para a manutenção do fenótipo tumoral e para a progressão das lesões cervicais (de Almeida et al., 2022).

Em geral, a etiologia viral do câncer do colo do útero envolve uma interação complexa entre persistência do HPV oncogênico, desregulação do ciclo celular mediada por E6 e E7, inativação funcional de proteínas supressoras tumorais como p53 e pRB, e alterações epigenéticas que sustentam a transformação maligna. Esses mecanismos estabelecem a base biológica para a progressão das lesões cervicais e criam as condições para a modulação subsequente da resposta imune, tema abordado no tópico seguinte.

### 2.3 RESPOSTA IMUNOLÓGICA NA INFECÇÃO PELO HPV E MECANISMOS DE EVASÃO

A resposta imunológica desempenha um papel central na determinação do desfecho das infecções virais, definindo se o patógeno será eliminado ou se estabelecerá uma infecção persistente. De modo geral, o reconhecimento inicial de componentes virais, denominados Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs), por Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRRs) expressos por células do hospedeiro desencadeia a ativação da imunidade inata e, subsequentemente, da imunidade adaptativa, quando a infecção não é inicialmente controlada (Ferreira et al., 2020). Essas vias de reconhecimento contribuem para a produção de citocinas pró-inflamatórias, especialmente interferons do tipo I (IFNs), e para a indução de genes estimulados por interferon (ISGs), que atuam restringindo a replicação e a disseminação viral (Lukhele et al., 2019).

No contexto das infecções epiteliais, como aquelas causadas pelo HPV, queratinócitos e células apresentadoras de antígenos residentes, incluindo células de Langerhans, desempenham papel fundamental como sentinelas imunológicas. O reconhecimento de PAMPs por PRRs, como receptores do tipo Toll (TLRs) e sensores citosólicos de DNA, ativa cascatas de sinalização intracelular que culminam na produção de IFNs do tipo I e outras citocinas pró-inflamatórias, promovendo a apresentação antigênica e a ativação de linfócitos T específicos (Sok

et al., 2018). Esses mecanismos são essenciais para conter a infecção viral inicial e estabelecer uma resposta imune eficaz.

Entretanto, a infecção pelo HPV apresenta características particulares que favorecem sua evasão do sistema imunológico. O ciclo replicativo do vírus é lento e estritamente dependente do processo de diferenciação do epitélio escamoso, com produção de partículas virais apenas nas camadas mais superficiais. Além disso, o HPV não induz lise celular significativa durante sua replicação, o que resulta em ausência de inflamação local evidente e dificulta o reconhecimento precoce da infecção pela imunidade inata (Yousefi et al., 2022). Essa estratégia permite que o vírus permaneça no tecido por longos períodos sem desencadear uma resposta imune robusta.

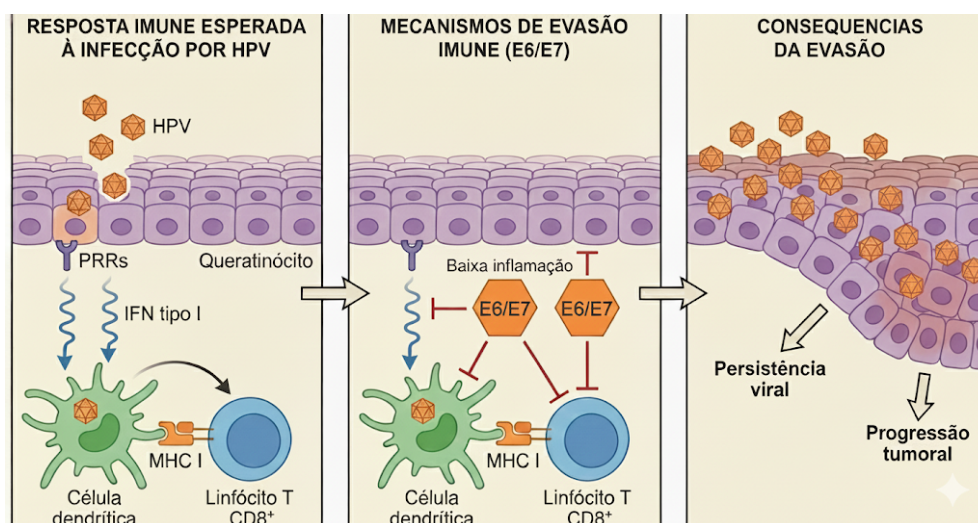
Ao longo de seu ciclo de vida, o HPV também interfere ativamente em vias imunológicas críticas. Estudos demonstram que o vírus é capaz de inibir a expressão de genes associados à produção de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, receptores do tipo Toll e moléculas do complexo principal de histocompatibilidade classe I (MHC-I), por meio da desregulação da metilação do DNA do hospedeiro e de modificações em histonas (Song et al., 2020). Essas alterações comprometem a apresentação de antígenos virais e reduzem a eficiência do recrutamento e ativação de células imunes efectoras.

As oncoproteínas virais E6 e E7 exercem papel central nesses mecanismos de evasão imune. Além de suas funções na desregulação do ciclo celular, essas proteínas interferem diretamente na imunidade inata ao modular vias antivirais intracelulares e o processamento de antígenos, dificultando o reconhecimento das células infectadas. Em particular, E6 e E7 atuam negativamente sobre a sinalização de interferons do tipo I, por meio da inibição de fatores de transcrição como IRF3 e NF- $\kappa$ B, reduzindo a indução de ISGs e favorecendo a persistência viral (Gardella et al., 2023; Lo Cigno et al., 2024). Concomitantemente, a interação dessas oncoproteínas com proteínas supressoras tumorais, como a proteína do retinoblastoma (pRB), contribui para alterações celulares que favorecem a progressão neoplásica no sítio de infecção.

Esse conjunto de estratégias imunomoduladoras está entre os principais determinantes da evolução da infecção pelo HPV para formas persistentes e lesões de alto grau. A supressão da imunidade inata compromete o recrutamento adequado de células apresentadoras de antígenos e prejudica o *priming* de linfócitos T

específicos, criando um ambiente permissivo para a expansão clonal de células infectadas e para o acúmulo de alterações genéticas (Figura 2) (Bussey & Brinkmann, 2018).

**Figura 2.** Resposta imunológica à infecção pelo papilomavírus humano (HPV) no epitélio cervical e dos principais mecanismos de evasão imune mediados pelas oncoproteínas virais E6 e E7, que favorecem a persistência viral e a progressão tumoral.



Fonte: Da Autora. Editado em BioRender (2025)

Dessa forma, a persistência do HPV oncogênico resulta não apenas de sua capacidade de infectar células epiteliais, mas também de uma interação complexa com o sistema imunológico do hospedeiro, marcada pela atenuação de sinais inflamatórios e pela falha na ativação efetiva da resposta adaptativa. Esses eventos constituem a base imunológica que sustenta a progressão das lesões cervicais e estabelecem o cenário para o desenvolvimento de um microambiente tumoral imunossupressor, aspecto aprofundado no tópico seguinte.

## 2.4 PROGRESSÃO HISTOPATOLÓGICA DO CÂNCER CERVICAL ASSOCIADA AO HPV

A infecção persistente pelo papilomavírus humano (HPV) está diretamente associada ao desenvolvimento de lesões intraepiteliais cervicais, consideradas

precursoras do câncer do colo do útero. Essas lesões, denominadas neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC), caracterizam-se por alterações proliferativas e maturacionais do epitélio escamoso cervical, com graus variáveis de atipia celular e comprometimento da espessura epitelial, representando estágios progressivos da carcinogênese cervical (Fonseca et al., 2022; INCA, 2023).

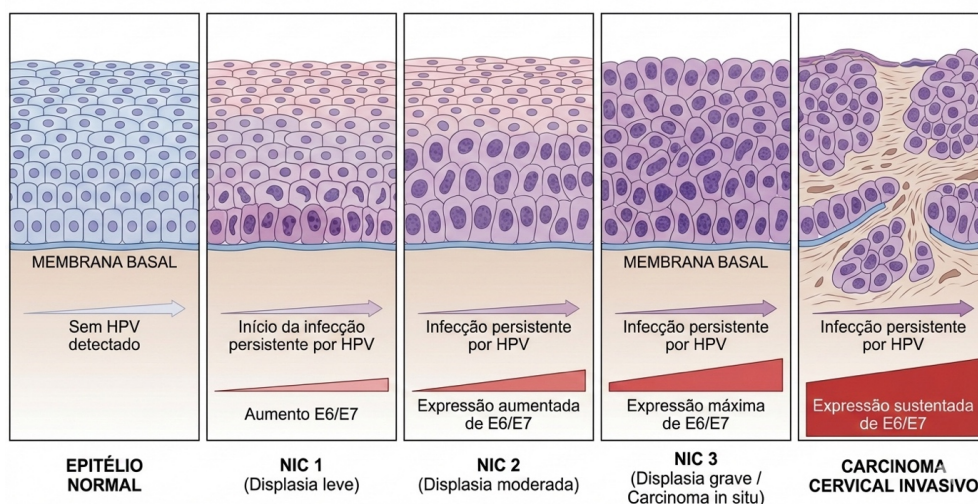
A NIC 1 corresponde à displasia leve, com alterações celulares restritas ao terço inferior do epitélio, geralmente associadas à infecção produtiva pelo HPV e elevada taxa de regressão espontânea. Nessa fase, observa-se relativa preservação da arquitetura tecidual e baixo risco de progressão para carcinoma invasivo, sobretudo quando há resposta imune eficaz do hospedeiro. Em contraste, a persistência viral, especialmente por genótipos oncogênicos de alto risco, aumenta a probabilidade de progressão para lesões de maior gravidade (Fonseca et al., 2022; Horst et al., 2024).

A NIC 2 representa um estágio intermediário da doença, com comprometimento de até dois terços da espessura epitelial, maior instabilidade celular e risco aumentado de progressão, especialmente em casos de infecção persistente. Já a NIC 3, também denominada carcinoma in situ, caracteriza-se por displasia grave envolvendo praticamente toda a espessura do epitélio, perda significativa da diferenciação celular e elevada atividade proliferativa, configurando o estágio imediatamente anterior ao carcinoma invasivo (Figura 3) (Fonseca et al., 2022; Thomsen & Kjær, 2021).



**Figura 3.** Evolução histopatológica do câncer cervical associada à infecção persistente pelo papilomavírus humano (HPV), ilustrando a progressão do epitélio cervical normal para lesões intraepiteliais cervicais de baixo e alto grau (NIC 1, NIC 2 e NIC 3) e, subsequentemente, para o carcinoma invasivo.

#### EVOLUÇÃO HISTOPATOLÓGICA DO CÂNCER CERVICAL ASSOCIADA AO HPV PERSISTENTE



Fonte: Da Autora. Editado em BioRender (2025)

Do ponto de vista molecular, a progressão das NICs está associada ao aumento sustentado da expressão das oncoproteínas virais E6 e E7, que promovem degradação de proteínas supressoras tumorais, como p53 e PRB, favorecendo instabilidade genômica e acúmulo de alterações celulares. Assim, a evolução histopatológica das NICs reflete a interação entre persistência viral, desregulação do ciclo celular e falha nos mecanismos de controle do hospedeiro, constituindo a base morfológica para o desenvolvimento do câncer cervical invasivo (Zhuang et al., 2020; Zhao et al., 2020).

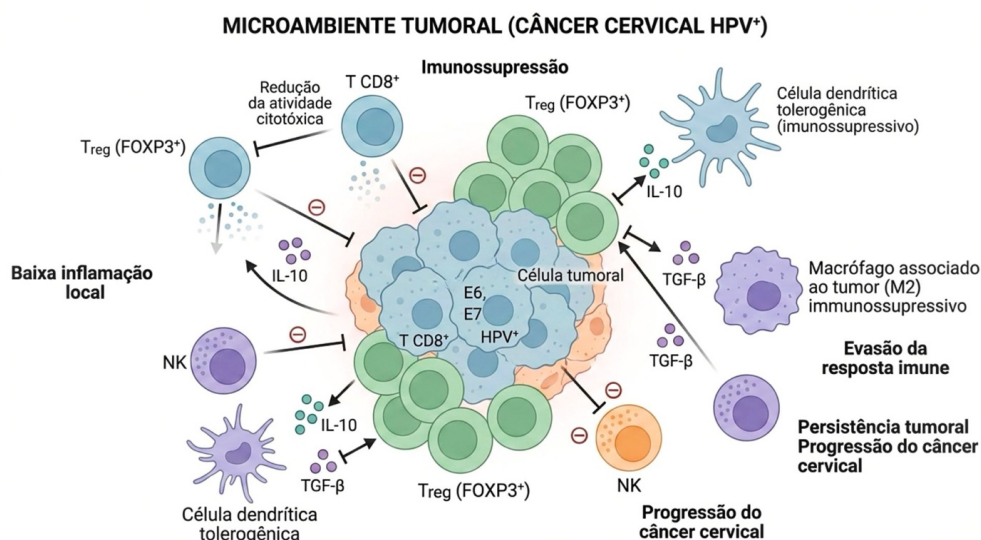
#### 2.5 IMUNOPATOLOGIA DO CÂNCER CERVICAL: MICROAMBIENTE TUMORAL E IMUNOSSUPRESSÃO

O microambiente tumoral (tumor microenvironment – TME) em neoplasias associadas ao HPV é caracterizado por uma complexa interação entre células tumorais, células do sistema imune e componentes do estroma, sendo determinante

para a progressão ou contenção do tumor. No câncer do colo do útero, esse ambiente frequentemente assume um perfil imunossupressor, no qual mecanismos de tolerância imunológica predominam sobre respostas efetoras antitumorais, favorecendo a persistência tumoral e a evasão da vigilância imunológica.

Entre as populações celulares mais relevantes nesse contexto destacam-se os linfócitos T  $CD8^+$ , responsáveis pela citotoxicidade direta contra células tumorais, e os linfócitos T reguladores (Tregs)  $FOXP3^+$ , que exercem papel central na modulação negativa da resposta imune. Evidências indicam que um aumento na densidade de linfócitos T  $CD8^+$  infiltrantes está associado a melhor prognóstico clínico, enquanto a elevada presença de células  $FOXP3^+$  no microambiente tumoral correlaciona-se com supressão da resposta imune antitumoral e progressão da doença (Figura 4) (Chen et al., 2019; Tawfeik et al., 2020).

**Figura 4.** Representação do microambiente tumoral imunossupressor no câncer cervical associado ao papilomavírus humano (HPV), evidenciando a interação entre células tumorais e populações imunes regulatórias e a inibição funcional de células efetoras, favorecendo a evasão da resposta imune, a persistência tumoral e a progressão da doença.



Fonte: Da Autora. Editado em BioRender (2025)

No câncer cervical HPV-induzido, estudos demonstram que o TME tende a apresentar uma razão reduzida entre linfócitos T  $CD8^+$  efetores e Tregs  $FOXP3^+$ ,

configurando um ambiente tolerogênico. A alta densidade de células FOXP3<sup>+</sup> em lesões intraepiteliais de alto grau e em tumores invasivos está fortemente associada à presença persistente do HPV e à progressão tumoral, sugerindo que essas células desempenham papel ativo na manutenção da imunossupressão local (Mitilđžans et al., 2019). A razão CD8<sup>+</sup>/FOXP3<sup>+</sup> tem sido, inclusive, proposta como potencial biomarcador prognóstico e indicador de resposta à imunoterapia (Han et al., 2021).

As citocinas produzidas no microambiente tumoral exercem influência decisiva sobre o equilíbrio entre imunidade efetora e tolerância. Em modelos experimentais de câncer cervical, perfis inflamatórios associados a respostas do tipo Th1, caracterizados por aumento de IL-2, IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , têm sido relacionados à ativação de linfócitos T citotóxicos e ao controle tumoral. Em contraste, citocinas como IL-6, IL-10 e TGF- $\beta$  estão associadas à expansão de Tregs, inibição da atividade de células NK e linfócitos CD8<sup>+</sup>, e manutenção de um ambiente imunossupressor (Che et al., 2020; Trujillo-Cirilo et al., 2023).

Dentre essas moléculas, o IFN- $\gamma$  destaca-se por sua dupla função no TME, promovendo tanto a ativação de células T citotóxicas quanto o aumento da expressão de moléculas do MHC, facilitando o reconhecimento tumoral. Por outro lado, citocinas imunossupressoras, como IL-10 e TGF- $\beta$ , atuam inibindo a função citotóxica de células NK e linfócitos T CD8<sup>+</sup>, além de favorecerem a diferenciação e expansão de Tregs FOXP3<sup>+</sup> (Wu et al., 2018). A interleucina 32 (IL-32) apresenta papel ambíguo nesse cenário, podendo induzir a expressão de FOXP3 e, simultaneamente, estimular a produção de IFN- $\gamma$  por células CD8<sup>+</sup>, refletindo a complexidade funcional do microambiente tumoral (Han et al., 2021).

Evidências recentes apontam que as células T reguladoras no TME não constituem uma população funcionalmente estática. Esses linfócitos apresentam considerável plasticidade, podendo ser reprogramados para fenótipos efetores do tipo Th1 sob determinadas condições, como a ativação de vias mediadas por CD40 e IL-12/IFN- $\gamma$ . Estratégias imunoterapêuticas que exploram essa plasticidade, incluindo o uso de anticorpos agonistas de CD40, têm demonstrado potencial para converter células imunossupressoras em efetoras antitumorais, ampliando o controle da doença (Maltez et al., 2023).

Além das alterações locais, manifestações sistêmicas da imunossupressão tumoral podem ser observadas por meio de parâmetros hematológicos periféricos. A redução de linfócitos circulantes ou o aumento da razão neutrófilo/linfócito (NLR) têm

sido associados a pior prognóstico em diversos tipos de câncer, incluindo o câncer cervical, refletindo o impacto sistêmico do tumor sobre a resposta imune do hospedeiro (Che et al., 2020). Dessa forma, a avaliação integrada de parâmetros imunológicos locais e sistêmicos é essencial para compreender a dinâmica da resposta imune frente ao desenvolvimento tumoral.

Em conjunto, a imunopatologia do câncer cervical envolve a interação entre células tumorais HPV-induzidas, populações imunossupressoras, citocinas regulatórias e alterações sistêmicas da imunidade. A caracterização detalhada desses componentes é fundamental para compreender os mecanismos de progressão tumoral e fornece a base conceitual para a utilização de modelos experimentais imunocompetentes, como a linhagem C3, no estudo da resposta imune antitumoral e na avaliação pré-clínica de estratégias imunoterapêuticas.

## 2.6 LINHAGEM TUMORAL C3: HISTÓRICO E PRINCIPAIS APLICAÇÕES

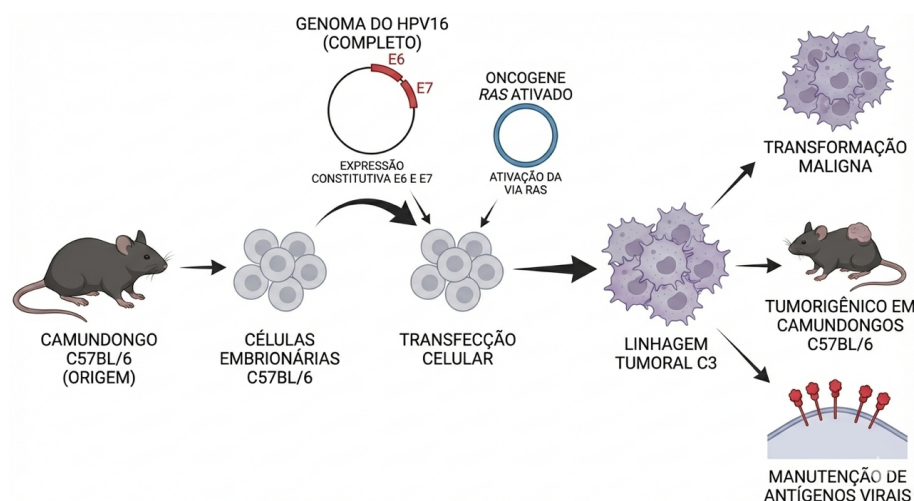
A utilização de linhagens tumorais bem caracterizadas é essencial para a investigação dos mecanismos envolvidos na carcinogênese e na resposta a estratégias terapêuticas em modelos experimentais. No contexto do câncer do colo do útero associado ao HPV, a linhagem tumoral C3 destaca-se como um modelo relevante por permitir o estudo integrado da biologia tumoral, da expressão de antígenos virais e da interação com o sistema imune do hospedeiro em um ambiente imunocompetente (Feltkamp et al., 1993; Karimi et al., 2019).

A linhagem C3 foi desenvolvida em 1993 por um grupo de pesquisa da Escola de Medicina de Leiden, na Holanda, a partir de células embrionárias de camundongos da linhagem C57BL/6 (Feltkamp et al., 1993). Essas células foram transfectadas com um plasmídeo contendo o genoma completo do HPV16, incluindo genes precoces (Early – E) e tardios (Late – L), sob controle de seu promotor homólogo, e co-transfectadas com o oncogene ras ativado. Essa estratégia experimental teve como objetivo mimetizar os padrões de expressão dos oncogenes virais observados durante a infecção natural em humanos (Kayyal et al., 2012; Paolini et al., 2021).

Uma característica central da linhagem C3 é a expressão constitutiva das oncoproteínas E6 e E7 do HPV16, associada à ativação da via Ras, o que confere elevado potencial tumorigênico e crescimento tumoral consistente após inoculação

em camundongos imunocompetentes da linhagem C57BL/6 (Figura 5) (Karimi et al., 2019). Essa combinação permite que o modelo reproduza não apenas alterações genéticas fundamentais do câncer cervical humano, mas também aspectos relevantes da interação entre tumor e sistema imune do hospedeiro.

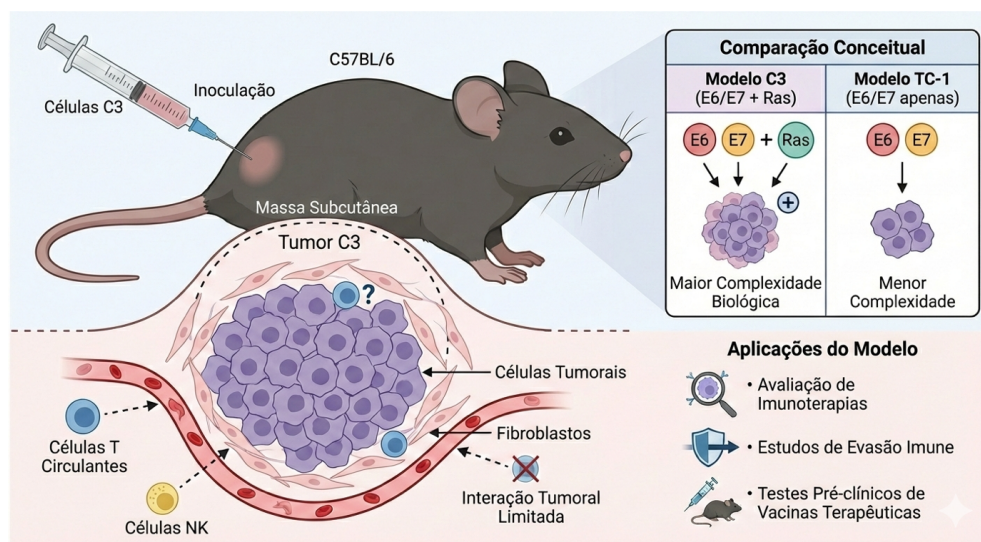
**Figura 5.** Esquema ilustrativo da origem e caracterização da linhagem tumoral C3, derivada de células embrionárias de camundongos C57BL/6 transfectadas com o genoma completo do HPV16 e um oncogene *ras* ativado, resultando em transformação maligna e capacidade tumorigênica em camundongos imunocompetentes.



Fonte: Da Autora. Editado em BioRender (2026)

Quando comparada a outros modelos murinos de câncer cervical, como a linhagem TC-1, que expressa predominantemente as oncoproteínas E6 e E7, a linhagem C3 apresenta maior complexidade biológica por incorporar simultaneamente a ativação de vias oncogênicas celulares, como a Ras. Essa característica confere ao modelo maior fidelidade na reprodução do microambiente tumoral e da resposta imune observada em neoplasias cervicais associadas ao HPV (Figura 6) (Karimi et al., 2019; Paolini et al., 2021).

**Figura 6.** Representação esquemática do modelo tumoral C3 em camundongos C57BL/6, destacando a inoculação subcutânea das células, a formação da massa tumoral e a interação com o sistema imune, além da comparação conceitual entre os modelos C3 e TC-1 e suas aplicações em estudos pré-clínicos de imunoterapia e evasão imune.



Fonte: Da Autora. Editado em BioRender (2026)

Diversos estudos têm empregado a linhagem C3 para a avaliação de estratégias terapêuticas e imunomoduladoras. Em estudo clássico, Loddenkemper et al. (2009) realizaram a inoculação subcutânea de células C3 em camundongos C57BL/6 e demonstraram que o tratamento com o anticorpo agonista DTA-1 promoveu regressão tumoral associada à modulação do microambiente tumoral. Nesse modelo, tumores não tratados apresentaram baixa infiltração de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e alta densidade de células FOXP3<sup>+</sup>, evidenciando um perfil imunossupressor local.

Mais recentemente, abordagens baseadas em vacinas terapêuticas multiepitópicas contendo antígenos virais, como E6, E7 e E5, demonstraram potencial para induzir respostas imunes antitumorais em modelos murinos de câncer cervical, incluindo aumento da infiltração de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e maior produção de IFN- $\gamma$  (Qi et al., 2022). Entretanto, a maioria desses estudos concentra-se em modelos alternativos, como o TC-1, o que reforça a necessidade de maior exploração do perfil imunológico do modelo C3 in vivo (Haabeth et al., 2022).

Nesse contexto, a linhagem C3 destaca-se como um modelo particularmente promissor para investigações que visam compreender os mecanismos de evasão imune, a dinâmica do microambiente tumoral e a resposta a intervenções imunoterapêuticas em um sistema imunocompetente. Sua utilização permite a análise integrada de parâmetros imunológicos locais e sistêmicos, contribuindo para a validação pré-clínica de estratégias terapêuticas direcionadas ao câncer cervical associado ao HPV (Karimi et al., 2019; Haabeth et al., 2022).

Em síntese, a linhagem tumoral C3 constitui uma ferramenta experimental robusta para o estudo da carcinogênese cervical induzida por HPV, combinando expressão viral relevante, ativação de vias oncogênicas celulares e interação funcional com o sistema imune do hospedeiro. Essas características fundamentam sua ampla aplicabilidade em estudos pré-clínicos e justificam a necessidade de sua caracterização imunológica detalhada, abordada no tópico seguinte (Feltkamp et al., 1993; Karimi et al., 2019).

## 2.7 IMPORTÂNCIA DA CARACTERIZAÇÃO IMUNOLÓGICA DO MODELO C3

A caracterização imunológica de modelos experimentais tumorais é fundamental para a compreensão dos mecanismos que regulam a progressão do câncer e a resposta a intervenções terapêuticas. Em neoplasias associadas ao HPV, essa caracterização torna-se particularmente relevante devido à forte influência do sistema imune na persistência viral, na evasão imunológica e na modulação do microambiente tumoral. Nesse contexto, a linhagem tumoral C3 representa um modelo experimental de grande interesse, embora ainda pouco explorado sob a perspectiva imunológica *in vivo* (Heeren et al., 2019).

Apesar de sua utilização em estudos voltados ao crescimento tumoral e à avaliação de abordagens terapêuticas, são escassos os trabalhos que descrevem de forma sistemática o perfil imunológico do microambiente tumoral gerado pela linhagem C3. A ausência de informações detalhadas sobre a composição e o estado funcional das células imunes presentes no tumor limita a interpretação dos resultados experimentais e restringe o potencial translacional do modelo para estudos em imunoterapia (Heeren et al., 2019).

A caracterização fenotípica e funcional de subpopulações imunes, como linfócitos T CD8<sup>+</sup>, linfócitos T reguladores FOXP3<sup>+</sup>, células NK e células

apresentadoras de antígenos, é essencial para compreender os mecanismos de controle ou falha da resposta antitumoral. Além disso, a análise da expressão de citocinas e mediadores inflamatórios associados à ativação ou supressão imune fornece informações cruciais sobre o equilíbrio imunológico estabelecido no microambiente tumoral (Heeren et al., 2019).

Estudos recentes têm evidenciado que determinadas subpopulações celulares apresentam perfis funcionais complexos no contexto tumoral. Por exemplo, linfócitos CD8<sup>+</sup> que expressam marcadores tradicionalmente associados à regulação, como FOXP3 e CD25, podem manter capacidade citotóxica e secretar granzimas e citocinas, desafiando classificações fenotípicas simplificadas. Esses achados reforçam a necessidade de avaliações funcionais complementares às análises fenotípicas convencionais (Heeren et al., 2019).

O mapeamento de biomarcadores imunológicos em tumores HPV-induzidos tem possibilitado a identificação de novos alvos terapêuticos. Moléculas como HMGB1 e LIF foram descritas como indutoras de tolerância imunológica, atuando por meio da repressão de vias associadas à produção de interferons do tipo I e de quimiocinas como CXCL9, favorecendo a evasão imune e a resistência a terapias baseadas em bloqueio de checkpoints imunológicos (Bonfill-Teixidor et al., 2024; Morale et al., 2018).

Além disso, citocinas inflamatórias e quimiocinas como CXCL10, CXCL8 e IL1R2 têm sido associadas à agressividade tumoral e à resposta terapêutica, especialmente quando relacionadas à ativação de vias como JAK-STAT e à expressão de PD-L1. A superexpressão dessas moléculas contribui para um microambiente tumoral refratário à ação citotóxica de linfócitos T, reforçando a importância de sua avaliação em modelos experimentais (Zhao et al., 2024; Chen et al., 2021).

Do ponto de vista metodológico, a caracterização imunológica do modelo C3 deve contemplar abordagens integradas, incluindo fenotipagem por citometria de fluxo, análise histológica do infiltrado tumoral, avaliação de parâmetros hematológicos periféricos e investigação de mediadores inflamatórios sistêmicos e locais. A combinação dessas estratégias permite uma compreensão mais abrangente da resposta imune do hospedeiro e do impacto sistêmico do desenvolvimento tumoral (Ndiaye et al., 2023).



De modo geral, a caracterização imunológica detalhada da linhagem tumoral C3 é essencial para validar sua aplicabilidade como modelo pré-clínico de câncer cervical associado ao HPV. Ao permitir a identificação de mecanismos de evasão imune, biomarcadores prognósticos e potenciais alvos terapêuticos, essa abordagem fortalece o valor translacional do modelo e sustenta sua utilização em estudos de imunologia tumoral e avaliação de estratégias imunoterapêuticas inovadoras (Heeren et al., 2019; Bonfill-Teixidor et al., 2024).

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 POPULAÇÃO AMOSTRAL E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Foram utilizados para o estudo, 18 (dezoito) camundongos fêmeas C57BL/6 (6-8 semanas de idade), criados e mantidos nas instalações de animais do Instituto de Imunopatologia Keizo Asami - iLIKA, localizado na Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. Os animais foram mantidos em condições laboratoriais padrão (20-22 °C e 12 horas ciclo diurno e noturno) com acesso gratuito a uma dieta padrão (Labina / Purina, Campinas, Brasil) e água. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco com o número de protocolo: 0068/2022.

Dos 18 animais separados para a pesquisa, 16 foram utilizados para a inoculação da C3 via subcutânea da seguinte forma: 8 animais separados para o Grupo A (com crescimento tumoral de 14 dias) e 8 animais para o Grupo B (com crescimento tumoral de 20 dias), e com os 2 animais restantes foi feito um Grupo CTR (Controle Negativo) sem a inoculação da C3.

#### 3.2 INOCULAÇÃO DAS CÉLULAS C3

Os animais (Grupos A, B e CTR) foram anestesiados com 10 mg/Kg de xilazina e 115 mg/Kg de quetamina. Posteriormente, foi realizada a tricotomia na região cervical, para a inoculação subcutânea (apenas nos animais dos Grupos teste A e B) de 50 µl contendo  $1 \times 10^6$  de células da C3 em suspensão, por animal.

Após a observação do edema sub-dérmico formado imediatamente após a inoculação, os animais foram devolvidos às suas gaiolas, separadas de acordo com os grupos determinados previamente. Após isso, cada animal foi submetido a uma anamnese diária incluindo pesagem da ração, para avaliação da alimentação, pesagem corporal dos animais, avaliação comportamental e medição dos tumores com paquímetro.

#### 3.3 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Para a coleta das amostras biológicas, os camundongos foram novamente anestesiados com 10 mg/Kg de xilazina e 115 mg/Kg de quetamina, e posteriormente foi realizada a perfusão cardíaca. Com as amostras de sangue armazenadas em microtubos com EDTA, uma alíquota foi separada para avaliação hematológica e outra para a fenotipagem celular com células mononucleares do sangue periférico (PBMC). Uma pequena alíquota do sangue também foi separada para distensão sanguínea em lâmina para avaliação morfológica e contagem diferencial dos leucócitos. Após isso, foi realizado o deslocamento cervical e remoção asséptica de alguns órgãos para avaliação histopatológica como: coração, baço, fígado, intestino e rins.

Também foram removidos os tumores e tecidos periféricos para avaliação histopatológica. Os órgãos coletados de cada camundongo foram armazenados em tubo Falcon contendo RPMI 1640 com soro fetal bovino para transporte.

### 3.4 ANÁLISE HEMATOLÓGICA

A partir das amostras coletadas em tubos EDTA, foram realizados estiraços sanguíneos de cada animal, para contagem diferencial dos leucócitos no intuito de validar a contagem automatizada a partir de amostra do sangue total utilizando microscópio óptico. Posteriormente, todas as amostras foram adquiridas e analisadas pelo equipamento ABX penta 60 HORIBA® para a liberação do hemograma.

### 3.5 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Após a coleta os órgãos foram armazenados em tubo Falcon contendo RPMI 1640 com soro fetal bovino, para transporte das amostras e posteriormente armazenados em álcool 70%. Para fixação, foram colocados em formalina 10%, em seguida foram feitos os cortes seccionais (cortes longitudinal e transversal) e colocados nos cassetes com as devidas identificações. Após isso, foi iniciada a etapa de desidratação (1h em álcool 80%, 1h em álcool 90%, 1h em 3 álcoois 100%); em seguida, colocados em álcool-xilol, por 1h (álcool 100% na mesma proporção de xilol).

Posteriormente foi feita a clarificação com o xilol: Xilol 1, por 1 hora; Xilol 2, por 1 hora. Após a clarificação seguiu para a impregnação com as parafinas: Parafina 1, por 1 hora; Parafina 2, por 1 hora; Parafina 3, em torno de 45 minutos. Após isso, o órgão ficou pronto para ser emblocado na Parafina histológica. Com a peça emblocada, o órgão foi cortado com o micrótomo, entre 3 a 5 micras. Por fim, foi feita a coloração em HE para avaliação microscópica dos tecidos.

### 3.6 ENSAIO DE IMUNOFENOTIPAGEM

O isolamento das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foi realizado por centrifugação das amostras (2.000 rpm, 30 min) sob gradiente de separação Ficoll (1,077 g/mL; GE Healthcare Life Sciences®), as células foram lavadas duas vezes com PBS (1600 rpm, 10 min) e posteriormente corado com anticorpos específicos. A marcação foi feita usando o painel com CD3 (FITC), CD4 (PE), CD8 (PE), CD45 (APC), CD16/32 (FITC), CD19 (PE), CD40 (APC), Anti Granzima (PECy 5.5) e Perforina (PE) (todos da BD Biosciences® e separados por tubos estratégicos para a aquisição dos dados). A aquisição das células foi realizada em 10.000 eventos em citômetro de fluxo (plataforma Accuri BD®), com análise dos dados de fluorescência através do software BD Accuri v.2.5.1®.

### 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística deste estudo foi realizada utilizando testes apropriados para cada tipo de experimento. Os dados de peso corporal, consumo alimentar, parâmetros hematológicos, níveis de citocinas e dados de imunofenotipagem foram analisados por ANOVA, a fim de identificar diferenças significativas entre os grupos. Após a confirmação dos pressupostos de normalidade e homogeneidade das variâncias, utilizando os testes de Shapiro-Wilk e Brown-Forsythe, as comparações entre grupos foram realizadas por meio do teste de Tukey, com valores de p ajustados para múltiplas comparações.

Os dados histopatológicos foram analisados utilizando o teste t de Student não pareado ou o teste de Mann-Whitney, dependendo da distribuição dos dados. Todos os gráficos foram gerados utilizando o software GraphPad Prism versão 10.0

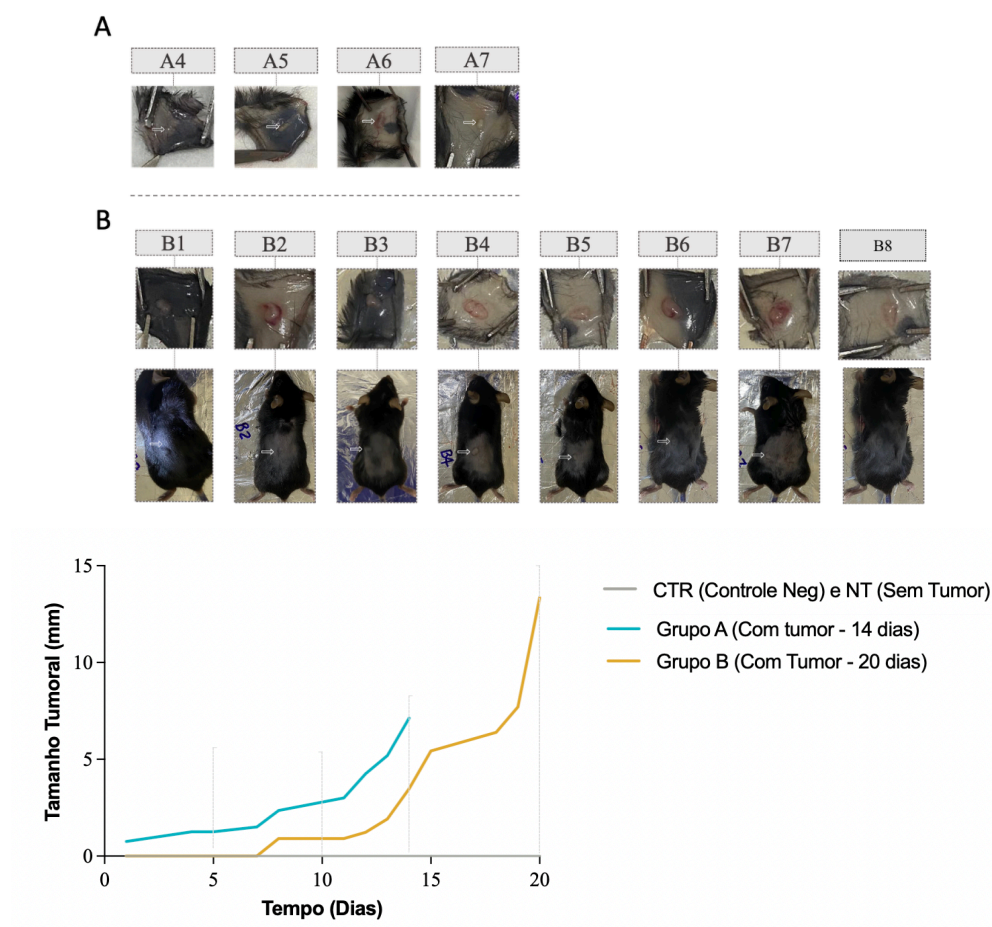
(GraphPad Software, Inc., EUA), e a significância estatística estabelecida em  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 CRESCIMENTO TUMORAL SOBRE O PESO CORPORAL E O CONSUMO ALIMENTAR DOS ANIMAIS

O crescimento tumoral (Figura 7) apresentou progressão significativa nos dois grupos, apresentando a ausência de crescimento do tumor apenas em 4 animais do Grupo A. Esses animais foram separados e definidos como Grupo NT (Sem Tumor). O crescimento tumoral no Grupo B apresentou maiores dimensões tumorais ao final do estudo.

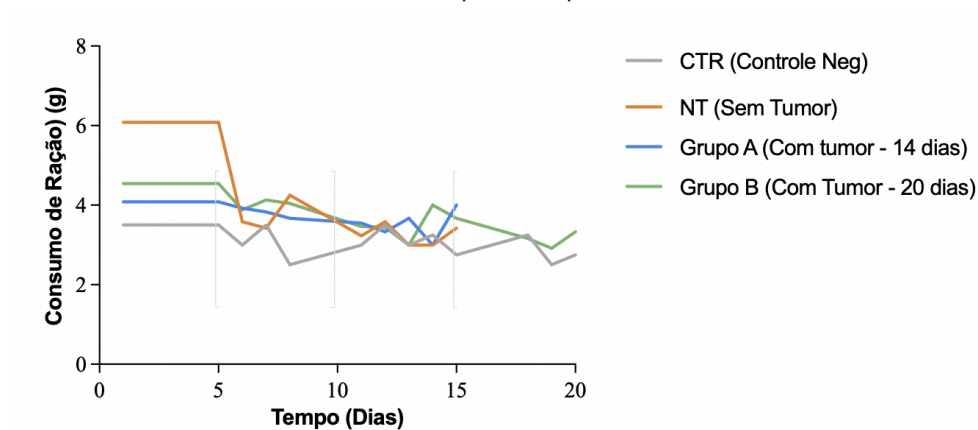
**Figura 7.** Fotografia dos tumores e regiões periféricas ao tecido nos Grupos A e B. Abaixo, gráfico representando o padrão de crescimento tumoral ao longo do tempo nos grupos portadores de tumor (Grupo A e Grupo B) e nos grupos controle (CTR e NT).



Fonte: Da autora (2025)

O consumo alimentar (Figura 8) variou entre os grupos experimentais. Inicialmente, o grupo NT apresentou maior ingestão de alimento; contudo, ao longo do tempo, esse consumo diminuiu, aproximando-se dos valores observados nos grupos portadores de tumor. O Grupo B, que apresentou os maiores tumores, manteve consumo alimentar ligeiramente superior ao do Grupo A em determinados períodos, enquanto o grupo CTR apresentou, de forma consistente, o menor consumo alimentar durante todo o experimento.

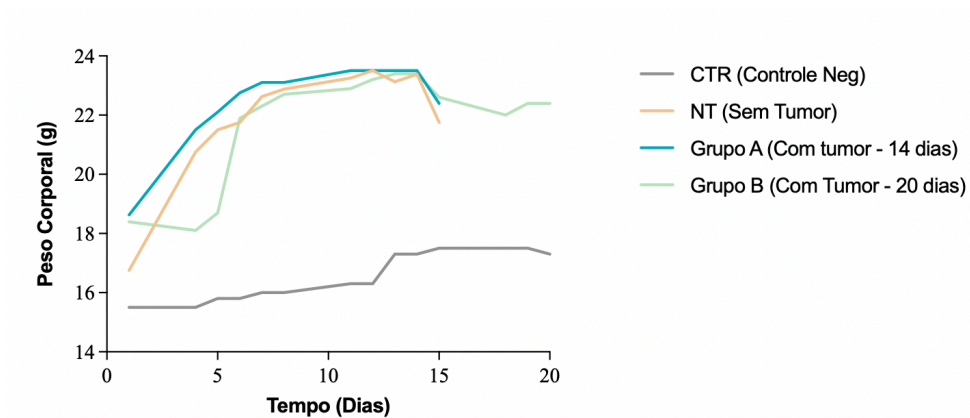
**Figura 8.** Consumo alimentar médio dos animais ao longo do tempo nos grupos experimentais CTR, NT, Grupo A e Grupo B.



Fonte: Da autora (2025)

O peso corporal foi monitorado ao longo do tempo (Figura 9). Os grupos portadores de tumor (Grupo A e Grupo B) apresentaram aumento inicial do peso corporal, semelhante ao observado no grupo NT (sem tumor), atingindo um platô por volta do 15º dia. No entanto, no Grupo B, que apresentou maior crescimento tumoral, o peso corporal passou a diminuir após esse período. Em contraste, o grupo controle negativo (CTR) apresentou ganho de peso limitado ao longo de todo o experimento.

**Figura 9.** Peso corporal dos animais ao longo do tempo nos grupos experimentais CTR, NT, Grupo A e Grupo B.



Fonte: Da autora (2025)

#### 4.2 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E ANÁLISE DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS

Os parâmetros hematológicos dos grupos experimentais foram avaliados e estão apresentados na Tabela 1. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos quanto aos níveis de hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), nem quanto às proporções de linfócitos, monócitos e granulócitos ( $p > 0,05$ ).

A análise diferencial de leucócitos (Figura 10) revelou variações específicas entre os grupos. A proporção de linfócitos foi significativamente maior no Grupo B em comparação ao grupo CTR ( $p = 0,0159$ ) (Figura 10B). Em contraste, a proporção de neutrófilos foi significativamente menor no Grupo B em relação ao grupo NT ( $p = 0,0286$ ) (Figura 10C). As proporções de monócitos (Figura 10D), eosinófilos (Figura 10E) e basófilos (Figura 10F) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ( $p > 0,05$ ).



**Tabela 1.** Parâmetros hematológicos dos Grupos A, B, CTR e NT.

Parâmetros Hematológicos	CTR	NT	Grupo A	Grupo B	Valor de p
Hemoglobina (g/dL)	2.7 ± 2.6	11.2 ± 1.9	11 ± 2.4	7.9 ± 4.7	0.1331
Hematócrito (%)	7.4 ± 7.7	33.7 ± 6.8	32.8 ± 8.0	23.6 ± 14.7	0.1139
VCM (fl)	43.5 ± 0.7	44.3 ± 1.1	44 ± 0.8	43.4 ± 2.0	0.7961
HCM (pg)	7.85 ± 11.1	14.8 ± 0.11	14.78 ± 0.12	12.02 ± 6.7	0.8410
Linfócitos (%)	90.05 ± 0.77	77.40 ± 9.05	80.8 ± 7.5	84.78 ± 4.05	0.3628
Monócitos (%)	1.1 ± 0.4	1.03 ± 1.01	1.8 ± 1.2	1.4 ± 0.60	0.7670
Granulócitos (%)	8.86 ± 0.35	21.5 ± 9.9	17.3 ± 6.6	13.7 ± 4.1	0.2186

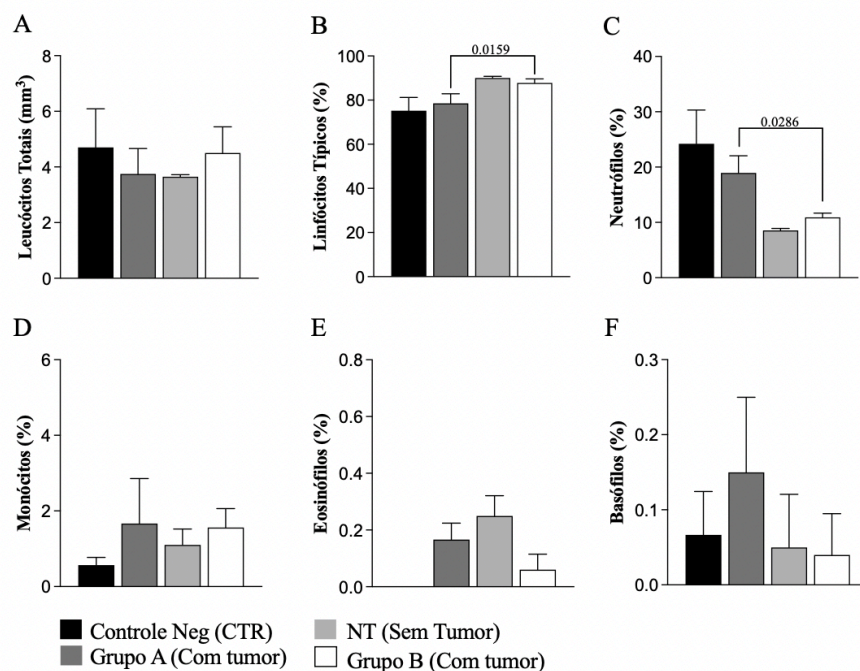
CTR: Controle negativo

NT: Sem tumor

VCM: Volume Corpuscular Médio

HCM: Hemoglobina Corpuscular Média

**Figura 10.** Comparação dos parâmetros hematológicos entre grupos com e sem tumor. Foram avaliados a contagem total de leucócitos (A) e o percentual de linfócitos (B), neutrófilos (C), monócitos (D), eosinófilos (E) e basófilos (F) nos grupos CTR e NT (sem tumor) e GA e GB (com tumor). Diferenças significativas foram observadas para linfócitos (B,  $p = 0,0159$ ) e neutrófilos (C,  $p = 0,0286$ ), sem alterações nos demais parâmetros.

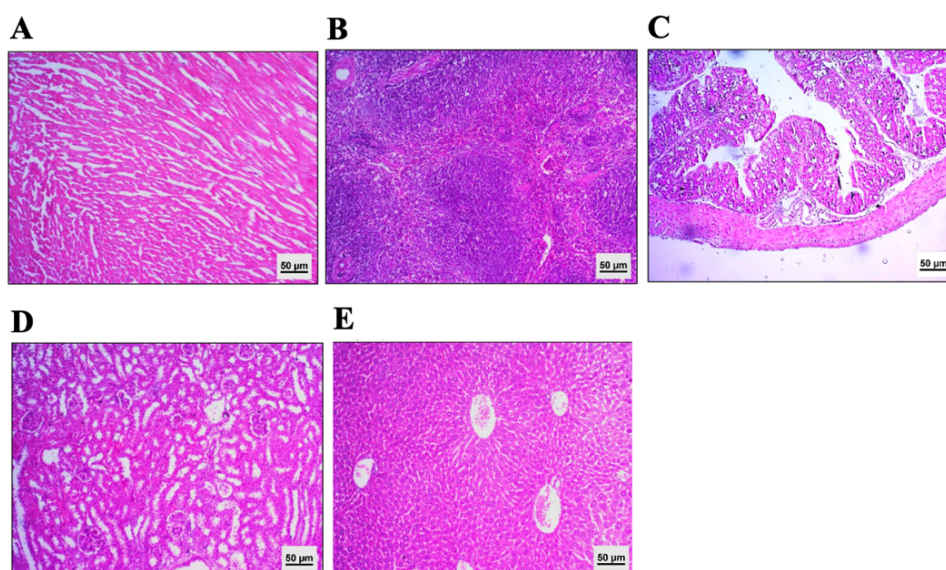


Fonte: Da autora (2025)

#### 4.3. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DE ÓRGÃOS E TUMORES

A análise histopatológica dos órgãos coletados dos grupos teste e controle negativo não evidenciou alterações morfológicas significativas em nenhum dos tecidos avaliados. O coração (Figura 11A) apresentou endocárdio e miocárdio preservados, com fibras musculares cardíacas de aspecto típico e ausência de infiltrado inflamatório em todos os grupos experimentais. O baço (Figura 11B) mostrou tecido estruturalmente íntegro, sem alterações histomorfológicas, com cápsula preservada, polpa branca bem definida, com folículos linfóides evidentes, e polpa vermelha preservada, sem sinais de congestão, mantendo reatividade típica e presença de macrófagos. No intestino (Figura 11C), observou-se preservação das camadas da mucosa, submucosa, muscular e serosa, sem alterações estruturais relevantes. A avaliação histológica do rim (Figura 11D) revelou integridade dos compartimentos glomerular, tubular, vascular e intersticial, sem alterações no espaço de Bowman ou presença de infiltrados inflamatórios. De forma semelhante, o fígado (Figura 11E) apresentou arquitetura histológica típica do tecido hepático, sem evidências de esteatose ou infiltrado inflamatório em todos os grupos analisados.

**Figura 11.** Análise histopatológica dos órgãos dos grupos teste e controle negativo, incluindo coração (A), baço (B), intestino (C), rim (D) e fígado (E), evidenciando preservação estrutural e ausência de alterações histomorfológicas ou infiltrados inflamatórios em todos os grupos. Ampliação microscópica: 100×.

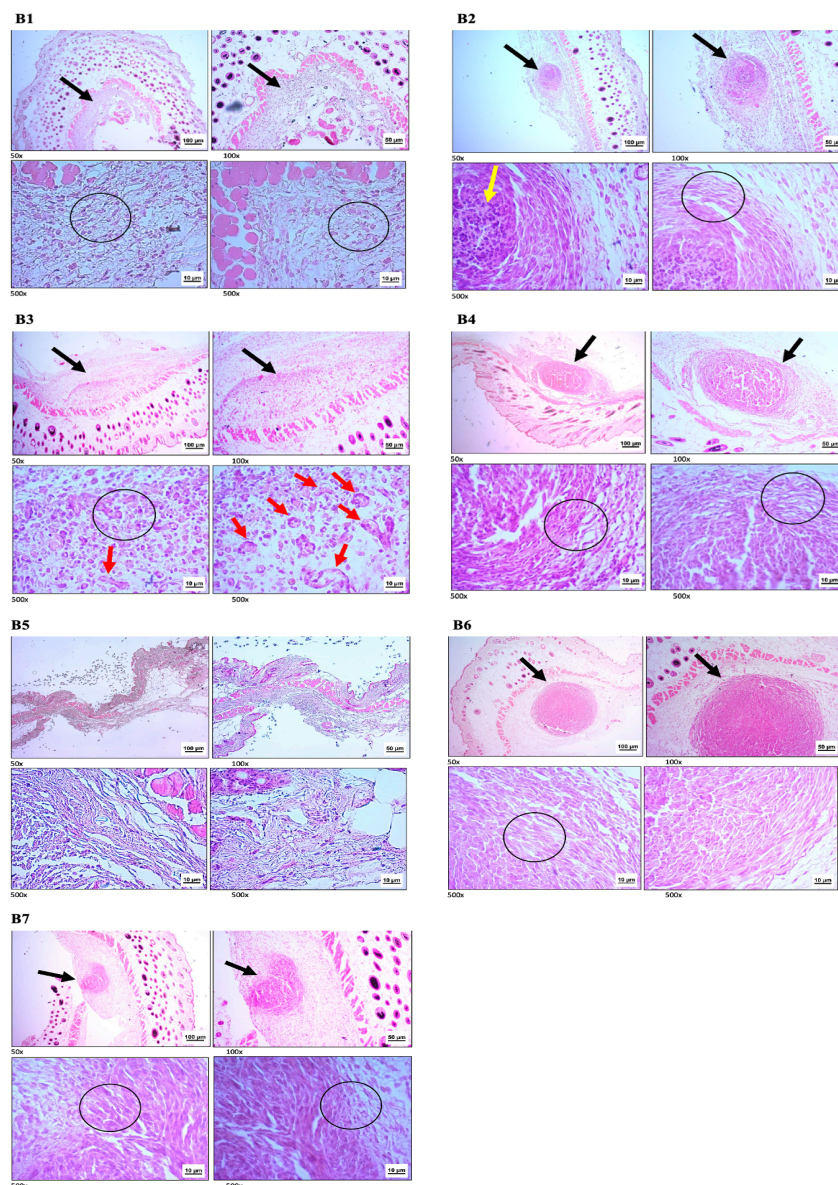


Fonte: Da Autora (2025).

A análise histopatológica das massas tumorais coletadas dos animais revelou padrões heterogêneos de organização celular, necrose e resposta inflamatória. Em cinco amostras (B1, B2, B4, B6 e B7), as áreas tumorais apresentaram-se predominantemente restritas, com células neoplásicas organizadas de forma concêntrica ou difusa, acompanhadas por edema e presença variável de fibroblastos.

As regiões centrais exibiram detritos necróticos, com ausência de infiltrado inflamatório em algumas amostras (B1, B2 e B6) e presença de linfócitos raros em outras (B3, B4 e B7). Na amostra B3, além dessas características, foi identificada maior presença de capilares, sugerindo possível vascularização tumoral. Na amostra B5, não foram observadas células neoplásicas, indicando regressão tumoral ou ausência de tumor no tecido analisado (Figura 12).

**Figura 12.** Avaliação histopatológica das massas tumorais. As amostras B1, B2, B4, B6 e B7 apresentaram áreas tumorais restritas, com células neoplásicas organizadas de forma concêntrica ou difusa, associadas a edema e detritos necróticos, com infiltrado inflamatório ausente ou discreto. A amostra B3 exibiu área tumoral difusa com aumento de capilares, sugerindo vascularização tumoral. Na amostra B5, não foram observadas células neoplásicas. Ampliação microscópica: 500x.



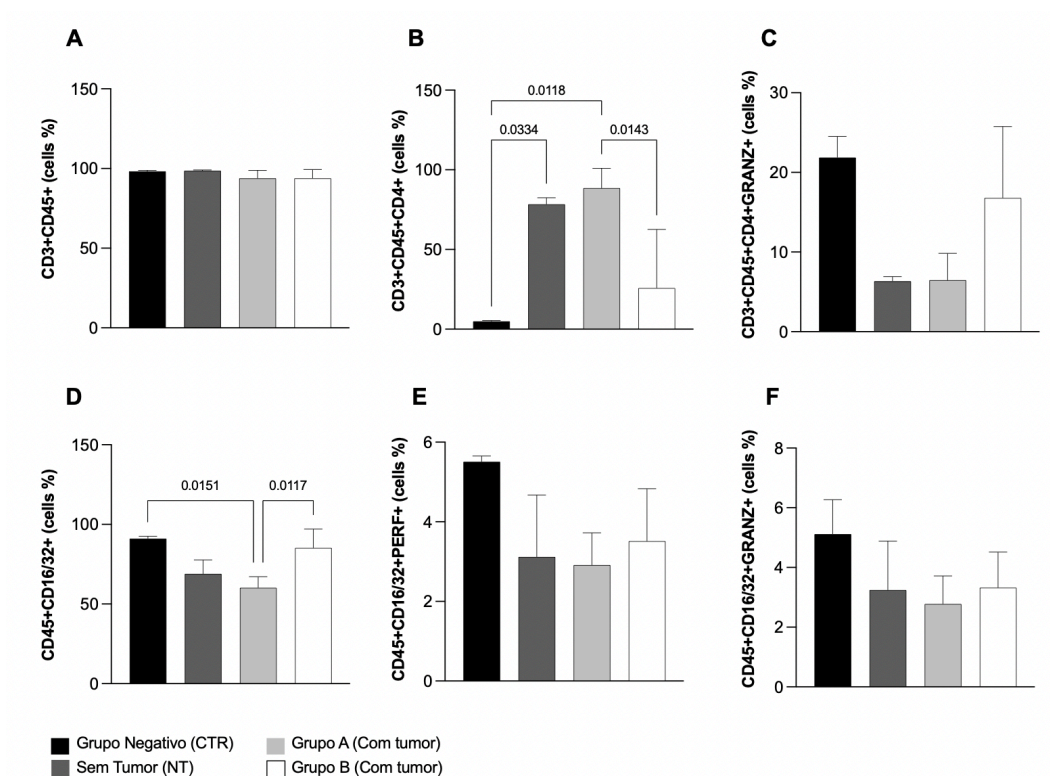
Fonte: Da autora (2025)

#### 4.4 IMUNOFENOTIPAGEM

A imunofenotipagem das células dos grupos experimentais revelou diferenças significativas em subpopulações específicas de células do sistema imune. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na porcentagem de células CD3<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> entre os grupos, indicando distribuição homogênea dos linfócitos T totais. Entretanto, a porcentagem de células CD3<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> foi significativamente maior no grupo NT em comparação ao grupo CTR ( $p = 0,0118$ ), bem como em relação aos grupos portadores de tumor A ( $p = 0,0334$ ) e B ( $p = 0,0143$ ), sugerindo maior ativação de linfócitos T auxiliares no grupo sem tumor. Por outro lado, a frequência de linfócitos T auxiliares positivos para granzimas (CD3<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>GRANZ<sup>+</sup>) não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, embora tenha sido observada variação numérica.

A análise das células NK (CD45<sup>+</sup>CD16/32<sup>+</sup>) revelou redução significativa nos Grupos A e B em comparação ao grupo CTR ( $p = 0,0151$  e  $p = 0,0117$ , respectivamente), sugerindo possível diminuição da resposta imune inata mediada por essas células nos grupos portadores de tumor. No entanto, a porcentagem de células NK citotóxicas positivas para perforina (CD45<sup>+</sup>CD16/32<sup>+</sup>PERF<sup>+</sup>) e de células NK produtoras de granzima (CD45<sup>+</sup>CD16/32<sup>+</sup>GRANZ<sup>+</sup>) não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, indicando preservação dos marcadores associados à citotoxicidade dessas células (Figura 13).

**Figura 13.** Análise imunofenotípica das populações imunes nos grupos experimentais (CTR, NT, Grupo A e Grupo B), incluindo linfócitos T totais (CD3<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>, A), linfócitos T auxiliares (CD3<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, B), linfócitos T auxiliares citotóxicos (CD3<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>GRANZ<sup>+</sup>, C) e células NK (CD45<sup>+</sup>CD16/32<sup>+</sup>, D), bem como subpopulações citotóxicas positivas para perforina (E) e granzima (F). Diferenças significativas estão indicadas pelos valores de *p*, evidenciando alterações específicas em linfócitos T auxiliares e células NK entre os grupos.



Fonte: Da autora (2025)

## 5 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo caracterizar, de forma integrada, o crescimento tumoral, o perfil sistêmico e o microambiente imune associados ao desenvolvimento tumoral no modelo murino C3, amplamente utilizado como modelo experimental de neoplasias associadas ao HPV. Os resultados demonstram que a progressão tumoral ocorreu de maneira consistente, acompanhada de alterações imunológicas seletivas, sem evidências de comprometimento sistêmico grave, o que reforça a adequação do modelo para estudos de imunologia tumoral e avaliação de estratégias terapêuticas.

A cinética de crescimento tumoral observada, mais acentuada no Grupo B, se associou à perda ponderal tardia sem redução do consumo alimentar, sugerindo que o impacto sistêmico do tumor não está relacionado primariamente à anorexia, mas possivelmente a alterações metabólicas induzidas pela massa tumoral. Esse padrão tem sido descrito em modelos murinos de tumores sólidos e está relacionado a adaptações metabólicas associadas ao crescimento tumoral progressivo (Hanahan; Weinberg, 2011; Binnewies et al., 2018), indicando que, no período analisado, o tumor exerce efeitos fisiológicos sem desencadear inflamação sistêmica evidente.

A avaliação hematológica não apresentou alterações significativas nos parâmetros eritrocitários, indicando manutenção da função hematopoiética durante o período experimental. Entretanto, a análise diferencial de leucócitos demonstrou modulação seletiva da resposta imune periférica, caracterizada por aumento relativo da população linfocitária e redução dos neutrófilos nos animais com tumor. Alterações dessa natureza têm sido associadas à redistribuição de subpopulações leucocitárias em resposta à presença tumoral, refletindo adaptação imunológica sistêmica, e não necessariamente um quadro inflamatório clássico (Fridman et al., 2017).

Do ponto de vista histopatológico, a preservação estrutural dos órgãos periféricos analisados indica que, no intervalo experimental avaliado, o tumor permaneceu restrito ao sítio de inoculação, sem evidências de toxicidade sistêmica ou atividade metastática detectável. Esses achados são compatíveis com estudos prévios que descrevem o modelo C3 como adequado para a avaliação de respostas locais e sistêmicas iniciais, permitindo a análise de mecanismos imunológicos associados ao crescimento tumoral sem comprometimento orgânico generalizado



(Franconi et al., 2002; Paolini et al., 2013).

A análise histopatológica das massas tumorais evidenciou heterogeneidade morfológica, com presença de áreas de necrose central, estroma reativo com fibroblastos e infiltrado inflamatório escasso. Esse conjunto de características é típico de tumores sólidos em crescimento progressivo e reflete limitações no suprimento vascular, além de remodelamento estromal contínuo (Hanahan; Coussens, 2012). A baixa densidade de infiltrado inflamatório sugere um microambiente tumoral pouco permissivo à infiltração imune efetora, compatível com o perfil descrito para tumores associados ao HPV (Doorbar et al., 2015; Bikorimana et al., 2024).

A imunofenotipagem revelou que a frequência total de linfócitos T permaneceu semelhante entre os grupos experimentais, enquanto a subpopulação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> apresentou redução significativa nos animais portadores de tumor. Considerando o papel central dessas células na coordenação da resposta imune adaptativa, incluindo o suporte à ativação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e a modulação da resposta inata, essa redução relativa pode contribuir para a limitação da resposta antitumoral observada no microambiente tumoral (Fridman et al., 2017). Resultados semelhantes têm sido descritos tanto em tecidos humanos HPV-associados quanto em modelos murinos baseados na linhagem C3, nos quais mecanismos regulatórios locais restringem a eficácia da resposta imune (Loddenkemper et al., 2009).

Em conjunto, esses achados sugerem que a presença tumoral está associada a alterações específicas nas subpopulações de linfócitos T auxiliares e de células NK. O aumento da população de células CD3<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> observado no grupo NT pode refletir uma resposta imune adaptativa mais preservada na ausência de tumor, enquanto a redução de células CD45<sup>+</sup>CD16/32<sup>+</sup> nos grupos portadores de tumor pode estar relacionada a mecanismos de imunossupressão induzidos pelo próprio microambiente tumoral.

A análise das células NK demonstrou redução significativa dessa população nos grupos portadores de tumor, enquanto a expressão de marcadores citotóxicos, como perforina e granzima, não apresentou diferenças estatisticamente significativas. Esse achado sugere que a presença tumoral afeta predominantemente a quantidade dessas células, sem evidências de modulação fenotípica detectável nos parâmetros avaliados. Estudos prévios indicam que tumores sólidos podem limitar o recrutamento, a sobrevivência ou a retenção de



células NK, preservando parcialmente seu perfil citotóxico, mas reduzindo sua eficácia funcional global (Vivier et al., 2012; Balsamo et al., 2020). A ausência de ensaios funcionais específicos no presente estudo limita inferências adicionais sobre a atividade citotóxica dessas células.

Em geral, os resultados indicam que o modelo C3 reproduz características imunológicas relevantes do câncer cervical associado ao HPV, incluindo crescimento tumoral progressivo, microambiente tumoral pobre em infiltração inflamatória e modulação seletiva de subpopulações imunes-chave. Evidências da literatura demonstram que estratégias imunoterapêuticas eficazes nesse modelo dependem da superação dessas barreiras imunológicas locais, seja por vacinação terapêutica, modulação de células reguladoras ou combinação com bloqueio de checkpoints imunológicos (Franconi et al., 2002; Loddenkemper et al., 2009; Bikorimana et al., 2024).

Algumas limitações devem ser consideradas, incluindo o número reduzido de animais controle, a natureza predominantemente fenotípica das análises imunológicas e a ausência de avaliações funcionais diretas das células efectoras. Ainda assim, os dados apresentados sustentam que o modelo C3 é apropriado para estudos de imunologia tumoral e para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas direcionadas a neoplasias associadas ao HPV, contribuindo para a compreensão dos mecanismos de evasão imune e para o aprimoramento de estratégias imunomodulatórias futuras.

## 6 CONCLUSÃO

O modelo C3 apresentou crescimento tumoral consistente ao longo do experimento, embora com variação individual entre os animais, e a progressão tumoral esteve associada a alterações sistêmicas tardias, caracterizadas por perda de peso não proporcional à redução do consumo alimentar. Os parâmetros hematológicos globais permaneceram preservados, indicando ausência de comprometimento hematopoiético, enquanto a análise do sangue periférico evidenciou modulação seletiva do sistema imune, com redução de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e alterações na frequência de células NK nos animais portadores de tumor.

As massas tumorais caracterizaram-se por baixo infiltrado inflamatório, presença de necrose e, pontualmente, sinais de neovascularização, configurando um microambiente tumoral pouco inflamatório. Em conjunto, os achados indicam que, embora o modelo C3 apresente potencial para estudos experimentais em câncer cervical associado ao HPV, sua validação imunológica plena requer análises adicionais, incluindo a caracterização detalhada do microambiente tumoral, ensaios funcionais, avaliação de citocinas e abordagens moleculares, a fim de ampliar sua aplicabilidade em investigações futuras.

## REFERÊNCIAS

- BALSAMO, M. *et al.* Mechanisms of NK cell impairment in the tumor microenvironment. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 11, p. 1–15, 2020.
- BIKORIMANA, J. P. *et al.* An engineered Accum\_E2 (80–90) E7 protein-based vaccine with dual anti-E2 and anti-E7 cervical cancer activity. **Cancer Science**, Hoboken, v. 115, n. 1, p. 1–14, 2024.
- BINNEWIES, M. *et al.* Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. **Nature Medicine**, New York, v. 24, n. 5, p. 541–550, 2018.
- BONFILL-TEIXIDOR, Ester *et al.* Cervical cancer evades the host immune system through the inhibition of type I interferon and CXCL9 by LIF. **Clinical Cancer Research**, v. 30, n. 19, p. 4505-4516, 2024.
- BUSSEY, Kendra A.; BRINKMANN, Melanie M. Strategies for immune evasion by human tumor viruses. **Current opinion in virology**, v. 32, p. 30-39, 2018.
- BUSKWOFIE A, David-West G, Clare CA. A Review of Cervical Cancer: Incidence and Disparities. **J Natl Med Assoc.**, 112(2):229-232, 2020.
- CAVALCANTI, ARS. **Mortalidade por câncer do colo de útero no estado de Pernambuco**. TCC, Curso de Saúde Coletiva, Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória. Vitória de Santo Antão, p. 44. 2022.
- CHAN, Chee Kai *et al.* Human papillomavirus infection and cervical cancer: epidemiology, screening and vaccination - review of current perspectives. **Journal of Oncology**, v. 2019, 2019.
- CHE, Yuxin *et al.* Induction of systemic immune responses and reversion of immunosuppression in the tumor microenvironment by a therapeutic vaccine for cervical cancer. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 69, p. 2651-2664, 2020.
- CHEN, Rui *et al.* Correlation between subsets of tumor-infiltrating immune cells and risk stratification in patients with cervical cancer. **PeerJ**, v. 7, p. e7804, 2019.
- CHEN, Xiaona *et al.* CXCL10 produced by HPV-positive cervical cancer cells stimulates exosomal PDL1 expression by fibroblasts via CXCR3 and JAK-STAT pathways. **Frontiers in oncology**, v. 11, p. 629350, 2021.
- COHEN, Paul A. *et al.* Cervical cancer. *The Lancet*, v. 393, n. 10167, p. 169-182, 2019.
- DE FARIAS, Karol Fireman *et al.* Human papillomavirus infection and risk factors to cervical cancer in asymptomatic women in the region of the Northeast of Brazil. **Journal of Health & Biological Sciences**, v. 9, n. 1, p. 1-6, 2021.

DESHMUKH, Vinit N.; PATIL, Satish; HINGE, Dilip D. The Burden and Prevention of Human Papillomavirus (HPV) Infections and Cervical Cancer in India: A Literature Review. **Cureus**, v. 16, n. 10, 2024.

DE OLIVEIRA, Alan Lopes et al. Role of lncRNA alterations in cervical oncogenesis. **Eurasian Journal of Medicine and Oncology**, v. 6, n. 2, p. 111-120, 2022.

DOORBAR, J. *et al.* The biology and life-cycle of human papillomaviruses. **Vaccine**, Amsterdam, v. 33, suppl. 1, p. A1–A13, 2015.

FELTKAMP, Mariet CW et al. Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope-containing peptide protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16-transformed cells. **European journal of immunology**, v. 23, n. 9, p. 2242-2249, 1993.

FERREIRA, Ana Rita et al. The interplay between antiviral signalling and carcinogenesis in human papillomavirus infections. **Cancers**, v. 12, n. 3, p. 646, 2020.

FIELDING, Richard et al. Cervical Cancer Screening and HPV Vaccination. **Psycho-Oncology**, p. 61, 2021.

FRANCONI, R. *et al.* Plant-derived human papillomavirus 16 E7 oncoprotein induces immune response and specific tumor protection. **Cancer Research**, Philadelphia, v. 62, n. 13, p. 3654–3658, 2002.

FRIDMAN, W. H. *et al.* The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. **Nature Reviews Cancer**, London, v. 17, n. 4, p. 253–271, 2017.

GARDELLA, Barbara; PASQUALI, Marianna Francesca; DOMINONI, Mattia. Human Papillomavirus Cervical Infection: Many Ways to a Single Destination. **Vaccines**, v. 11, n. 1, p. 22, 2023.

GNANAGURUSAMY, Jayapradha; KRISHNAMOORTHY, Sneha; MUTHUSAMI, Sridhar. Transforming growth factor- $\beta$  micro-environment mediated immune cell functions in cervical cancer. **International Immunopharmacology**, v. 140, p. 112837, 2024.

GRANGE, Aurélie et al. Human papillomaviruses: origin, oncogenic factors and markers for cervical cancer screening. **Virologie**, v. 1, n. 1, p. 357-368, 2017.

HAABETH, Ole et al. 1084 NTX-0250, a multimodal mRNA-based immunotherapy, eradicates large established tumors in a stringent mouse model of HPV16-driven cancer. 2022.

HANAHAN, D.; COUSSENS, L. M. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. **Cancer Cell**, Cambridge, v. 21, n. 3, p. 309–322, 2012.

HEEREN, A. M. et al. Efficacy of PD-1 blockade in cervical cancer is related to a CD8+ FoxP3+ CD25+ T-cell subset with operational effector functions despite high immune checkpoint levels. **Journal for immunotherapy of cancer**, v. 7, p. 1-14, 2019.

HAN, Li et al. Interleukin 32 promotes Foxp3+ Treg cell development and CD8+ T cell function in human esophageal squamous cell carcinoma microenvironment. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 9, p. 704853, 2021.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Detecção precoce do câncer. – Rio de Janeiro : INCA, 2021.

ISLAM, Md Rezaul et al. Public concerns about cervical cancer: outbreak, types, risk factors, etiology, stages, symptoms, prevention and treatment. **Annals of Medicine and Surgery**, p. 10,1097, 2023.

JIAN, Z. 29 E6-P53 AND E7-RB co-mediated higher carcinogenic ability of HPV16 than HPV58 in cervical cancer. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 29, p. A17-A18, 2019.

KANG, Mi Ju et al. Comparison of responsiveness to cancer development and anti-cancer drug in three different C57BL/6N stocks. **Laboratory animal research**, v. 35, p. 1-10, 2019.

JOHNSON, Cynae A. et al. Cervical cancer: an overview of pathophysiology and management. In: **Seminars in oncology nursing**. WB Saunders, p. 166-174, 2019.

KARIMI, Hesam et al. Application of Archaeosome Nanoparticles as a DNA Vaccine Delivery System and Evaluation of its Effect in a C57BL/6 Tumor Model. **Pathobiology Research**, v. 19, n. 4, p. 71-85, 2017.

KAYYAL, Matin et al. In silico design and immunological studies of two new multiepitope DNA-based vaccine candidates against high-risk human papillomavirus. **Molecular Biotechnology**, v. 63, p. 1192-1222, 2021.

HENKLE, Talia R. et al. Development of a novel mouse model of spontaneous high-risk HPVE6/E7–expressing carcinoma in the cervicovaginal tract. **Cancer research**, v. 81, n. 17, p. 4560-4569, 2021.

KUMAR, Anoop et al. Designing of multi-epitope chimeric vaccine using immunoinformatic platform by targeting oncogenic strain HPV 16 and 18 against cervical cancer. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 9521, 2022.

LODDENKEMPER, Christoph et al. Regulatory T cells (FOXP3+) as a target for immunological therapy of cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. **Cancer Science**, v. 100, no. 6, pg. 1112-1117, 2009.

LO CIGNO, Irene et al. High-risk HPV oncoproteins E6 and E7 and their interplay with the innate immune response: Uncovering mechanisms of immune evasion and therapeutic prospects. **Journal of Medical Virology**, v. 96, n. 6, p. e29685, 2024.

LUKHELE, Sabelo; BOUKHALED, Giselle M.; BROOKS, David G. Type I interferon signaling, regulation and gene stimulation in chronic virus infection. In: **Seminars in immunology**. Academic Press, p. 101277, 2019.

MALTEZ, Vivien et al. Abstract NG04: Agonistic anti-CD40 converts regulatory T cells in to Type 1 effector cells within the tumor microenvironment. **Cancer Research**, v. 83, n. 7\_Supplement, p. NG04-NG04, 2023.

MITILDZANS, A.; ISAJEVS, S.; REZEBERGA, D. P33 Up-regulation of FOXP3 T regulatory lymphocytes in patients with high-grade squamous intraepithelial lesions correlated with HPV infection. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 29, p. A69-A70, 2019.

MOHAMMED, Mohammed Mohsen; AL-KHAFAJI, Zaytoon Abdulrida Ighewish; AL-HILLI, Nadia Mudher. An exploration of the natural and acquired immunological mechanisms to high-risk human papillomavirus infection and unmasking immune escape in cervical cancer: A concise synopsis. **Tzu Chi Medical Journal**, v. 37, n. 1, p. 28-41, 2025.

MORALE, Mirian Gallote et al. Abstract B12: HPV-positive tumor cell lines exhibit major alterations in Toll-like receptor pathways and depend on HMGB1 expression. **Clinical Cancer Research**, v. 24, n. 1\_Supplement, p. B12-B12, 2018.

MOREAU, Michele et al. Investigating the Use of a Liquid Immunogenic Fiducial Eluter Biomaterial in Cervical Cancer Treatment. **Cancers**, v. 16, n. 6, p. 1212, 2024.

NDIAYE, Moussa et al. Gene expression profiling of peripheral blood mononuclear cells from women with cervical lesions reveals new markers of cancer. **Oncology Reports**, v. 49, n. 6, p. 1-9, 2023.

PAOLINI, F. *et al.* Immunotherapy in new pre-clinical models of HPV-associated oral cancers. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, London, v. 9, n. 3, p. 534–543, 2013.

PAOLINI, Francesca et al. Intrabodies targeting human papillomavirus 16 E6 and E7 oncoproteins for therapy of established HPV-associated tumors. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 40, p. 1-11, 2021.

PETA, Elektra; MASI, Giulia; BARZON, Luisa. KDM2B in papillomavirus-related cancer. **Oncoscience**, v. 5, n. 5-6, p. 159, 2018.

PRUDDEN, Holly J. et al. Understanding the Public Health Value and Defining Preferred Product Characteristics for Therapeutic Human Papillomavirus (HPV) Vaccines: World Health Organization Consultations, October 2021-March 2022. **Vaccine**, v. 40, no. 41, pg. 5843-5855, 2022.

- QI, Wang et al. A novel multi-epitope vaccine of HPV16 E5E6E7 oncoprotein delivered by HBc VLPs induced efficient prophylactic and therapeutic antitumor immunity in tumor mice model. **Vaccine**, v. 40, n. 52, p. 7693-7702, 2022.
- QUINLAN, Jeffrey D. Human papillomavirus: screening, testing, and prevention. **American Family Physician**, v. 104, no. 2, pg. 152-159, 2021.
- SALEH, Mohammed et al. Cervical cancer: 2018 revised international federation of obstetrics and gynecology staging system and the role of imaging. **American Journal of Roentgenology**, v. 214, no. 5, pg. 1182-1195, 2020.
- SILVER, Michelle I.; KOBRIN, Sarah. Exacerbating disparities?: cervical cancer screening and HPV vaccination. **Preventive medicine**, v. 130, p. 105902, 2020.
- SOK, Sophia PM et al. Sensing self and non-self DNA by innate immune receptors and their signaling pathways. **Critical Reviews™ in Immunology**, v. 38, n. 4, 2018.
- SONG, Yinjing et al. HPV E7 inhibits cell pyroptosis by promoting TRIM21-mediated degradation and ubiquitination of the IFI16 inflammasome. **International journal of biological sciences**, v. 16, n. 15, p. 2924, 2020.
- TADLAOUI, Kaoutar Anouar et al. Emergence of oncogenic high-risk human papillomavirus types and cervical cancer. In: **Emerging and Reemerging Viral Pathogens**. Academic Press, p. 539-570, 2020.
- TAWFEIK, Amany et al. Association of CD4+ CD25+ FOXP3+ regulatory T-cells and human papilloma virus infection in Egyptian Women with breast cancer. 2020.
- THOMSEN, Louise T.; KJÆR, Susanne K. Human papillomavirus (HPV) testing for cervical cancer screening in a middle-income country: comment on a large real-world implementation study in China. **BMC medicine**, v. 19, p. 1-3, 2021.
- TRUJILLO-CIRILO, Leonardo et al. Immune microenvironment of cervical cancer and the role of IL-2 in tumor promotion. **Cytokine**, v. 170, p. 156334, 2023.
- VIVIER, E. *et al.* Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. **Science**, Washington, v. 331, n. 6013, p. 44–49, 2012.
- XU, Zhen et al. Modeling the tumor microenvironment of anaplastic thyroid cancer: an orthotopic tumor model in C57BL/6 mice. **Frontiers in Immunology**, v. 14, p. 1187388, 2023.
- WANG, Huan et al. Inhibition of orthotopic genital cancer induced by subcutaneous administration of human papillomavirus peptide vaccine with CpG oligodeoxynucleotides as an adjuvant in mice. **Cancer Management and Research**, p. 5559-5572, 2021.
- YOUSEFI, Zahra et al. An update on human papilloma virus vaccines: history, types, protection, and efficacy. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 6036, 2022.

ZHANG, Shaokai et al. Cervical cancer: Epidemiology, risk factors and screening. **Chinese Journal of Cancer Research**, v. 32, n. 6, p. 720, 2020.

ZHANG, Yue et al. Tumor targeting nanoparticle E749-57-HSP110-RGD elicits potent anti-tumor immune response in a CD8-dependent manner in cervical cancer-bearing mouse model. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 17, n. 10, p. 3529-3538, 2021.

ZHAO, Junwei et al. Genetic variability and functional implication of HPV16 from cervical intraepithelial neoplasia in Shanghai women. **Journal of Medical Virology**, v. 92, n. 3, p. 372-381, 2020.

ZHAO, Weihong et al. Novel biomarkers of inflammation-associated immunity in cervical cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 14, p. 1351736, 2024.

ZHUANG, Linhan et al. p53 is regulated in a biphasic manner in hypoxic human papillomavirus type 16 (HPV16)-positive cervical cancer cells. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 24, p. 9533, 2020.