

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL – UFMS
Campus de CAMPO GRANDE
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E
BIOLOGIA MOLECULAR – PMBqBM

ARON CARLOS DE MELO COTRIM

**EFEITO MODULATÓRIO DA MELATONINA SOBRE O ESTRESSE
OXIDATIVO E VISCOSIDADE DE AMOSTRAS DE MUÇO CERVICAL
INFECTADAS PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO**

CAMPO GRANDE – MS
2020

ARON CARLOS DE MELO COTRIM

**EFEITO MODULATÓRIO DA MELATONINA SOBRE O ESTRESSE
OXIDATIVO E VISCOSIDADE DE AMOSTRAS DE MUÇO CERVICAL
INFECTADAS PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO**

Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular - PMBqBM - SBBq, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor.

Orientadora: Dra. Inês Aparecida Tozetti

CAMPO GRANDE – MS
2020

TERMO DE APROVAÇÃO

ARON CARLOS DE MELO COTRIM

**EFEITO MODULATÓRIO DA MELATONINA SOBRE O ESTRESSE
OXIDATIVO E VISCOSIDADE DE AMOSTRAS DE MUCO CERVICAL
INFECTADAS PELO HPV**

Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular – PMBqBM – SBBq, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para a obtenção do título de Doutor em Ciências (Bioquímica e Biologia Molecular).

08 de dezembro de 2020

Comissão Examinadora:

**PROF^a. DR^a. INÊS APARECIDA TOZZETTI
ORIENTADORA
UFMS – PMBqBM**

**PROF^a. DR^a. ALDA MARIA TEIXEIRA FERREIRA
UFMS – PMBqBM**

**PROF^a. DR^a. LUDIER KESSER SANTOS SILVA
UFMT – PPGIP**

**PROF. DR. JEANDRE AUGUSTO DOS SANTOS JAQUES
UFMS – PMBqBM**

**PROF. DR. ANÍBAL MONTEIRO DE MAGALHÃES NETO
UFMT - PPGIP**

A DEUS

**“em quem estão escondidos todos os tesouros
da sabedoria e da ciência.”**

**A minha amada esposa Mariane
e nosso filho João.**

“Meu ponto é que, se Deus de fato existe, ele se relaciona com o universo mais como um autor se relaciona com uma peça de teatro do que como um objeto no universo se relaciona com algum outro”

– C. S. Lewis

Agradecimentos

Agradeço a Deus pelas misericórdias, amor e graça dispensados a mim, pela resiliência que me fora dada na vida, por ter conhecido pessoas e lugares interessantes. A Ele a glória pelos séculos dos séculos.

A minha orientadora Prof^a. Inês Aparecida Tozetti pelo privilégio concedido a mim de chamá-la de Prof. Inês. Sou grato por todo apoio nesse período, sendo compreensiva e tendo sempre uma boa palavra a me dizer. Obrigado por abrir as portas do laboratório e me conceder acesso à sua incrível vida científica e pelos “hot dogs imunológicos” que são uma delícia. Obrigado por tudo, você é uma pesquisadora/professora magnífica, uma imunologista fantástica e uma pessoa incrível. Você sempre fará parte das melhores recordações que tenho do doutorado.

Aos doutores e amigos Prof. Eduardo Luzia França e Prof^a. Adenilda Cristina Honório França por toda orientação, amizade, paciência, atenção e direcionamento em cada fase do trabalho. Pelo acolhimento e oportunidade de fazer parte de suas pesquisas e projetos científicos. Obrigado por acreditar e confiar na minha capacidade e trabalho. Admiro a forma de trabalho humanizado, terno, compreensivo e profissional de que vocês adotam e que é raro no meio científico. Sou grato pelas palavras de apoio e encorajamento nos momentos difíceis que foram vencidos graças a vocês. Obrigado por tudo. Vocês são meus exemplos de educadores.

A todos os professores, técnicos e alunos do PMBqBM/UFMS com os quais pude conviver e compartilhar conhecimento. Em especial a Prof. Fabiana Zanoelo (coordenadora durante a maior parte do meu doutorado) por toda ajuda e disposição em lutar pelo programa e pelo desenvolvimento dos alunos, também pelas maravilhosas aulas de bioquímica em que pude perceber que tinha feito uma ótima escolha. A Prof^a. Giovana Henriques por compartilhar seu incrível conhecimento de bioquímica de forma tão apaixonante, que me inspirou a estudar cada vez mais. Muito obrigado pelo compromisso e empenho de vocês no meu ensino.

Agradeço a Prof. Dr. Malson Lucena (coordenador atual do PMBqBM) pelo suporte e dedicação que tem dispensado ao programa e em especial ao aprendizado dos alunos. Ao Tec. Administrativo Amós pelo suporte e disposição em solucionar cada problema e imprevisto que nos acomete. Muito obrigado.

Aos amigos do Laboratorio de Imunologia, Biologia Molecular e Bioensaios/ Inbio/ UFMS prof^a. Alda, prof^a. Cacilda, prof^a. Andre, Tec. Camila, Larissa, Mari, Andrielli, Júlio e Marco por me receberem tão bem no laboratório, por compartilharem comigo seus saberes e por me ajudarem em tudo em que eu precisei. Em especial a Tec. Camilinha, por todo o cuidado e zelo com o laboratório, por sempre estar disposta a me ajudar, pelos conhecimentos e experiências científicas compartilhados e pelos cafés que sempre chegavam em boa hora. Muito obrigado de coração.

A Prof. Alda por sua hiperatividade e simpatia, por compartilhar com nós alunos, sua experiência científica e por dividir o chimarrão durante as aulas (*quando ainda não tinhas o problema do coronavírus, claro*). Pela recepção, amizade e auxílio em todos em tudo que precisei durante o doutorado. Grande Abraço.

A querida Ana Paula Machado, não só pela paciência e disposição em me ensinar os protocolos, mas, principalmente pela amizade e demostrada em cada momento difícil que enfrentamos e compartilhamos. Pelos pasteis saboreados, conversas, desabafos, piadas e dramas. Obrigado por tudo, conhecer você foi incrível, desejo toda felicidade e saúde para você e sua linda família.

As companheiras de vida acadêmica Mahmi, Patrícia Marchi e Rúbian por tudo que passamos e enfrentamos juntos, pelos desabafos e risos, vitórias e derrotas acima de tudo pela amizade, respeito e admiração que temos uns pelos outros. Pensando melhor, acho que somos mais cúmplices que amigos. Vocês são incríveis, que cada uma de vocês alcance o que almeja e muito obrigado por tudo.

Aos meus amigos do Laboratorio de Cronoimunomodulação/ CUA/ UFMT profª. Danny Laura, profª. Patrícia Marchi, Andrielly, Katleyn, Mary, Cláudia, Kellen, Jordana e Mahmi por todos esses anos de trabalho, confiança, amizade e respeito. Passamos por muita coisa, crescemos e aprendemos muito juntos. Eu não chegaria aqui hoje sem a amizade de cada uma de vocês.

Aos meus amigos/família da linda e amada Cidade Morena. A família do Sr. Ruy, Louri, Ruy Neto por me receber de uma forma tão incrível em sua casa, o desprendimento e generosidade de você é surreal. Aos agregados Marcos, João Victor, Bernardo e Júliana conhecer e conviver com vocês foi a melhor experiência que tive em Campo Grande.

A minha amada família que sempre acreditou e investiu em meus sonhos. De forma especial a meu pai Adenir, minha mãe Avani Kátia e meu irmão Ramon Carlos só nós sabemos o que já enfrentamos nessa vida, essa vitória eu dedico a vocês!!! A minha cunhada Luana que trouxe ao mundo a menina mais linda que eu já ví, minha sobrinha Clarice. Aos meus cunhados Adam e Renata e a *oma* Eni Waldow, as nossas *comelanças* tornam os domingos mais gostosos. Muito obrigado pelo amor, compreensão, carinho e dedicação de vocês. Obrigado por estarem sempre ao meu lado, pois sozinho eu não teria forças.

A minha amada esposa Mariane, que esteve ao meu lado nos momentos de alegria e tristezas, saúde e doença, riqueza (*que ainda não chegou*) e pobreza. Te agradeço por exigir e me fazer melhor a cada dia. Te agradeço pela vida do nosso filho João e seu esforço faraônico em cuidá-lo e protegê-lo. Agradeço por fazer parte da minha vida. Saiba que tudo isso é feito com você, foi feito para você e por você. Meu maior desejo é te fazer a mulher mais feliz do mundo e nunca desistirei desse projeto!!! Obrigado meu amor.

Ao Dr. Yehya Shakib do Lab. PrevenLab pela parceria nas coletas sem as quais esse trabalho não seria possível.

A CAPES, CNPq, UFMS e UFMT pelo apoio, amparo a pesquisa e incentivo financeiro durante a realização deste trabalho.

RESUMO

A busca por moléculas endógenas com potencial imunomodulatório tem impulsionado pesquisas em várias áreas da medicina. A imunomodulação da produção de citocinas e quimiocinas é uma das formas de avaliar o potencial terapêutico desses compostos e diminuir os efeitos adversos observados nas terapias convencionais. A melatonina é um hormônio produzido principalmente pela glândula pineal que atua através de receptores do sistema nervoso central e periférico. As propriedades imunomodulatórias da melatonina estão relacionadas ao metabolismo oxidativo, ao recrutamento de leucócitos nos tecidos infectados, a redução da expressão de algumas citocinas como IL-6 e IL-8 e no controle de infecções e lesões. O papilomavírus humano (HPV) é o principal agente etiológico do câncer cervical apresentando vários tipos com riscos oncogênicos variados. Os tipos mais agressivos apresentam mecanismos eficientes para o desenvolvimento de lesões neoplásicas como estimulação da produção de citocinas. O muco cervical é um sistema biológico composto por proteínas e compostos inorgânicos, como NaCl, cuja principal função é a proteção da cérvix uterina. Reologia é o estudo da deformação e o escoamento dos fluidos. A alteração do comportamento reológico dos fluidos biológicos proveniente da produção de citocinas é observada em algumas doenças infecto-parasitárias, podendo ser um parâmetro de avaliação. Este estudo buscou avaliar o efeito imunomodulatório da melatonina sobre o estresse oxidativo, produção de citocinas tendo como parâmetro o comportamento reológico do muco cervical. As amostras de muco cervical provenientes de pacientes positivas e negativas para HPV, foram coletadas com escova endocervical e analizadas quanto a presença de melatonina, ânion radical superóxido, atividade da enzima superóxido dismutase, análise de viscosidade e produção e concentrações das citocinas. Em nossos resultados foi possível constatar a presença de melatonina no muco cervical de mulheres infectadas pelo HPV em concentração inferior ao grupo controle. As amostras infectadas apresentaram ainda atividade da enzima CuZn - SOD reduzida e elevada concentração de ânion superóxido, indicando um quadro de estresse oxidativo. A viscosidade das amostras infectadas foi reduzida em relação ao grupo controle. A melatonina adsorvida a microesfera de polietilenoglicol (PEG-MLT) foi eficiente na restauração dos padrões de atividade da SOD, concentração do ânion radical superóxido e viscosidade. As citocinas IL-6 e IL-8 apresentaram maior expressão nas amostras LSIL e HSIL em relação ao grupo NILM. As amostras HSIL apresentaram uma correlação negativa entre a concentração de MLT e de IL-6 e IL-8. Sugerimos que os níveis de IL-6, IL-8 e MLT em amostras HSIL, são decisivas para a progressão das lesões neoplásicas em infecções do HPV.

Palavras-chave: Citocinas, HPV, PEG, SOD, Viscosidade.

ABSTRACT

The search for endogenous molecules with immunomodulatory potential has boosted research in several areas of medicine. Immunomodulation of the production of cytokines and chemokines is one of the ways to evaluate the therapeutic potential of these compounds and to reduce the adverse effects observed in conventional therapies. Melatonin is a hormone produced mainly by the pineal gland that acts through central and peripheral nervous system receptors. The immunomodulatory properties of melatonin are related to oxidative metabolism, the recruitment of leukocytes in infected tissues, the reduction of the expression of some cytokines such as IL-6 and IL-8 and in the control of infections and injuries. Human papillomavirus (HPV) is the main etiological agent of cervical cancer, presenting several types with varied oncogenic risks. The most aggressive types have efficient mechanisms for the development of neoplastic lesions such as stimulation of cytokine production. Cervical mucus is a biological system composed of proteins and inorganic compounds, such as NaCl, whose main function is the protection of the uterine cervix. Rheology is the study of deformation and fluid flow. The change in the rheological behavior of biological fluids from the production of cytokines is observed in some infectious and parasitic diseases, which can be an evaluation parameter. This study sought to evaluate the immunomodulatory effect of melatonin on oxidative stress, production of cytokines taking as a parameter the rheological behavior of cervical mucus. The cervical mucus samples from HPV positive and negative patients were collected with an endocervical brush and analyzed for the presence of melatonin, superoxide radical anion, superoxide dismutase enzyme activity, viscosity analysis and cytokine production and concentrations. In our results, it was possible to verify the presence of melatonin in the cervical mucus of women infected with HPV in a lower concentration than the control group. The infected samples also showed reduced CuZn - SOD enzyme activity and a high concentration of superoxide anion, indicating oxidative stress. The viscosity of the infected samples was reduced in relation to the control group. Melatonin adsorbed to the polyethylene glycol microsphere (PEG-MLT) was efficient in restoring SOD activity patterns, superoxide radical anion concentration and viscosity. The cytokines IL-6 and IL-8 showed greater expression in the LSIL and HSIL samples compared to the NILM group. HSIL samples showed a negative correlation between the concentration of MLT and IL-6 and IL-8. We suggest that the levels of IL-6, IL-8 and MLT in HSIL samples, are decisive for the progression of neoplastic lesions in HPV infections.

Keywords: *Cytokines, HPV, PEG, SOD, Viscosity.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. As células basais do epitélio cervical repousam na membrana basal, que é sustentada pela derme. Acredita-se que o HPV acesse as células basais através de microlesões no epitélio cervical [18].....	07
Figura 2. A produção de melatonina é estimulada por vias noradrenérgicas que respondem aos ciclos de claridade e escuridão [29].....	09
Figura 3 – Biossíntese da melatonina. A síntese da <i>N-acetil-5-metoxitriptamina</i> a partir do triptofano é estimulada na presença de luz e a atividade da enzima NAT é estimulada na ausência de luz [43].....	10

LISTA DE ANEXOS

ANEXO I - Parecer Consustanciado do Comitê de Ética em Pesquisa.....	55
ANEXO II – Termo de Consentimento livre e esclarecido.....	58
ANEXO III – comprovante de submissão do 2º artigo na revista Cancer Immunology, Immunotherapy.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

- ASC-H (*atypical squamous cells of undetermined significance cannot exclude highgrade intraepithelial lesion*) – Células escamosas atípicas de significado indeterminado sem exclusão de lesão intraepitelial de alto grau
- ASC-US (*atypical squamous cells of undetermined significance*) – Células escamosas atípicas de significado indeterminado
- CAT – Catalase
- CCU – Câncer de colo de útero
- CEP – Comitê de ética em pesquisa
- CF – Citometria de fluxo
- CIN (*Cervical intraepithelial neoplasia*) – Neoplasia intraepitelial cervical
- CuZn-SOD – Enzima superóxido dismutase dependente de CuZn
- EROs – Espécies reativas do oxigênio
- Fe-SOD – Enzima superóxido dismutase dependente de Fe
- GSH – Glutationa
- HIOMI – Hidroxi-indol-orto-metil-tranferase
- HPV (*Human papilomavirus*) – Papilomavírus humano
- HR-HPV (high risk - Human papilomavirus) – Papilomavírus humano de alto risco oncogênico
- HSIL (*high-grade squamous intraepithelial lesion*) – Lesão intraepitelial de alto grau
- ISTs – Infecções sexualmente transmissíveis
- JEC – Junção escamo colunar
- LSIL (*low- grade squamous intraepithelial lesion*) – Lesão intraepitelial de baixo grau
- MLT – Melatonina
- Mn-SOD – Enzima superóxido dismutase dependente de Mn
- NAT – N-acetil-tranferase
- NBT (*nitroblue tetrazolium*) – nitroazul de tetrazólio
- NILM (*negative intraepithelial lesion or malignancy*) – Negativo para lesão intraepitelial ou malignidade
- OxSI (*oxidative stress index*) – Índice de estresse oxidativo
- PBS (phosphate buffered saline) – Tampão de fosfato salino
- PEG – Polietilenoglicol

PEG-MLT – Microesfera de polietilenoglicol com melatonina adsorvida

PI3K – Fosfoinositídeo 3-cinase

SOD – Enzima superóxido dismutase

TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	06
1.1 Muco cervical.....	06
1.2 Papilomavírus humano (HPV) e o câncer do colo do útero (CCU).....	06
1.3 Neurohormônio melatonina (MLT).....	08
1.4 Estresse oxidativo.....	11
1.5 Analise reológica	12
1.6 Citocinas IL-6 IL-8 e IL-10.....	13
1.7 Microesferas de polietilenoglico (PEG).....	14
2. OBJETIVOS	16
2.1. Objetivo geral	16
2.2. Objetivos específicos	16
3. RESULTADOS E DISCUSÃO	17
3.1 Artigo 1: Publicado na Biointerface Research in Applied Chemistry.....	18
3.2 Artigo 2: Submetido na Cancer Immunology, Immunotherapy.....	34
4. CONCLUSÕES.....	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
ANEXOS.....	54

1. INTRODUÇÃO

1.1. Muco cervical

O muco cervical é um sistema biológico que consistem de 90 a 99% de líquido contendo componentes como lipídios, colesterol, carboidratos, água, íons inorgânicos como NaCl, proteínas plasmáticas, imunoglobulinas, anticorpos, enzimas, citocinas e células imunológicas também são encontrados em menores concentrações. Entre os compostos orgânicos temos proteínas de baixo e alto peso molecular e outras macromoléculas que interagem entre si e formam uma estrutura gelatinosa ou mucoides. A concentração, composição e viscosidade do muco cervical diferem no decorrer do ciclo menstrual e ao longo da gravidez por influencia hormonal [1 - 4].

Os componentes macromoleculares do muco cervical incluem proteínas derivadas do plasma e produzidas localmente e glicoproteínas de alto peso molecular, as mucinas. As mucinas são compostas por até a 75% de carboidratos unidos por ligações glicosídicas entre N-acetilgalactosamina e serina ou treonina na cadeia polipeptídica e são os principais determinantes do comportamento físico-químico do muco [1, 3].

O muco cervical é produzido no colo do útero pelas células ciliadas secretoras de muco do epitélio colunar simples. Esta solução coloidal é descrita como uma barreira física protetora contra a entrada de patógenos no útero. O colo do útero é formado pela ectocérvice e endocérvice que é revestida pelo epitélio colunar simples mucussecretor. Os pontos de ligação entre os dois epitélios são chamados de junção escamocolunar (JEC). O colo do útero (ectocérvice) e a vagina são compostos por epitélio escamoso estratificado não queratinizado. A primeira camada germinativa é a responsável pelas condições fisiológicas em situações de regeneração (replicação celular) enquanto que as outras camadas representam os diferentes estágios na maturação das células basais [1- 5].

1.2 Papilomavírus humano (HPV) e o câncer do colo do útero (CCU)

O papilomavírus humano é da família Papovaviridae sendo considerado o principal agente etiológico do câncer cervical. São conhecidos cerca de 230 tipos de HPV, sendo que os tipos 6, 11, 42, 43 e 44 são relacionados as lesões benignas e os tipos 16, 18, 31, 33, 45 e 66 estão associados a lesões de alto grau e câncer cervical [6, 7].

No Brasil estima-se que o câncer do colo do útero seja a terceira neoplasia mais comum em mulheres com vida sexual ativa. Atualmente mais de 270.000 mulheres morrem de câncer cervical por ano em todo o mundo, com mais de 500.000 casos diagnosticados por ano, sendo 99% relacionado a presença do HPV. A relação entre o HPV de alto risco oncogênico (HR-HPV), a neoplasia intraepitelial cervical (CIN) e o câncer uterino foi estabelecido por estudos epidemiológicos e associado a exposição do vírus [8, 9].

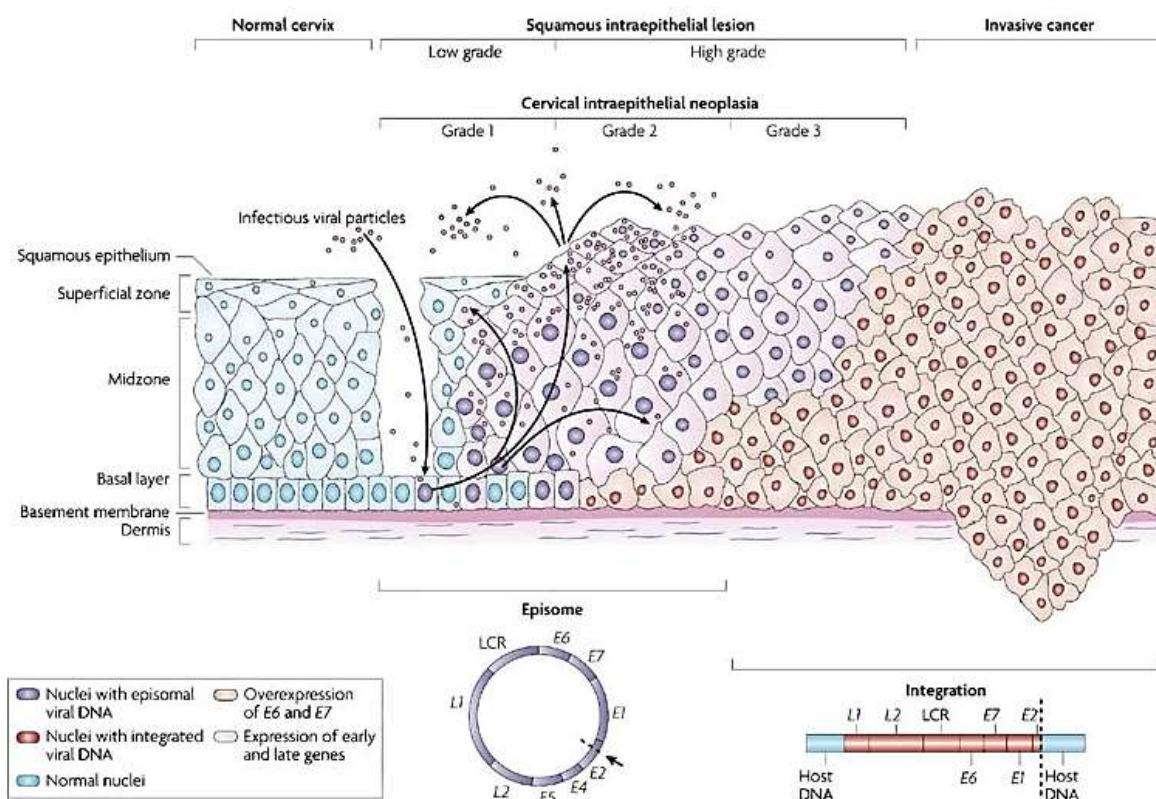


Figura 1. As células basais do epitélio cervical reposam na membrana basal, que é sustentada pela derme. Acredita-se que o HPV acesse as células basais através de microlesões no epitélio cervical [18].

Alguns tipos de HR-HPV tem a capacidade de estimular a expressão de citocinas que em conjunto a infecção por HPV contribui para o aparecimento de lesões neoplásicas cervicais [10, 11]. Os HPVs 16 e 18 são responsáveis por causar neoplasias genitais malignas e responsáveis aproximadamente por 70% dos casos de câncer do colo do útero. Estes HR-HPV estimulam a expressão de citocinas (IL-6, IL-8 e IL-10) que em conjunto ao aumento do estresse oxidativo, a ineficácia da resposta antioxidante no microambiente ocasiona o surgimento de lesões cancerígenas [7, 10 - 17].

A infecção por HPV ocorre por contato direto com a partícula viral que adentra o epitélio até a camada das células basais do epitélio cervical (Figura 1) ou ainda nas regiões onde o epitélio basal é exposto como na JEC [18].

As anormalidades citológicas e a gravidade das lesões cervicais são classificadas pelo Sistema Bethesda em: negativa para lesão intraepitelial ou malignidade (NILM), lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL), lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL), células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US) e células escamosas atípicas de significado indeterminado sem exclusão de HSIL (ASC-H) apresentando diferentes tipos de carcinoma invasivo [7, 8, 9, 14, 15, 19, 20, 21].

O HPV pode ser classificado, de acordo com seu tropismo celular em cutâneos (epidermotróficos) ou mucosos. Os cutâneos afetam principalmente a pele das mãos e dos pés com a formação de verrugas e mucosos infectam o revestimento da boca, garganta, trato respiratório ou epitélio ano-genital, sua manifestação ocorre na forma de condilomas planos e acuminados. Já os mucosos infectam as células do epitélio basal e mucoso, a maioria das infecções pelo HPV são benignas e desaparecem naturalmente dentro de 1 a 5 anos [22 – 24].

1.3 Neurohormônio melatonina (MLT)

A busca por novas biomoléculas com potencial modulador tem impulsionado pesquisas em várias áreas da medicina. O emprego de compostos endógenos com efeito modulador torna-se viável na busca da diminuição dos efeitos adversos causados por fármacos e terapias convencionais. A modulação da produção de estresse oxidativo e da expressão de citocinas e quimiocinas são formas de avaliar o potencial modulatório desses compostos [25]. Destaca-se ainda a utilização de compostos endógenos (hormônios, proteínas, lipídeos, citocinas, entre outros) associados a modernas formas de carreamento e liberação, tem apresentado vantagens terapêuticas em relação as terapias convencionais [26].

Diante de tais perspectivas, o neurohormônio melatonina tem tido resultados promissores como imunomodulador. A melatonina ou N-acetyl-5-metoxitriptamina é uma amina biogênica produzida e secretada principalmente pela glândula pineal com a síntese estimulada a noite e inibida durante o dia, sendo responsável pelo ciclo

circadiano, (Figura 2) [27, 28, 29]. Outros tecidos como medula óssea, trato gastrointestinal, retina e vesícula biliar também produzem melatonina em menores concentrações [30, 31].

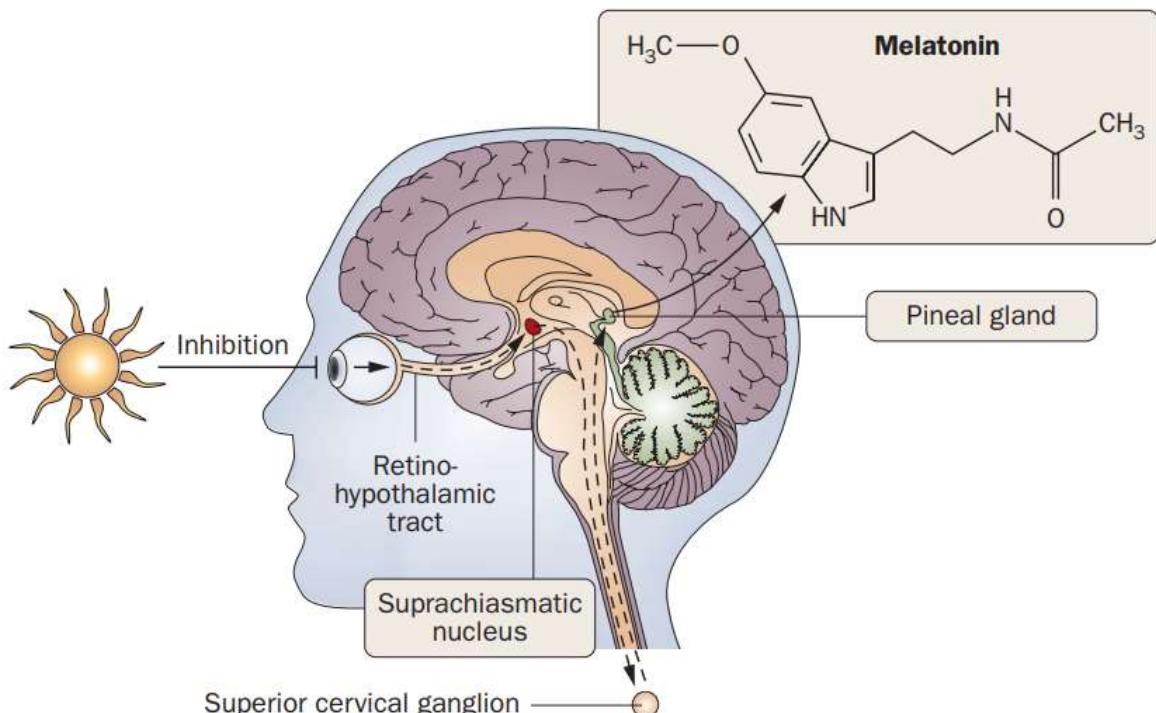


Figura 2. A produção de melatonina é estimulada por vias noradrenérgicas que respondem aos ciclos de claridade e escuridão [29].

As propriedades imunomodulatórias da melatonina estão relacionadas ao recrutamento de leucócitos nos tecidos infectados [32, 33], modulação da expressão de algumas citocinas como IL-6 e IL-8 [10, 11] e atividade pró-oxidante ou antioxidante de acordo com seu local de ação [36, 37]. Estudos também, tem demonstrado alterações na concentração sérica de melatonina e seus derivados em diferentes neoplasias como câncer de mama, colorretal, endometrial, pulmão, estômago [38 - 41].

A biossíntese da MLT acontece prioritariamente na glândula pineal e em menores quantidade em outros tecidos. Inicialmente o triptofano é convertido em serotonina pela ação da enzima hidroxilase. A serotonina é convertida em N-hidroxiptamina por uma descarboxilase. A conversão de N-acetilserotonina em MLT envolve duas principais enzimas a N-Acetyl-Transferase (NAT) e a Hidroxi-Indol-Orto-

Metil-Transferase (HIOMT). A NAT converte a serotonina em N-acetilserotonina e o HIOMT transfere um grupo metil da S-adenosil-metionina para a N-acetyl serotonina, gerando a 5-metoxi-triptamina ou melatonina (Figura 3) [42, 43].

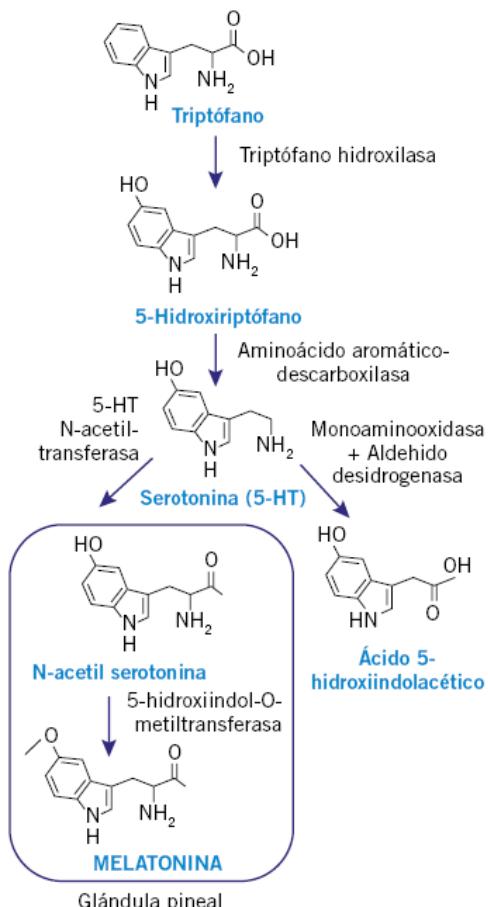


Figura 3 – Biossíntese da melatonina. A síntese da *N-acetil-5-metoxitriptamina* a partir do triptofano é estimulada na presença de luz e a atividade da enzima NAT é estimulada na ausência de luz [43].

A MLT depois de secretada é distribuída por diversos tecidos pela corrente sanguínea, sendo que 70% encontra-se ligada à albumina. Já que a MLT não é armazenada as taxas de síntese e secreção noturna variam de acordo com a heterogeneidade de cada indivíduo, porém costumam ser contínuos em um mesmo indivíduo, sendo o ciclo circadiano um dos mais importantes para os seres humanos [42, 44].

A melatonina é metabolizada no fígado e tem como principal metabolito a 6-sulfatoimelatonina excretada na urina humana. Há evidências de que a síntese de melatonina diminui com o avanço da idade do indivíduo. A luz é o principal fator ambiental para regulação da síntese de MLT e também é responsável pelo ciclo

circadiano, controlado pela intensidade da luz conforme as alterações diárias da fase claridade-escuridão e mudanças sazonais [42, 45, 46]. Com o envelhecimento, os níveis de MEL diminuem favorecendo o aumento de doenças cancerígenas em indivíduos mais velhos. Devido a ação antioxidante alguns autores destacam que a melatonina tem função radioprotetora o que minimiza o dano celular devido a radiação ionizante [47 – 50].

A atividade imunomodulatória da melatonina esta relacionada a sua ação sobre os linfócitos e na expressão de citocinas, ação anti-inflamatória (bloqueado prostaglandinas e regula a COX-2), antitumoral (com capacidade de inibição de mitoses em três linhagens de células diferentes, suprimindo a recaptação do ácidolinoléico, regulando dessa forma os receptores de estrogênio), antioxidante com alta efetividade na redução de radicais livres e cronobiológica (regulando os ciclos biológicos) [42, 44, 51, 52].

É conhecido também a atividade pró-oxidante ou antioxidante da melatonina, dependendo do local de ação [37, 53]. O estresse oxidativo é observado em todas as etapas do processo carcinogênico (iniciação, promoção e progressão). A capacidade antioxidante da melatonina é observada em sua atuação tanto sobre as enzimas antioxidantes com sobre os próprios radicais livres [54 - 59].

1.4 Estresse oxidativo

As espécies reativas do oxigênio (EROs) são subprodutos do metabolismo celular altamente reativos, sendo encontradas como diferentes espécies químicas, como ânion radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^-) [60]. Essas moléculas são importantes na sinalização celular, inflamação e resposta imunológica. Mecanismos antioxidantes enzimáticos (enzimas superóxido dismutase, catalase, peroxidase e glutationa redutase) e não enzimáticos (vitamina E, vitamina C, melatonina, luteína, zinco) atuam no controle da concentração das EROs, mantendo-a em um limiar fisiológico e minimizando seus efeitos deletérios. [61, 62]. O estresse oxidativo é o desequilíbrio entre a geração de moléculas oxidantes e a atuação dos sistemas antioxidantes intrínsecos das células. A produção excessiva desses subprodutos pode causar alterações moleculares em proteínas, lipídios, carboidratos e DNA ocasionando alterações na atividade metabólica desses compostos e resultando em defeitos moleculares que ocasionalmente levam a

diversas patologias como neoplasia, diabetes e doenças neurodegenerativas e envelhecimento. [63 - 65].

Vários estudos têm relatado a diminuição dos agentes antioxidantes ou de sua atividade na circulação sanguínea e no tecido do câncer cervical [66 - 67]. Também tem sido observado a diminuição da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationa (GSH) em eritrócitos de pacientes com câncer cervical [66 – 69]. A redução da atividade da SOD tem sido correlacionada ao dano do DNA celular no tecido cervical infectado com HPV. Outro fator relacionado é a atividade inflamatória, que promove um aumento nos níveis de EROs, associado a diminuição da capacidade antioxidantcelular, gerando assim, um microambiente propício para o aparecimento das lesões neoplásicas em infecções causadas pelo HPV [70, 71].

As enzimas SOD foram as primeiras enzimas antioxidantes a serem caracterizadas, são metaloenzimas pois apresentam um cofator que pode ser manganês (Mn), ferro (Fe) ou cobre-zinco (CuZn), pelos quais também são nomeados Mn-SOD, Fe-SOD e CuZn-SOD, respectivamente. As SOD estão distribuídas pelo organismo desempenhando papel de defesa celular contra espécies reativas de oxigênio sendo capazes de dismutar anión radical superóxido a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em moléculas oxigênio (O_2) [72].

1.5 Análise reológica

Reologia é a ciência que estuda a deformação e o escoamento dos fluidos quando submetidos a determinadas tensões. A caracterização do comportamento reológico apresenta ampla aplicação nas indústrias química, alimentícia e farmacêutica, fornecendo informações importantes relacionadas a estrutura e estabilidade [73]. Dentre as análises reológicas, o perfil de viscosidade dos fluídios biológicos como sangue, saliva, muco brônquio e muco cervical têm fornecido resultados importantes quanto aos padrões de normalidade, diagnóstico de determinada patologia e avaliação do grau de comprometimento do indivíduo [74 - 78].

A caracterização da viscosidade pode servir ainda como parâmetro para a avaliação do efeito modulador de moléculas bioativas sobre a viscosidade de fluido biológicos [79]. A viscosidade do muco cervical tem sido analisada com objetivo de avaliar a motilidade espermática, alterações hormonais durante o ciclo menstrual e a

produção de muco cervical sintético [80, 81, 82], podendo este parâmetro reológico ser estudado em patologias específicas.

1.6 Citocinas IL-6 IL-8 e IL-10

As citocinas modulam diferentes processos e desenvolvimento fisiológicos, inflamatórios e não inflamatórios e o crescimento e diferenciação celular através de varias vias de sinalização [3]. Diversas alterações moleculares em mulheres que apresentem o câncer cervical foram demonstradas sendo mais frequente a imunossupressão produzida pelas citocinas do tipo Th2 (IL-4, IL-6, IL-10) e Th3 (TGF β 1). O vírus HPV tem capacidade de regular a expressão de citocinas. Sabe-se, por exemplo, que o HPV-16 pode aumentar a expressão de TGF β 1 e IL-10 gerando um microambiente imunossupressor que colabora com a progressão das lesões. [83 – 84].

A interleucina 6 (IL-6) é considerada pleitrópica responsável por várias funções biológicas como na regulação da resposta imunológica inata e adaptativa, nos processos inflamatórios, nos tecidos hematopoiéticos e oncogênese. A IL-6 tem capacidade de ativar as células Th17 em parceria com o TGF- β [89]. A IL-6 tem capacidade imunoprotetora contribuindo positivamente na produção de anticorpos para proteção do colo uterino na mucosa contra as infecções cometidas por HPV, podendo ativar a morte de células cancerígenas mediadas por células NK e ainda em contraste ela tem papel de estimulação autócrina para crescimento de células cancerígenas cervicais [90].

As alterações nos níveis da citocina IL-6 afetam o microambiente imunológico do colo uterino. Linfócitos reativos, macrófagos mononucleares, células da medula óssea e algumas células cancerígenas (inclusive células cervicais) tem capacidade de produzir IL-6, sendo este um fator de risco para a progressão da infecção persistente pelo vírus HPV em pacientes com câncer do colo do útero. Assim, a IL-6 serve como indicador de infecção de alto grau e progressão neoplásica [91].

A interleucina 8 (IL-8 ou CXCL8) é um componente da família das quimiocinas CXC que exercem diversas funções importantes no sistema imunológico, incluindo a ativação e atração de neutrófilos. Em estudos in vitro a IL-8 é produzida por neutrófilos, monócitos, macrófagos e células epiteliais quando apresentado a produtos

microbianos originados de bactérias comensais ou patógenos que causam infecções sexualmente transmissíveis (ISTs) [92].

No trato reprodutor feminino é observado um aumento nos níveis IL-8 em mulheres que apresentam ISTs. O aumento de IL-8 nas secreções da genitália e na identificação em culturas de células epiteliais tem sido usadas como marcador biológico de inflamação em ensaios experimentais de microbicidas [92].

A interleucina IL-8 é um importante fator angiogênico e de crescimento autócrino em diversas neoplasias que afetam os seres humanos. Em meios condicionados com células positivas para HPV foi observado a indução da expressão pró-angiogenica de IL-8, que por sua vez, atua no crescimento e invasão tumoral [93].

A IL-10 é uma citocina do tipo T helper (Th2) tem função supressora na imunidade mediada por células. Ela tem capacidade de bloquear as células apresentadoras de antígeno e desregular a expressão do complexo de histocompatibilidade (MHC) impedindo a resposta imunológica, ou seja, é uma citocina com propriedades imunossuppressoras [83 – 84].

A IL-10 tem caráter pleiotrópico, sendo importante em vários tipos de neoplasias. As citocinas do tipo 2, como IL-4 e IL-10 são imunoinibitórias e podem compelir para o crescimento tumoral onde elas são capazes de diminuir a produção de citocinas do tipo Th1 no microambiente tumoral sendo o perfil de pacientes com tumores, ou seja, contribuindo para o desenvolvimento cancerígeno [83 – 84].

Estudos científicos demonstram a relação do aumento da IL-10 em pacientes acometidos pelo vírus HPV, onde esta cria um microambiente imunossupressor acelerando a proliferação celular e desenvolvimento tumoral. O aumento da expressão da citocina IL-10 está associado aos tipos de HPV e ao avanço da patologia, pode ser liberada por linfócitos infiltrantes de tumor, macrófagos e ainda pode ser secretada pelas próprias células tumorais [83 – 84].

1.7 Microesferas de polietilenoglico (PEG)

Os novos sistemas de liberação modificada de fármacos têm por finalidade melhorar os parâmetros de biodisponibilidade, bioviabilidade e a biofuncionalidade [73]. A associação do hormônio melatonina a tais sistemas de liberação pode potencializar seu efeito sem que haja necessidade de aumento da dosagem [81, 82].

As microesferas de polietilenoglicol (PEG) são consideradas um importante veículo para a administração de fármacos, produtos naturais e hormônios [75, 94 - 97].

A veiculação de drogas adsorvidas a sistemas carreadores, como as microesferas de PEG tem sido um tratamento alternativo eficiente em várias doenças, assim, estas microesferas são agentes promissores para a veiculação entrega do hormônio melatonina [98], prevenindo-o da degradação promovido por enzimas metabólicas e principalmente aumentando a sua biodisponibilidade no organismo [99].

Diante disso, este estudo teve como finalidade avaliar e estabelecer as correlações entre a concentração de melatonina, o estresse oxidativo, perfil de viscosidade e concentração das citocinas IL-6, IL-8 e IL-10 em amostras de muco cervical de mulheres positivas para infecção pelo HPV moduladas com microesferas de polietilenoglicol (PEG-MLT) em infecções causadas pelo HPV.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar in vitro o efeito modulador da melatonina adsorvida em microesfera de PEG sobre o estresse oxidativo e viscosidade no muco cervical em amostras positivas e negativas para a presença do HPV.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Detectar e quantificar a concentração do hormônio melatonina nas amostras de muco cervical positivas e negativas para infecção por HPV;
- ✓ Quantificar a concentração do ânion radical superóxido nas amostras de muco cervical;
- ✓ Quantificar a atividade da enzima CuZn-SOD;
- ✓ Quantificar a concentração de ânion radical superóxido nas amostras de muco cervical na presença de PEG-MLT;
- ✓ Quantificar a atividade da enzima CuZn-SOD na presença de PEG-MLT;
- ✓ Avaliar a modulação promovida pela PEG-MLT sobre o estresse oxidativo através do índice de estresse oxidativo (OxSI);
- ✓ Quantificar a concentração das citocinas IL-6, IL-8 e IL-10;
- ✓ Avaliar a viscosidade do muco cervical em amostras positivas e negativas para a presença do HPV;
- ✓ Avaliar a modulação promovida pela PEG-MLT sobre viscosidade do muco cervical em amostras positivas para HPV;
- ✓ Correlacionar os dados de concentração e melatonina ao estresse oxidativo, viscosidade e concentração das citocinas;

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O ítem Resultados e Discussão será apresentado na forma de compilação dos 2 artigos citados abaixo com seus respectivos objetivos. Os artigos na integra se encontram nos itens 3.1 e 3.2 desta tese.

Artigo 1: Effect of polyethylene glycol microspheres adsorbed with melatonin on oxidative stress and viscosity of cervical mucus samples infected with Human Papillomavirus.

Objetivos: Avaliar in vitro a presença do neurohormônio melatonina no muco cervical e avaliar o estresse oxidativo e viscosidade do muco cervical em amostras positivas e negativas para a presença do HPV antes e depois da estimulação com melatonina e melatonina adsorvida a microesfera de PEG.

Artigo 2: Correlação entre a concentração de melatonina e citocinas no muco cervical em amostras positivas para presença do Papilomavírus humano

Objetivos: Correlacionar a concentração de melatonina a concentração de citocinas IL-6, IL-8 e IL-10 nas amostras de muco cervical positivas e negativas para a presença do HPV.

3.1 Artigo 1: Publicado à revista Biointerface Research in Applied Chemistry (BRAC).

BioInterface Research in Applied Chemistry

Platinum Open Access Journal ISSN: 2069-5837

Article

Volume 10, Issue 6, 2020, 6757 - 6772

<https://doi.org/10.33263/BRIAC106.67576772>

Effect of Polyethylene Glycol Microspheres Adsorbed with Melatonin on Oxidative Stress and Viscosity of Cervical Mucus Samples Infected with Human Papillomavirus

Aron Carlos de Melo Cotrim ¹, Eduardo Luzia França ², Adenilda Cristina Honório França ², Jordana Santos Martins ¹, Katleyn Polizeli Galvão Silva ¹, Yehya Chakib Ghalfi ³, Izabela Trindade Machado ¹, Inês Aparecida Tozetti ¹

¹ Institute of Biosciences / Federal University of South Mato Grosso– Campo Grande – MS, Brazil

² Institute of Biological and Health Science - Federal University of Mato Grosso – Barra do Garças – MT, Brazil

³ Prevenlab Laboratory – Barra do Garças – MT, Brazil

* Correspondence: dr.eduardo.franca@gmail.com;

Scopus Author ID 13605890500

Received: 27.04.2020; Revised: 19.05.2020; Accepted: 21.05.2020; Published: 27.05.2020

Abstract: The interfaces of hormones and endogenous molecules associated with nanostructured materials is one of the ways to evaluate the therapeutic potential. Melatonin is a neurohormone that is related to oxidative metabolism. Human Papillomavirus (HPV) is the principal etiological agent of cervical cancer. Cervical mucus is a biological system whose main function is the protection of the uterine cervix. This study aims to evaluate the immunomodulatory effect of melatonin on oxidative stress and rheological behavior of cervical mucus. The cervical mucus was analyzed the melatonin concentration, viscosity, superoxide, and the superoxide dismutase. Melatonin showed lower concentration in the cervical mucus from women infected with HPV. The viscosity was lowest in mucus from women infected with oncogenic HPV. The positive samples for HPV also showed high superoxide release and reduced CuZn-SOD levels indicating oxidative stress. Melatonin adsorbed to the polyethylene glycol microsphere (PEG-MLT) was efficient in restoring the viscosity, superoxide anion, and CuZn-SOD at similar levels to mucus from women negative for HPV. These data suggest that in high-risk HPV infections, there is a decrease in melatonin levels and the viscosity of cervical mucus. PEG-MLT was efficient in reducing oxidative stress and restoring viscosity of cervical mucus.

Keywords: Oxidative stress, Melatonin, Cervical Mucus, Viscosity, HPV, PEG.

© 2020 by the authors. This article is an open-access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Human papillomavirus (HPV) is the principal etiological agent of cervical cancer and is a member of the Papillomaviridae family. About 230 types of HPV are known. The types 6, 11, 42, 43, and 44 were related to benign lesions, and types 16, 18, 31, 33, 45, and 66 were associated with high-grade lesions and cancer cervical. Some types of high-risk HPV can stimulate the expression of immunomodulatory agents, which, together with HPV infection, contributes to the appearance of cervical neoplastic lesions [1, 2]. Another related parameter in the disease progression of cervical cancer is oxidative stress and an inadequate antioxidant response[3, 4, 5].

The melatonin (MLT) hormone have immunomodulatory properties that are related to the recruitment of leukocytes in infected tissues [6, 7], and according to their site of action has

pro-oxidant or antioxidant activity [8, 9]. Alterations in the serum melatonin concentration were observed in the breast, colorectal, endometrial, lung, and stomach cancer [10 - 13]. The antioxidant capacity of melatonin may be related to the direct action on antioxidant enzymes as well as the indirect form on the inhibition of free radicals [14, 15].

Reactive oxygen species (ROS) are highly reactive particles, being found as different chemical species, such as superoxide anion (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2), and hydroxyl radical (OH^-) [16]. These molecules are essential intermediaries of mitochondrial respiration, cell signaling, inflammation, and the immune response. Enzymatic antioxidant mechanisms: superoxide dismutase (CuZn-SOD) (EC 1.15.1.1), catalase (CAT) (EC 1.11.1.6), and glutathione (GSH) (EC 1.15.1.9) and non-enzymatic mechanisms: vitamin E, vitamin C, melatonin, lutein and zinc, act to control the ROS concentration, maintaining its physiological levels and minimizing the effects deleterious [17, 18]. Oxidative stress is the imbalance between the generation of oxidizing compounds and the performance of intrinsic antioxidant systems in cells. The excessive and uncontrolled production of these free radicals can cause molecular alterations in proteins, lipids, carbohydrates, and DNA causing changes in the metabolic activity of these compounds. These alterations result in molecular defects that can lead to several pathologies such as diabetes, obesity, neurodegenerative diseases, and cancer [19 - 21].

Several studies reported a decrease in antioxidants agents or their activities in the blood and uterine cervical cancer [24, 25]. Also observed in the erythrocytes in patients with cervical cancer decreased the activity of CuZn-SOD, CAT, and GSH [22 – 25]. The reduction in SOD activity has been correlated with damage to cellular DNA in cervical tissue infected with HPV. Another factor is related to inflammatory activity, which promotes an increase in ROS levels, associated with a decrease in cellular antioxidant capacity. All these parameters generate a favorable microenvironment for the appearance of neoplastic lesions in infections caused by HPV [26, 27].

On the other hand, rheological studies have shown that deformation and flow of fluids can be associated with certain pathological conditions and influenced by oxidative stress. The characterization of rheological behavior has wide applications in the chemical, food, and pharmaceutical industries, providing important information related to structure and stability [28, 29]. The viscosity profile of biological fluids such as blood, saliva, bronchial mucus, and cervical mucus has contributed to the understanding of several pathophysiological processes. The characterization of viscosity can also serve as a parameter for the evaluation of the modulating effect of bioactive molecules on the viscosity of biological fluids [29 - 31]. The viscosity of cervical mucus has been analyzed in order to assess sperm motility, hormonal changes during the menstrual cycle, and the production of synthetic cervical mucus [32,33].

Studies have shown that the release of a molecule can be modified when delivered to a carrier system [34- 36]. These systems are capable of improving the parameters of bioavailability, bioavailability, and biofunctionality [28,37]. The association of the melatonin hormone to such delivery systems can potentiate its effect without the need to increase the dosage [36]. Polyethylene glycol microspheres (PEG) are considered an essential vehicle for the administration of drugs, natural products, and hormones [30].

The delivery drugs adsorbed to carrier systems, such as the PEG microspheres has been an efficient alternative treatment in several diseases. Thus these microspheres are promising agents for the delivery of melatonin hormone [38 - 42], preventing it from degradation

promoted by proteins by metabolic enzymes and mainly increasing their bioavailability in the body [43].

Therefore, this study aimed to assess the correlations between melatonin concentration, the viscosity profile, and oxidative stress of cervical mucus samples infected with HPV modulated with melatonin adsorbed to polyethylene glycol microsphere.

2. Materials and Methods

2.1. Subjects and collection of cervical mucus.

Cervical mucus samples were collected from women between 18 and 35 years of age who were between the 12th and 21st day of the menstrual cycle without previous history of alterations in the uterine cervix or tested positive for HPV infections. Women that had other diseases such as syphilis, AIDS, diabetes, and cancer were excluded.

Before entering the study, the women signed an informed consent form, which was approved by the local ethics committee (Protocol Number CAAE: 89628218.0.0000.5587).

2.2. Sample processing.

The cervical mucus samples were collected using an endocervical brush with a volume of approximately 700 µL. The samples were centrifuged for the total extraction of the mucus adhered to the brush. The material was fractionated in 2 aliquots, being the first aliquot added 1 mL of Cell Preserv® (preservative solution) and used directed to the detection of viral DNA, and the second aliquot was used in laboratory analysis.

The rheological analysis was done directly in cervical mucus. For the melatonin levels, superoxide release, and CuZn-SOD, the cervical mucus was previously centrifuged at 1200 x g for 20 minutes and resuspended in 1mL of phosphate buffer solution (PBS). The experimental designs are listed in Figure 1.

2.3. HPV detection.

The cervical mucus in preservative solution was evaluated detection viral DNA using the Cobas® HPV Test. (Cobas z 480® Analyzer - Roche). The test uses the amplification of the target DNA by polymerase chain reaction (PCR) and hybridization of nucleic acid for the detection of 14 high-risk HPV types.

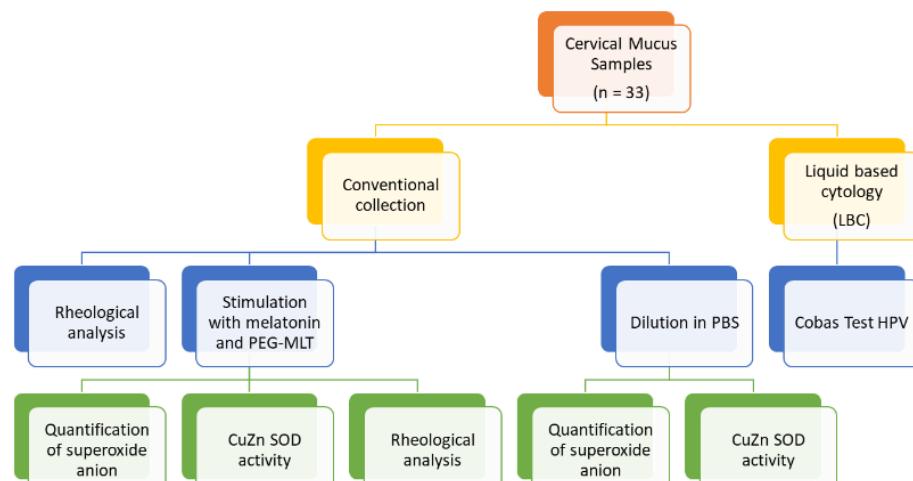


Figure 1. Experimental designs of processing of cervical mucus samples and laboratory analysis.

2.4. Melatonin Hormone Quantification.

The melatonin concentration was performed using the enzyme immunoassay kit of melatonin (Melatonin ELISA® - IBL) [44]. The procedures were performed according to the manufacturer. The reaction rate was measured by absorbance in a spectrophotometer TP-Reader® microplate reader (Thermo Plate) at 405 nm. Melatonin concentration was calculated as a function of the standard curve in pg/mL.

2.5. Formulation and stimulation of melatonin adsorbed to polyethylene glycol (PEG-MLT).

The melatonin solution at a concentration of 9.0 pg.mL⁻¹ was prepared using PBS for dissolution. The PEG microspheres were used with vehicles to carry the melatonin that was adsorbed on its surface. The microspheres were prepared from PEG 6000, which was diluted in 100 mL of PBS and incubated for 30 minutes at 37°C. After incubation, a sodium sulfate solution (Na₂SO₄) (v/v) was added to the PEG and incubated at 37 °C for 45 minutes. The solution was diluted 3:1 in PBS and centrifuged at 5000 rpm for 2 minutes. A further 1:10 dilution in PBS was carried out and incubated at 95 °C for 5 minutes to obtain medium density microspheres. The microspheres were labeled overnight at room temperature with a solution of Dylight-488 (Pierce Biotechnology, Rockford, USA; 10µg.mL⁻¹) in dimethylformamide at a 100:1 molar ratio of PEG:Dylight. The samples were then analyzed by fluorescence microscopy [41, 42].

For the formation of the polyethylene glycol microsphere adsorbed with melatonin, the PEG solution mixed with a melatonin solution in the concentration of 9.0 pg.mL⁻¹ and incubated at 37 °C for 30 minutes [41, 42]. The PEG-MLT solution was used as a stimulus in the volume of 10µL

2.6. Rheological Analysis.

In the second aliquot of cervical mucus, part was directed to the rheological analysis of viscosity in a MCR 102 Reometro (Anton Paar®) coupled to the Rheoplus Software v3.61. The shear stress (τ) was used as a parameter for the test, varying from 0 to 5 mPa.s for the upward curve and from 5 to 0 mPa.s for the downward curve [29 - 31]. The viscosity of the cervical mucus was reevaluated in all samples after treatment with melatonin and PEG-MLT [melatonin adsorbed to PEG to a final concentration of 100ng.mL⁻¹]. This analysis was repeated after stimulation with PEG-MLT.

2.7. Superoxide anion.

Oxidative metabolism was assessed by quantifying the superoxide release in cervical mucus was determined by cytochrome C reduction [45 - 47]. This colorimetric method consists of the oxidation of ferricytochrome C in the presence of the superoxide anion, this color change being detectable in a spectrophotometer with a 630nm filter.

The cervical mucus was resuspended in PBS containing 2.6 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, and 2 mg/mL cytochrome C [Sigma, St Louis, USA]. Aliquots [100 µL] of the suspension were incubated in the presence or not of 10µL of melatonin adsorbed to PEG [PEG-MLT] in culture plates at 37°C for 1 hour. After incubation and reading on a spectrophotometer, the superoxide release concentration was calculated using the following relationship:

$$[O_2^-] = \frac{DO \cdot 100}{6,3}$$

where, $[O_2^-]$ is the concentration of superoxide anion, and DO is the optical density (absorbance) and the results expressed as nmol/O₂⁻ [51].

2.8. CuZn-superoxide dismutase determination (CuZn-SOD – E.C.1.15.1.1).

The activity of the SOD enzyme was carried out by the method of photo-reduction of nitroblue tetrazolium (NBT). The cervical mucus was diluted in PBS, obtaining a final volume of 0.5 mL, and placed in glass tubes in the presence or not of 10µL of 10µL of melatonin adsorbed to PEG [PEG-MLT]. Each tube contained 0.5 mL of the sample, and the standard tube contained 0.5 mL of hydro-alcoholic solution. Next, 0.5 mL of chloroform-ethanol solution (1:1 ratio) and 0.5 mL of the reactive mixture (NBT increased by EDTA) was added to the tubes. The experimental and standard solutions received 2.0 mL of buffer carbonate, and the pH was increased to 10.2 after the addition of hydroxylamine. The tubes remained still at room temperature for 15 min and were subsequently read at 560 nm. The following expression calculated superoxide dismutase:

$$\text{Active SOD} = \frac{(\text{Standard Abs} - \text{Sample Abs})}{(\text{Standard Abs.})} \cdot 100$$

where Abs. Standard is the absorbance of the standard and Abs. The sample is the absorbance of the sample [48, 49].

2.9. Oxidative Stress Index (OxSI).

The oxidative parameters of the cervical mucus were correlated with the other results through the Oxidative Stress Index (OxSI) that obtained through the following relationship:

$$\text{OxSI} = \frac{\text{Active. SOD}}{[O_2^-]}$$

Where, $[O_2^-]$ is the superoxide concentration and Activ. SOD is the activity of the CuZn-SOD enzyme.

2.10. Statistical analysis of the data.

The statistical analysis was performed using the analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's post-test, for the correlation analysis was used the Spearman correlation test. Statistical significance was considered when p<0.05.

3. Results and Discussion

3.1. Sampling and HPV detection.

The 33 cervical mucus samples analyzed for viral DNA 14 samples were positive for high-risk oncogenic HPV types, and 19 samples were negative being considered as a control group for the subsequent analyzes (Table 1).

Table 1. Detection of human papillomavirus (HPV) in cervical mucus samples.

Cervical Mucus	Viral types	Number (n)	TOTAL
Positive HPV	HPV 16	9	14
	HPV 18	4	
Negative HPV	-	19	19
TOTAL		33	33

3.2. Melatonin hormone in cervical mucus.

The melatonin hormone in the cervical mucus of women non-infected showed a concentration of 12.38 pg.mL^{-1} , while in cervical mucus from women infected with HPV presented 6.03 pg.mL^{-1} . There was a decrease of 48.70% in the melatonin concentration in cervical mucus from women with positive HPV (Figure 2).

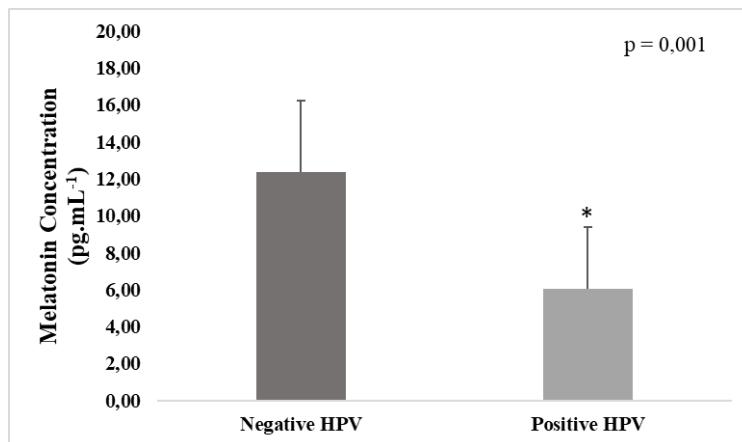


Figure 2. Melatonin concentration in cervical mucus from women with negative and positive for HPV.

*Statistically difference between groups.

There are no records in the scientific literature demonstrating the presence of melatonin in the cervical mucus. It is known that melatonin acts on the female reproductive system, mainly on ovarian function, modulating ovarian steroidogenesis, mainly on progesterone production [50 - 53]. Studies also demonstrate the presence of high concentrations of the hormone in the preovulatory follicles [54]. Other studies also show that the action of melatonin on the gonads [55]. In this work, the presence of melatonin in cervical mucus suggests a broad action of this hormone on the female reproductive system.

The vascularization of mucous tissues guarantees them the necessary blood supply to maintain their functions. In the genital mucosa, blood vessels supply nutrients, gas exchange, and hormones [56]. In this work, the presence of melatonin hormone in the cervical mucus may come from the blood circulation itself. Studies show that during the night, occur decrease in the serum melatonin levels in patients with breast, endometrial, prostate, colorectal, lung, and stomach cancer [11-13]. It is known that women with tumor growth have lower serum melatonin levels [57]. In this study, the decrease of melatonin in cervical mucus can be associated with the progression of the lesions.

3.3. Oxidative stress parameters.

3.3.1 Superoxide anion concentration.

The evaluation of oxidative parameters was performed by quantifying the superoxide anion and the CuZn-SOD enzyme. Oxidative stress is one of the parameters in the disease progression of cervical cancer [58]. Studies have shown a reduction in antioxidant levels in both circulation and uterine tissue of women with cervical cancer [4, 5, 59]. As a result of the decrease in antioxidant levels, there is an increase in reactive oxygen species in the tissues [60]. In this study, we showed a significant increase in the superoxide anion level in the cervical mucus (Figure 3).

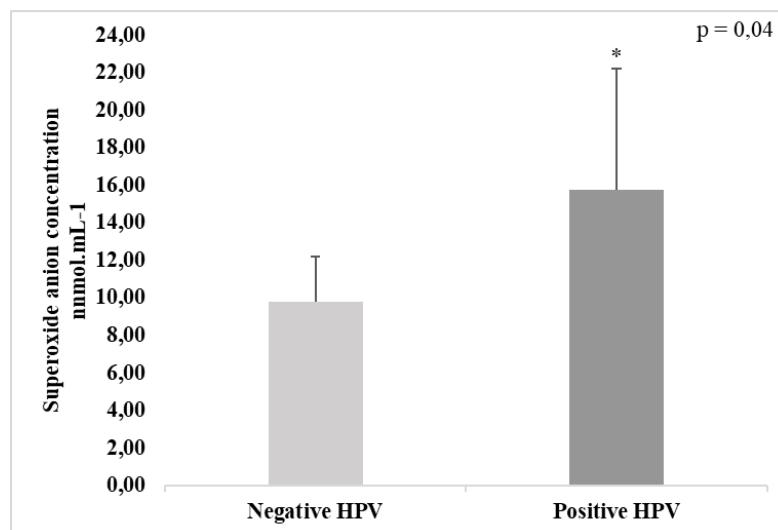


Figure 3. Superoxide anion concentration in cervical mucus from women with negative and positive for HPV.

*Statistically difference between groups.

Reactive species are important cellular signalers in their physiological concentration. However, the increase in these molecules may be related to several diseases. The consequence of the increase in free radicals is damage to DNA. In infections caused by HPV-16, free radicals promote the activation of the E7 oncogene, which in turn leads to genomic instability and promotes replication [61]. Thus, both the increase in ROS and the inhibition of antioxidant agents are molecular devices for the progression of infection and, consequently, cancer.

HPV infections occur through the viral insertion to the basal epithelial layer, the particularly mentally squamocolumnar junction (SCJ), or in regions of micro lesions generated during sexual intercourse [62]. The increase in the superoxide anion in cervical mucus from women infected for HPV points to an oxidative imbalance in the uterine cervix. It is not yet known whether this oxidative imbalance induced or promoted the evolution of infection.

3.3.2. CuZn-SOD enzyme determination.

SOD acts as a central enzyme for the metabolism of the superoxide anion, being of fundamental importance for the balance of the cell-mediated immune response [63].

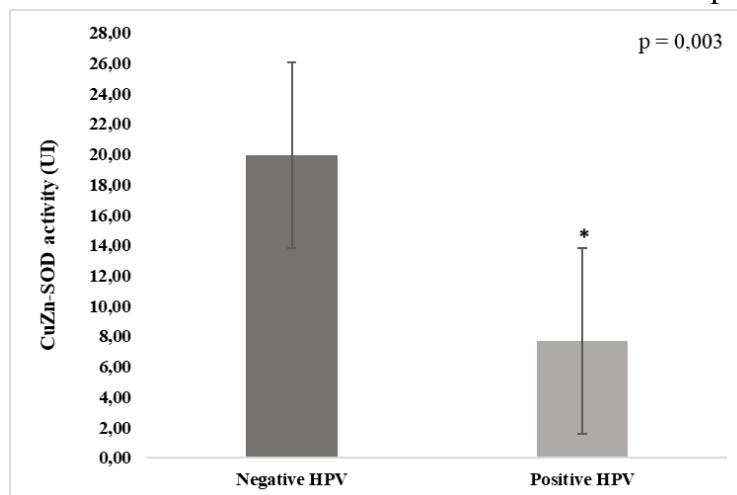


Figure 4. Activity of the CuZn-SOD enzyme in cervical mucus from women with negative and positive for HPV. *Statistically difference between groups.

The impairment of the antioxidant functions of cells, due to the decreased activity of the SOD enzyme, is related to several diseases and neoplasms [64, 65]. Insufficient

concentrations of enzymatic cofactors, such as zinc and manganese, can lead to a reduction in SOD [66]. Studies have reported a significant decrease in CuZn-SOD activity in the uterine cervix in patients with cervical cancer [28]. In this study, we observed a lower SOD concentration in cervical mucus from women with positive HPV (Figure 4).

The decrease in SOD in the uterine cervix was demonstrated in other studies [26], and the cervical mucus, evidenced in this work, may probably be due to oxidative stress in the microenvironment of the uterine cervix in patients with cervical cancer. This oxidative imbalance does not necessarily reflect systemic oxidative stress, once it has been observed that the plasma alterations SOD activity are not related to those found in tissues [67, 68]. This particularity corroborates the importance of studying the oxidative parameters of cervical mucus.

3.3.3. Oxidative stress index.

Since the concentration of superoxide anion and the activity of CuZn-SOD are an essential parameter for the assessment of oxidative stress, the relationship between these two variables was expressed in the form of the Oxidative Stress Index (OxSI). Thus, the OxSI value is directly proportional to the antioxidative response; that is, the higher the index value, the greater the SOD activity or, the lower the concentration of the superoxide anion, with both events co-occurring.

Comparing the OxSI values, the cervical mucus from women infected by HPV showed a lower index value compared to the women without the infection (Table 2). This results in reinforce the hypothesis that the cervical mucus from women with positive HPV present the oxidative imbalance once that these groups showed higher superoxide concentration and lower SOD activity (Figures 3 and 4). This behavior has been observed in HPV infections and uterine cervical cancer [23, 65, 66].

Some studies have shown that CuZn-SOD, unlike Mn-SOD, which is mitochondrial, does not respond directly to oxidative stress because of its action mediated by indirect mechanisms [67, 69]. Thus, the increase in the superoxide anion in the cervical mucus does not directly stimulate the activity of CuZn-SOD in the site.

Table 2. Oxidative Stress Index (OxSI) from cervical mucus form women.

GROUPS	OxSI
Negative HPV	1,44 ± 0,72
Positive HPV	0,76 ± 0,41*

* Statistically difference between groups.

Here, the difference between the OxSI values between the studied groups can be due to the higher melatonin levels of cervical mucus showed in women with HPV infection. The melatonin hormone has a direct action on the regulation of oxidative activity.

3.4. Rheological analysis.

However, cervical mucus is the first physical barrier to protect the uterine cervix against infections [70]. The loss of the rheological characteristics of this fluid makes the cervix susceptible to biological and physical harmful action [71]. Several studies have classified the rheological characteristics of cervical mucus according to the ovulatory cycle, hormonal action, and pathological state [72]. The mucus viscosity is also related to the characteristics of fertility and sperm mobility [73].

In this work, was observed a decrease of viscosity in cervical mucus from women infected with HPV (Figure 5). This decrease in viscosity may action the uterine cervix and favor to viral infection. Studies have shown that the viscosity of cervical mucus decreases due to the action of the hormone estrogen [74 – 77]. Estrogen is the main female hormone responsible for the control of the ovulatory cycle [75].

On the other hand, melatonin can act directly on the production of estrogen and neoplastic growth by inhibiting the activity of the enzyme aromatase (converts androgens into estrogens) and by the specific endogenous inhibition of alpha estrogen receptors via calmodulin estrogen [74 – 77]. Thus melatonin acts as a modulator of estrogen production. The higher concentrations of melatonin in women without HPV infection suggest a protective effect that probably maintains the physiological levels of estrogen and viscosity. However, in women with HPV-infected low melatonin levels, possibly occur an increase in estrogen concentrations, which can be related to a decrease in the viscosity. Further studies should be conducted to understand better hormonal involvement and changes in viscosity in cervical mucus.

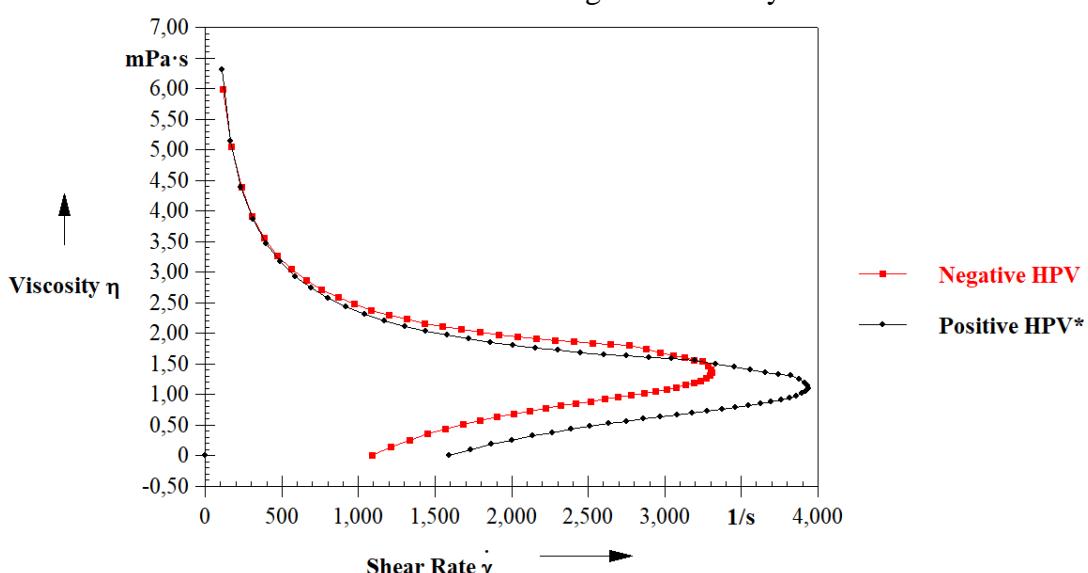


Figure 5. Viscosity curve of the cervical mucus from women with negative and positive for HPV. *Statistically difference between groups.

3.5. Stimulation with melatonin and PEG-MLT.

In order to minimize and oxidative damage caused by the action of HPV infection on cervical mucus, by decreasing the concentration of melatonin, the cervical mucus samples were treated with melatonin [MLT] at a concentration of 9 pg.mL^{-1} adsorbed or not to polyethylene glycol microsphere [PEG-MLT].

After stimulation of the cervical mucus samples, measurements of superoxide anion, activity of the CuZn-SOD enzyme, and viscosity curve were performed, and the results correlated with the OxSI.

Independently of HPV infection, similar superoxide concentration was observed in the cervical mucus when in the presence of melatonin. The treatment with PEG-MLT in cervical mucus from women infected by HPV reduced in 27.3% the superoxide concentration (Figure 6). These results can be explained by the significant increase in the activity of the SOD CuZn enzyme. Melatonin, adsorbed or not to PEG, was able to increase the activity of the CuZn-SOD enzyme in cervical mucus. The highest CuZn-SOD activities were observed in cervical mucus treated with PEG-MLT from women with HPV infection (Figure 7).

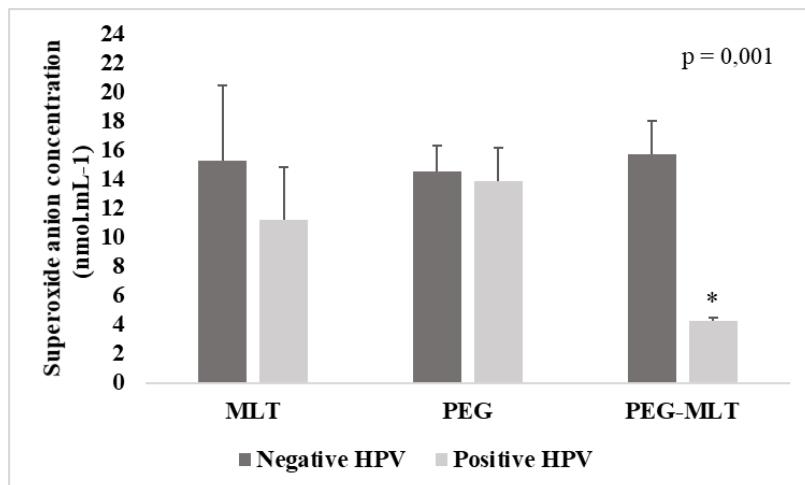


Figure 6. Superoxide anion concentration in cervical mucus after treatment with melatonin adsorbed or not to PEG microsphere from women with negative or positive for HPV. Note: MTL (melatonin); PEG (Polyethylene glycol); PEG-MLT (melatonin adsorbed to Polyethylene glycol) *Statistically different between groups.

Several studies highlight the antioxidant activity of melatonin, both acting directly on free radicals and indirectly through the modulation of enzyme activity [9, 10, 78 - 80]. The results presented in Figures 6 and 7 reinforce the antioxidant effects of melatonin, as well as the action of the PEG microsphere that slows the degradation and prolonging the effect of this hormone [34, 38, 39]. Another fact is that the adsorption of several melatonin molecules on the surface of the PEG microsphere increases in the bioavailability of melatonin [39 - 43].

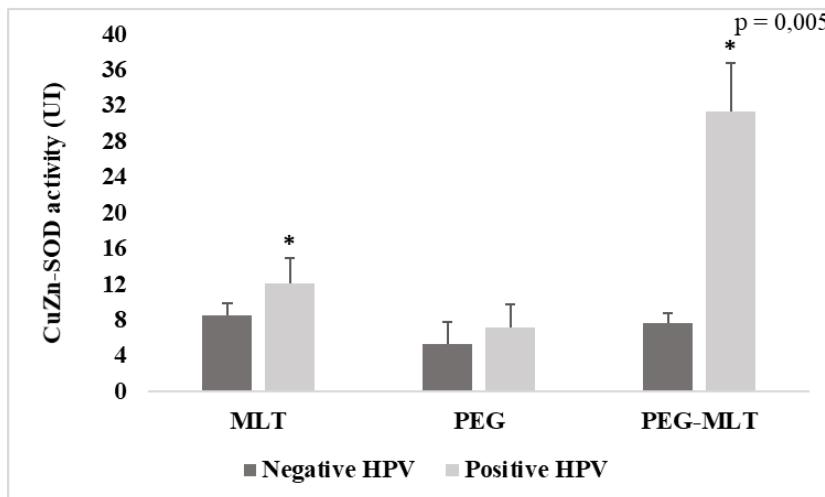


Figure 7. CuZn-SOD enzyme activity in cervical mucus after treatment with melatonin adsorbed or not to PEG microsphere from women with negative or positive for HPV. Note: MTL (melatonin); PEG (Polyethylene glycol); PEG-MLT (melatonin adsorbed to Polyethylene glycol) *Statistically different between groups.

Through the rheological analysis, it was possible to observe an increase in the viscosity of cervical mucus from women infected by HPV when treated with PEG-MLT (Figure 8). The microsphere adsorbed to melatonin was able to restore the viscosity of the cervical mucus from women with positive for HPV to values similar to those observed in cervical mucus from women negative for HPV.

Due to the fact that cervical mucus is a protective barrier of the uterine cervix against physical and biological agents [5, 81], the restoration of its viscosity can be significant for the control of infection and probably can act in the prevention of cancer of cervical uterine.

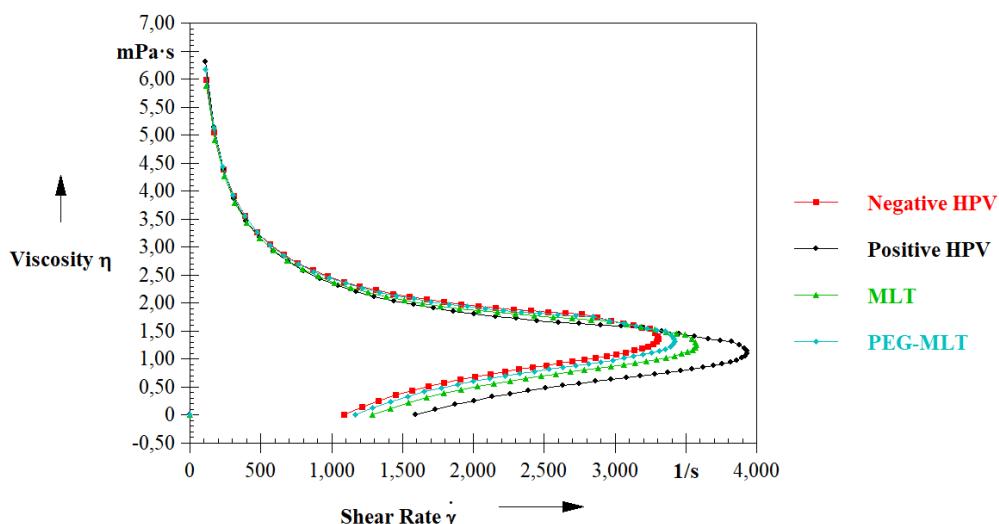


Figure 8. Viscosity curve of cervical mucus after treatment with melatonin adsorbed or not to PEG microsphere from women with negative or positive for HPV. Note: MTL (melatonin); PEG (Polyethylene glycol); PEG-MLT (melatonin adsorbed to Polyethylene glycol) *Statistically different between groups.

By correlating the OxSI and the melatonin concentration in the cervical mucus after stimulation with PEG-MLT, it was possible to observe a significant increase in the r-value ($r = 0.32$ - Table 3). The positive correlation of these parameters reinforces the hypothesis that the increase in the concentration of melatonin provides an increase in OxSI, as shown in Figures 5 and 6 by the decrease in superoxide release levels and the increase in SOD activity. The higher r-value obtained in the correlation test demonstrates the efficiency of the PEG microsphere in potentiating the effects of the carried compounds, a result confirmed in other studies [39 - 43]. OxSI showed no correlation with melatonin concentration for the control group.

Interesting that in this study, the data were correlated. Spearman's correlation analysis showed that melatonin concentration is directly proportional to OxSI; being this correlation is ten times higher in cervical mucus from women with positive HPV (Table 3). This effect is explained by the direct action of melatonin on the superoxide anion, chelating it through Haber-Weiss reactions, described for this hormone [69, 78 - 80].

Table 3. Spearman's correlation test between melatonin concentration and OxSI of cervical mucus from women with negative or positive for HPV.

GROUPS	r-value	p-value*
Negative HPV	+ 0,02	0,04
Positive HPV	+ 0,20	0,04
Negative HPV+ PEG-MLT	+ 0,05	0,06
Positive HPV + PEG-MLT	+ 0,32	0,03

Note: MTL (melatonin); PEG (Polyethylene glycol); PEG-MLT (melatonin adsorbed to Polyethylene glycol) *Statistically different between groups.

The correlation established between viscosity and OxSI showed the protective effect of the antioxidant mechanism on cervical mucus. The non-infected group showed a positive correlation between the variables, indicating that the antioxidant efficiency contributes to maintaining the increase in cervical mucus viscosity. (Table 4). The cervical mucus infected by HPV did not show a correlation between the variables, showing that the decrease in viscosity in this group occurs due to the action of melatonin [74].

The correlation between OxSI and viscosity, after stimulation with PEG-MLT, was directly proportional. Thus, as the OxSI value increases, the viscosity value increases. Such an

effect may be correlated with the effect of melatonin probably by estrogen alterations [50, 52, 76].

Table 4. Spearman's Correlation Test between OxSI and the viscosity of cervical mucus from women with negative or positive for HPV.

GROUPS	r-value	p-value*
Negative HPV	+ 0,51	0,04
Positive HPV	+ 0,05	0,80
Negative HPV + PEG-MLT	- 0,15	0,07
Positive HPV + PEG-MLT	+ 0,31	0,03

Note: MTL (melatonin); PEG (Polyethylene glycol); PEG-MLT (melatonin adsorbed to Polyethylene glycol) *Statistically different between groups.

4. Conclusions

We conclude that the hormone melatonin is present in cervical mucus and that this concentration is lower in cervical mucus from women with HPV infection. The cervical mucus infected by HPV shows a reduction in the activity of SOD-CuZn and an increase in the superoxide anion concentration.

It was possible to establish a directly proportional correlation between the concentration of melatonin and the activity of the enzyme CuZn-SOD. In contrast, melatonin showed an inversely proportional correlation with the superoxide anion. OxSI was efficient in assessing the impairment of antioxidant functions generated by HPV infection, which is directly correlated to the melatonin concentration.

In high-risk HPV infections, there is a decrease in the viscosity of cervical mucus. The melatonin concentrations were directly correlating to the viscosity of cervical mucus. PEG-MLT was efficient in reducing oxidative stress by increasing SOD activity and decreasing the concentration of superoxide anion. PEG-MLT was efficient in restoring viscosity of cervical mucus from women infected for HPV.

Funding

This research was funded by Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel(CAPES) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq No: 447218/2014-0; No: 305725/2018-1), Brazil.

Acknowledgments

We are grateful to the Chronoimmunomodulation Laboratory of Federal University of Mato Grosso - UFMT/Brazil and to the Laboratory of Immunology, Molecular Biology and Bioassays at the Federal University of Mato Grosso do Sul - UFMS/Brazil for technical and logistical support.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest and non-financial competing interests regarding the publication of this article.

References

1. Prata, T.T.M.; Bonin, C.M.; Ferreira, A.M.T.; Padovani, C.T.J.; Fernandes, C.E.D.S.; Machado, A.P.; Tozetti, I.A. Local immunosuppression induced by high viral load of human papilloma virus: characterization of cellular phenotypes producing interleukin-10 in cervical neoplastic lesions. *Immunology* **2015**, *146*, 113-121, <https://doi.org/10.1111/imm.12487>.
2. Kobayashi, A.; Weinberg, V.; Darragh, T.; Smith-McCune, K. Evolving immunosuppressive microenvironment during human cervical carcinogenesis. *Nature* **2008**, *1*, 412-420, <https://doi.org/10.1038/mi.2008.33>.
3. Calaf, G. M.; Urzua, U.; Termini, L.; Aguayo, F. Oxidative stress in female cancers. *Oncotarget* **2018**, *9*, 23824-23842, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25323>.
4. Balasubramanyan, N.; Subramanian, S.; Govindasamy, S. Status of antioxidant systems in human carcinoma of uterine cervix. *Cancer Let.* **1994**, *87*, 187-192, [https://doi.org/10.1016/0304-3835\(94\)90221-6](https://doi.org/10.1016/0304-3835(94)90221-6).
5. Maldonado, P.A.; Negrini, L.A.; Kaizer, R.R.; Zanin, R.F.; do Carmo Araújo, M.; Battisti, V.; Schetinger, M.R.C. Oxidative status in patients submitted to colonization and radiation treatments for uterine cervix neoplasia. *Clin. Chim. Acta* **2006**, *366*, 174-178, <https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.09.025>.
6. Golan, K.; Kollet, O.; Markus, R.P.; Lapidot, T. Daily light and darkness onset and circadian rhythms metabolically synchronize hematopoietic stem cell differentiation and maintenance: The role of bone marrow or epinephrine, TNF and melatonin cycles. *Exp. Hematol.* **2019**, *78*, 1-10, <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2019.08.008>.
7. Maestroni, G.J. The immunotherapeutic potential of melatonin. *Curr. Opin. Invest Dr.* **2001**, *10*, 467-476, <https://doi.org/10.1517/13543784.10.3.467>.
8. Sánchez-Sánchez, A.M.; Martín, V.; García-Santos, G.; Rodríguez-Blanco, J.; Casado-Zapico, S.; Suárez-Garnacho, S.; Rodriguez, C. Intracellular redox state as determinant for melatonin antiproliferative vs cytotoxic effects in cancer cells. *Free Radic. Res.* **2011**, *45*, 1333-1341, <https://doi.org/10.3109/10715762.2011.623700>.
9. Fernandes, R.T.S.; França, E.L.; Fagundes-Triches, D.L.G.; Fujimori, M.; Machi, P.G.F.; Massmann, P.F.; Tozetti, I.A.; Honorio-França, A.C. Nanodoses of melatonin induces apoptosis on human breast cancer cells co-cultured with colostrum cells. *Biointerface Res. Appl. Chem.* **2019**, *9*, 4416-4423, <https://doi.org/10.33263/BRIAC95.416423>.
10. Bartsch, C.; Bartsch, H.; Bellmann, O.; Lippert, T.H. Depression of serum melatonin in patients with primary breast cancer is not due to an increased peripheral metabolism. *Cancer* **1991**, *67*, 1681-1684, [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19910315\)67:6<1681::aid-cncr2820670634>3.0.co;2-0](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19910315)67:6<1681::aid-cncr2820670634>3.0.co;2-0).
11. Bartsch, C.; Bartsch, H.; Schmidt, A.; Ilg, S.; Bichler, K.H.; Flüchter, S.H. Melatonin and 6-sulfatoxy melatonin circadian rhythms in serum and urine of primary prostate cancer patients: evidence for reduced pineal activity and relevance of urinary determinations. *Clin. Chim. Acta* **1992**, *209*, 153-167, [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(92\)90164-L](https://doi.org/10.1016/0009-8981(92)90164-L).
12. Gonzalez-Candia, A.; Veliz, M.; Carrasco-Pozo, C.; Castillo, R.L.; Cárdenas, J.C.; Ebensperger, G.; Herrera, E.A. Antenatal melatonin modulates na enhanced antioxidant/pro-oxidant ratio in pulmonary hypertensive newborn sheep. *Redox Biol.* **2019**, *22*, 1-11, <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101128>.
13. Khoory, R.; Stemme, D. Plasma melatonin levels in patients suffering from colorectal carcinoma. *J. Pineal Res.* **1988**, *5*, 251-258, <https://doi.org/10.1111/j.1600-079x.1988.tb00651.x>.
14. Klepac, N.; Rudeš, Z.; Klepac, R. Effects of melatonin on plasma oxidative stress in rats with streptozotocin induced diabetes. *Biomed. Pharmacother.* **2006**, *60*, 32-35, <https://doi.org/10.1016/j.biopharm.2005.08.005>.
15. Sudnikovich, E.J.; Maksimchik, Y.Z.; Zabrodskaya, S.V.; Kubyshin, V.L.; Lapshina, E.A.; Bryszewska, M.; Zavodnik, I.B. Melatonin attenuates metabolic disorders due to streptozotocin-induced diabetes in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **2007**, *569*, 180-187, <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.05.018>.
16. Bianchi, M.D.L.P.; Antunes, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev. Nutr.* **1999**, *12*, 123-130, <https://doi.org/10.1590/S1415-52731999000200001>.
17. Lin, X.; Dai, Y.; Tong, X.; Xu, W.; Huang, Q.; Jin, X.; Zhang, S. Excessive oxidative stress in cumulus granulosa cells induced cell senescence contributes to endometriosis-associated infertility. *Redox Biol.* **2020**, *30*, 1-13, <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101431>.
18. Prasad, A.S.; Beck, F.W.; Bao, B.; Fitzgerald, J.T.; Snell, D.C.; Steinberg, J.D.; Cardozo, L.J. Zinc supplementation decreases incidence of infections in the elderly: effect of zinc on generation of cytokines and oxidative stress. *Am. J. Clin. Nutr.* **2007**, *85*, 837-844, <https://doi.org/10.1093/ajcn/85.3.837>.
19. Guillaumet-Adkins, A.; Yañez, Y.; Peris-Díaz, M.D.; Calabria, I.; Palanca-Ballester, C.; Sandoval, J. Epigenetics and oxidative stress in aging. *Oxi. Med. Cell Longev.* **2017**, *2017*, 1-8, <https://doi.org/10.1155/2017/9175806>.
20. Fujimori, M., França, E.L., Fiorin, V., Morais, T.C., Honorio-França, A.C., Abreu, L.C. Changes in the biochemical and immunological components of serum and colostrum of overweight and obese mothers. *BMC Pregnancy Childb.* **2015**, *15*, 166. <https://doi.org/10.1186/s12884-015-0574-4>.
21. Marco, F. Oxidative stress and HPV carcinogenesis. *Viruses* **2013**, *5*, 708-731, <https://doi.org/10.3390/v5020708>.

22. Kolanjiappan, K.; Manoharan, S.; Kayalvizhi, M. Measurement of erythrocyte lipids, lipid peroxidation, antioxidants and osmotic fragility in cervical cancer patients. *Clin. Chim. Acta* **2002**, *326*, 143-149, [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(02\)00300-5](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(02)00300-5).
23. Manju, V.; Sailaja, J.K.; Nalini, N. Circulating lipid peroxidation and antioxidant status in cervical cancer patients: a case-control study. *Clin. Biochem.* **2002**, *35*, 621-625, [https://doi.org/10.1016/S0009-9120\(02\)00376-4](https://doi.org/10.1016/S0009-9120(02)00376-4).
24. Manoharan, S.; Kolanjiappan, K.; Kayalvizhi, M.; Sethupathy, S. Lipid peroxidation and antioxidant status in cervical cancer patients. *J. Biochem. Mol. Biol. Biophys.* **2002**, *6*, 225-227.
25. Ebrahimi, S.; Soltani, A.; Hashemy, S.I. Oxidative stress in cervical cancer pathogenesis and resistance to therapy. *J. Cell. Biochem.* **2019**, *120*, 6868-6877, <https://doi.org/10.1002/jcb.28007>.
26. Srivastava, S.; Natu, S. M.; Gupta, A.; Pal, K.A.; Singh, U.; Agarwal, G.G.; Srivastava, A.N. Lipid peroxidation and antioxidants in different stages of cervical cancer: Prognostic significance. *Indian J. Cancer* **2009**, *46*, 297-302. <https://doi.org/10.4103/0019-509X.55549>.
27. Williams, V.M.; Filippova, M.; Soto, U.; Duerksen-Hughes, P.J. HPV-DNA integration and carcinogenesis: putative roles for inflammation and oxidative stress. *Future Virol* **2011**, *6*, 45-57, <https://doi.org/10.2217/fvl.10.73>.
28. Huang, N. Rheological Characterization of Pharmaceutical and Cosmetic Formulations for Cutaneous Applications. *Curr. Pharm. Des.* **2019**, *25*, 2349-2363, <https://doi.org/10.2174/1381612825666190716110919>.
29. Ribeiro, E.B.; Lanes, P.K.D.; Chaud, N.G.A.; Pessoa, R.S.; Honorio-França, A.C.; França, E.L. Microemulsions with levamisole delivery systems as novel immunomodulating agents with potential for amebiasis therapies. *Sci. Adv. Mater.* **2015**, *7*, 15-27, <https://doi.org/10.1166/sam.2015.2003>.
30. Silva, F.H., Ribeiro, A.A.L.; Deluque, A.L.; Cotrim, A.C.M.; de Marchi, P.G.F.; França, E.L.; Honorio-França, A.C. Effects of barium chloride adsorbed to polyethyleneglycol (PEG) microspheres on co-culture of human blood mononuclear cell and breast cancer cell lines (MCF-7). *Immunopharmacol Immunotoxicol.* **2018**, *40*, 18-24, <https://doi.org/10.1080/08923973.2017.1392563>.
31. Fernandez-Hermida, Y.; Grande, G.; Menarguez, M.; Astorri, A.L.; Azagra, R. Proteomic markers in cervical mucus. *Protein Peptide Lett.* **2018**, *25*, 463-471, <https://doi.org/10.1186/s12976-018-0092-y>.
32. Burruano, B.T.; Schnaare, R.L.; Malamud, D. Synthetic cervical mucus formulation. *Contraception* **2002**, *66*, 137-140, [https://doi.org/10.1016/s0010-7824\(02\)00336-0](https://doi.org/10.1016/s0010-7824(02)00336-0).
33. Kirkman-Brown, J.C.; Smith, D.J. Sperm motility: is viscosity fundamental to progress? *Mol. Hum. Reprod.* **2011**, *17*, 539-544, <https://doi.org/10.1093/molehr/gar043>.
34. Scherer, E.F.; Honorio-França, A.C; Hara, C.C.P.; Reinaque, A.P.B.; Côrtes, M.A.; França, E.L. Immunomodulatory effects of poly (ethylene glycol) microspheres adsorbed with nanofractions of *Momordica charantia L.* on diabetic human blood phagocytes. *Sci. Adv. Mater.* **2011**, *3*, 687-694, <https://doi.org/10.1166/sam.2011.1236>.
35. França, E.L.; Honório-França, A.C.; Fernandes, R.T.; Marins, C.M.; Pereira, C.C.; Varotti, F.P. The Effect of Melatonin Adsorbed to Polyethylene Glycol Microspheres on the Survival of MCF-7 Cells. *Neuroimmunomodulation*, **2015**, *23*, 27-32, <https://doi.org/10.1159/000439277>.
36. Ribeiro, E.B.; Marchi, P.G.F.; Honorio-França, A.C.; França, E.L.; Soler, M.A.G. Interferon-gamma carrying nanoemulsion with immunomodulatory and anti-tumour activity. *J. Biomed. Mater. Res.* **2019**, *1*-12, <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36808>.
37. Murugan, N.; Natarajan, D. Bionanomedicine for antimicrobial therapy – a case study from *Glycosmis pentaphylla* plant mediated silver nanoparticles for control of multidrug resistant bacteria. *Lett. Appl. NanoBioScience*, **2018**, *8*, 523-540. <https://doi.org/10.33263/LIANBS834.523540>.
38. Reinaque, A.P.B.; França, E.L.; Scherer, E.F.; Côrtes, M.A.; Souto, F.J.D.; Honorio-França, A.C. Natural material adsorbed onto a polymer to enhance immune function. *Drug Des. Devel. Ther.* **2012**, *6*, 209-216, <https://doi.org/10.2147/DDDT.S34622>.
39. Fagundes, D.L.G.; Franca, E.L.; Hara, C.D.C.P.; Honorio-Franca, A.C. Immunomodulatory Effects of Poly (Ethylene Glycol) Microspheres Adsorbed with Cortisol on Activity of Colostrum Phagocytes *Int. J. Pharmacol.* **2012**, *8*, 510-518, <https://doi.org/10.3923/ijp.2012.510.518>.
40. Guimarães, P.C.L.; Honorio-França, A.C.; Hara, C.d.C.P.; Fagundes, D.L.G.; Ratto, S.H.B.; França, E.L. Modulation of human colostrum phagocyte activity by the glycine-adsorbed polyethyleneglycol microspheres. *J. Chem.* **2013**, *2013*, 1-8, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/845270>.
41. Hara, C.C.P.; Honorio-França, A.C.; Fagundes, D.L.G.; Guimarães, P.C.L.; França, E.L. Melatonin nanoparticles adsorbed to polyethyleneglycol microspheres as activators of human colostrum macrophages. *J. Nanomater.* **2013**, *2013*, 1-8, <https://doi.org/10.1155/2013/973179>.
42. Fernandes R.T.S.; Cotrim, A.C.M.; França, E.L.; Honorio-França, A.C.; Tozetti, I.A. Melatonin bioengineered: A New Possible Strategy for Treatment of Breast Cancer. *Int. J. Adv. Eng. Res. Sci.* **2018**, *5*, 9-18, <https://doi.org/10.22161/ijaers.5.10.2>.
43. Yu, D.; Peng, P.; Dharap, S. S.; Wang, Y.; Mehlig, M.; Chandna, P.; Borchard, G. Antitumor activity of poly (ethylene glycol)-camptothecin conjugate: The inhibition of tumor growth in vivo. *J. Control. Release* **2005**, *110*, 90-102, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.09.050>.

44. Morceli, G.; Honorio-França, A.C.; Fagundes, D.L.G.; Calderon, I.M.P.; França, E.L. Antioxidant effect of melatonin on the functional activity of colostral phagocytes in diabetic women. *PLoS ONE* **2013**, *8*, 1-8, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056915>.
45. Araújo, R.L.; Savazzi, S.; Fujimori, M.; Deluque, A.; Honório-França, E.L.; Pertuzatti Konda, P.B.; Honório-França, A.C. Effects of Mangaba (*Hancornia speciosa*) Fruit Extract Adsorbed onto PEG Microspheres in MCF-7 Breast Cancer Cells Co-Cultured with Blood Cells. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2019**, *20*, 1995-2001, <https://doi.org/10.31557/APJCP.2019.20.7.1995>.
46. Novelli, E.L.; Rodríguez, N.L.; França, E.L.; Gebra, L.M.N.; Ribas, B.O. High Dietary Carbohydrate and Panceatic lesion. *Braz. J Med. Biol Res.* **1993**, *26*, 31-36.
47. Pick, E.; Mizel, D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. *J. Immunol. Methods* **1981**, *46*, 211-226, [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(81\)90138-1](https://doi.org/10.1016/0022-1759(81)90138-1).
48. Honorio-Franca, A.C.; Carvalho, M.P.S.M.; Isaac, L.; Trabulsi, L.R.; Carneiro-Sampaio, M.M.S. Colostral mononuclear phagocytes are able to kill enteropathogenic *Escherichia coli* opsonized with colostral IgA. *Scand. J. Immunol.* **1997**, *46*, 59-66, <https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.1997.d01-86.x>.
49. Morais, C.T.; Honorio-França, C.A.; Fujimori, M.; de Quental, B.O.; Pessoa, S.R.; França, L.E.; de Abreu, C.L. Melatonin action on the activity of phagocytes from the colostrum of obese women. *Medicina* **2019**, *55*, 1-11, <https://doi.org/10.3390/medicina55100625>.
50. Dair, E.L.; Simoes, R.S.; Simões, M.J.; Romeu, L.R.G.; Oliveira-Filho, R.M.; Haidar, M.A.; Baracat, E.C.; Soares, J.M., Jr. Effects of melatonin on the endometrial morphology and embryo implantation in rats. *Fertil. Steril.* **2008**, *89*, 1299-1305, <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.03.050>.
51. Masana, M.I.; Soares Jr, J.M.; Dubocovich, M.L. 17 β -estradiol modulates hMT1 melatonin receptor function. *Neuroendocrinology* **2005**, *81*, 87-95, <https://doi.org/10.1159/000084897>.
52. Adriaens, I.; Jacquet, P.; Cortvriendt, R.; Janssen, K.; Smitz, J. Melatonin has dose- dependent effects on folliculogenesis, oocyte maturation capacity and steroidogenesis. *Toxicology* **2006**, *228*, 333-343, <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.09.018>.
53. Rönnberg, L.; Kauppila, A.; Leppäläluoto, J.; Martikainen, H.; Vakkuri, O. Circadian and seasonal variation in human preovulatory follicular fluid melatonin concentration. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1990**, *71*, 493-496, <https://doi.org/10.1210/jcem-71-2-493>.
54. Vijayalakshmi; Thomas Jr, C.R.; Reiter, R.J.; Herman, T.S. Melatonin: from basic research to cancer treatment clinics. *J. Clin. Oncol.* **2002**, *20*, 2575-2601, <https://doi.org/10.1200/jco.2002.11.004>.
55. Martínez-Campa, C.; Gonzalez, A.; Mediavilla, M. D.; Alonso-Gonzalez, C.; Sanchez-Barcelo, E.J.; Cos, S. Melatonin enhances the inhibitory effect of aminoglutethimide on aromatase activity in MCF-7 human breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* **2005**, *94*, 249-254, <https://doi.org/10.1007/s10549-005-9006-x>.
56. Fernández-Ladrón, V.; Aguirre-Gorospe, S.; Lapeña-Calavia, S.; Tarrío- Fernández, O.; Muruzabal-Torquemada, J.C. Sarcoma mieloide uterino como manifestacion de leukemia aguda mieloide. *Rev. Chil. Obstet. Ginecol.* **2019**, *84*, 332-336, <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75262019000400332>.
57. Luboshitzky, R.; Herer, P.; Shen-Orr, Z. Urinary 6-sulfatoxymelatonin excretion in hyperandrogenic women: the effect of cyproterone acetate-ethinyl estradiol treatment. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* **2004**, *112*, 102-107, <https://doi.org/10.1055/s-2004-815765>.
58. Carneiro, S.R.; da Silva Lima, A.A.; de Fátima Silva Santos, G.; de Oliveira, C.S.B.; Almeida, M.C.V.; da Pinheiro, M.C.N. Relationship between Oxidative Stress and Physical Activity in Women with Squamous Intraepithelial Lesions in a Cervical Cancer Control Program in the Brazilian Amazon. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2019**, *2019*, 1-7, <https://doi.org/10.1155/2019/8909852>.
59. Shafabakhsh, R.; Reiter, R.J.; Mirzaei, H.; Teymoordash, S.N.; Asemi, Z. Melatonin: A new inhibitor agent for cervical cancer treatment. *J. Cell Physiol.* **2019**, *234*, 21670-21682, <https://doi.org/10.1002/jcp.28865>.
60. Lima, N.A.; Santana, N.d.C.S.; de Lima, N.C.A.; Lazarin-Bidóia, D.; Bonfim-Mendonça, P.d.S.; Ueda Nakamura, T.; Nakamura, C.V.; Consolaro, M.E.L.; Ximenes, V.F.; Silva, S.D.O. Antiproliferative effect of apocynin in cervical epithelial cells infected by HPV 16 involves change of ROS production and cell cycle. *Med. Chem. Res.* **2017**, *26*, 2853-2860, <https://doi.org/10.1007/s00044-017-1984-9>.
61. Halliwell, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases. *Drugs Aging* **2001**, *18*, 685-716, <https://doi.org/10.2165/00002512-200118090-00004>.
62. Woodman, C.B.; Collins, S.I.; Young, L.S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7*, 11-22, <https://doi.org/10.1038/nrc2050>.
63. Perry, J.J.P.; Fan, L.; Tainer, J.A. Developing master keys to brain pathology, cancer and aging from the structural biology of proteins controlling reactive oxygen species and DNA repair. *Neuroscience* **2007**, *145*, 1280-1299, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.10.045>.
64. Johnston, J.R.; Godzik, C.A.; Cohn, Z.A. Increased superoxide anion production by immunologically activated and chemically elicited macrophages. *Jpn. J. Exp. Med.* **1978**, *148*, 115-129, <https://doi.org/10.1084/jem.148.1.115>.
65. Näslund, U.; Häggmark, S.; Johansson, G.; Marklund, S.L.; Reiz, S.; Öberg, A. Superoxide dismutase and catalase reduce infarct size in a porcine myocardial occlusion-reperfusion model. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **1986**, *18*, 1077-1084, [https://doi.org/10.1016/S0022-2828\(86\)80294-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2828(86)80294-2).

66. Naidu, M.S.K.; Suryakar, A.N.; Swami, S.C.; Katkam, R.V.; Kumbar, K.M. Oxidative stress and antioxidant status in cervical cancer patients. *Indian J. Clin. Biochem.* **2007**, *22*, 140-144, <https://doi.org/10.1007/bf02913333>.
67. Fridovich, I. Superoxide anion radical (O_2^-), superoxide dismutases, and related matters. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 18515-18517, <https://doi.org/10.1074/jbc.272.30.18515>.
68. Perry, J.J.P.; Shin, D.S.; Getzoff, E.D.; Tainer, J.A. The structural biochemistry of the superoxide dismutases. *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.* **2010**, *1804*, 245-262, <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.11.004>.
69. Santos, A.F.; Machado, R.R.; Neto, J.M.M.; Menezes, M.G.V.; Silva, G.B.A.; Santos, S.L. The diosmin antioxidant effect: an integrative review. *ABCS Health Sciences* **2018**, *43*, 175-180, <http://doi.org/10.7322/abcs.43i3.1024>.
70. Katz, D.F. Human cervical mucus: research update. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **1991**, *165*, 1984-1986, [https://doi.org/10.1016/S0002-9378\(11\)90559-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9378(11)90559-6).
71. Wolf, D.P.; Blasco, L.; Khan, M.A.; Litt, M. Human cervical mucus oral contraceptives and mucus rheologic properties. *Fertil. Steril.* **1979**, *32*, 166-169..
72. Critchfield, A.S.; Yao, G.; Jaishankar, A.; Friedlander, R.S.; Lieleg, O.; Doyle, P.S.; Ribbeck, K. Cervical mucus properties stratify risk for preterm birth. *PloS ONE* **2013**, *8*, 1-7, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069528>.
73. Singangutti, R. Incidence and etiologic factors responsible for anovulation in infertility cases. *Int. J. Reprod. Contracept. Obstet. Gynecol.* **2018**, *7*, 1567-1570, <http://doi.org/10.18203/2320-1770.ijrcog20181357>.
74. Díaz, L.; Ceja-Ochoa, I.; Restrepo-Angulo, I.; Larrea, F.; Avila-Chávez, E.; García-Becerra, R.; Alvarez-Rios, E. Estrogens and human papilloma virus oncogenes regulate human ether-a-go-go-1 potassium channel expression. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 3300-3307, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2036>.
75. Maganhin, C.C.; Carbonel, A.A.; Hatty, J.H.; Fuchs, L.F.; Oliveira-Júnior, I.S.; Simões, J.M.; Soares, J.J. Melatonin effects on the female genital system: a brief review. *Rev. Assoc. Med. Bras.* **2008**, *54*, 267-271, <https://doi.org/10.1590/s0104-42302008000300022>.
76. Cos, S.; González, A.; Martínez-Campa, C.; Mediavilla, M.D.; Alonso-González, C.; Sánchez-Barceló, E.J. Estrogen-signaling pathway: a link between breast cancer and melatonin oncostatic actions. *Cancer Detect. Prev.* **2006**, *30*, 118-128.
77. Río, B.D.; Pedrero, J.M.G.; Martínez-Campa, C.; Zuazua, P.; Lazo, P.S.; Ramos, S. Melatonin, an endogenous-specific inhibitor of estrogen receptor α via calmodulin. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 38294-38302, <https://doi.org/10.1074/jbc.m403140200>.
78. Reiter, R.J.; Mayo, J.C.; Tan, D.-X.; Sainz, R.M.; Alatorre-Jimenez, M.; Qin, L. Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. *J. Pineal. Res.* **2016**, *61*, 253-278, <https://doi.org/10.1111/jpi.12360>.
79. Karaaslan, C.; Suzen, S. Antioxidant properties of melatonin and its potential action in diseases. *Curr. Top. Med. Chem.* **2015**, *15*, 894-903, <https://doi.org/10.2174/1568026615666150220120946>.
80. Canada, A.T.; Calabrese, E.J. Superoxide dismutase: its role in xenobiotic detoxification. *Pharmacol. Ther.* **1989**, *44*, 285-295, [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(89\)90068-5](https://doi.org/10.1016/0163-7258(89)90068-5).
81. Han, L.; Padua, E.; Hart, K.D.; Edelman, A.; Jensen, J.T. Comparing cervical mucus changes in response to an oral progestin or oestrogen withdrawal in ovarian-suppressed women: a clinical pilot. *Eur. J. Contracep. Reprod.* **2019**, *24*, 209-215, <https://doi.org/10.1080/13625187.2019.1605503>.

3.2 Artigo 2: Submetido à revista Cancer Immunology, Immunotherapy (CII) (comprovante de submissão anexo III).

Correlação entre a concentração de melatonina e citocinas no muco cervical em amostras positivas para presença do Papilomavírus humano

Aron Carlos de Melo Cotrim¹, Eduardo Luzia França², Adenilda Cristina Honório França², Jordana Santos Martins², Katleyn Polizeli Galvão Silva², Mahmi Fujimori², Yehya Chakib Ghalfi², Izabela Trindade Machado², Inês Aparecida Tozetti¹

¹Instituto de Biociências / Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – Campo Grande – MS, Brasil;

²Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde / Universidade Federal de Mato Grosso – Barra do Garças – MT, Brazil;

Resumo

O Papilomavírus humano (HPV) é o principal agente causador do câncer de colo uterino, característico pelas lesões neoplásicas. De acordo com a morfologia das células da cérvix uterina os achados são classificados em negativas para lesão intraepitelial ou malignidade (NILM), lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL), lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL), células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC – US) e células escamosas atípicas de significado indeterminado sem exclusão de HSIL (ASC – H). A progressão das lesões neoplásicas está relacionada ao quadro inflamatório no microambiente do colo uterino e mediado pela expressão e estimulação de citocinas. A melatonina (MLT) é um neurohormônio responsável pela regulação do ciclo circadiano e de diversas funções fisiológicas e imunoimodulatórias como a expressão de citocinas para o controle do processo inflamatório. O muco cervical é uma secreção líquida viscosa, composta por proteínas, componentes inorgânicos e agentes pró e anti-inflamatórios sendo uma importante barreira protetora. O objetivo deste estudo foi quantificar e correlacionar a concentração das citocinas MLT, IL-6, IL-8 e IL-10 no muco cervical. De acordo com os resultados foi observado a diminuição da MLT nas amostras LSIL e HSIL em comparação com as NILM. As citocinas IL-6 e IL-8 apresentaram maior expressão nas amostras LSIL e HSIL em relação ao grupo NILM. As amostras HSIL apresentaram uma correlação negativa entre a concentração de MLT, IL-6 e IL-8. Sugerimos que os níveis de MLT, IL-6 e IL-8 em amostras HSIL, são decisivas para a progressão das lesões neoplásicas em infecções por HPV.

Palavras-chave: Citocinas, HPV, HSIL, melatonina, muco cervical

Introdução

O HPV é da família Papovaviridae sendo o principal agente etiológico do câncer cervical. São conhecidos cerca de 230 tipos de HPV, sendo que os tipos 6, 11, 42, 43 e 44 são relacionados as LSIL e os tipos 16, 18, 31, 33, 45 e 66 estão associados a HSIL [1, 2]. A infecção por HPV ocorre por contato direto com a partícula viral que adentra o epitélio até a camada das células basais do epitélio cervical. O potencial oncogênico do HPV está relacionado a genes pró-oncogênicos que promovem a síntese de proteínas (E2, E5, E6 e E7) e atuam na proliferação, diferenciação celular e inativação de genes supressores de tumores como p53 e pRB [3].

Alguns tipos de HPV de alto risco tem a capacidade de estimular a expressão de citocinas (IL-6, IL-8 e IL-10) que em conjunto com a infecção por HPV contribui para o aparecimento de lesões neoplásicas cervicais. A citocina IL-10 está ligada a indução de um microambiente imunossupressor favorável a proliferação viral [4, 5, 6].

A MLT ou N-acetil-5-metoxitriptamina é uma amina biogênica produzida e secretada principalmente pela glândula pineal com padrão de síntese estimulada a noite e inibida durante o dia, sendo responsável pelo ciclo circadiano. Outros tecidos como medula óssea, trato gastrointestinal, retina e vesícula biliar também produzem melatonina em menores concentrações [7].

As propriedades imunomodulatórias da melatonina estão relacionadas a expressão de algumas citocinas como IL-6 e IL-8 e IL-10 [4, 5, 6]. Estudos também tem demonstrado alterações na concentração sérica de melatonina e seus derivados em diferentes neoplasias como câncer de mama, colorretal, endometrial, pulmão, estômago [8, 9].

A MLT está presente no muco cervical, folículos pré-ovulatórios e gônadas e seus receptores foram (MT1 e MT2) presentes nos folículos ovarianos [8, 9, 10]. Embora, tenha sido constatada a presença da MLT nesses tecidos, sua origem ainda não foi totalmente esclarecida. A presença deste neurohormônio e de seus receptores no sistema reprodutor feminino sugerem uma ampla atuação deste hormônio tanto de regulação quanto de proteção.

O objetivo do estudo foi investigar a concentração de MLT e das citocinas IL-6, IL-8 e IL-10 e estabelecer a correlação entre essas variáveis em amostras de muco cervical de pacientes infectadas e não infectadas pelo HPV com exame citopatológico NILM, LSIL e HSIL.

Materiais e Métodos

Grupo amostral e colheita das amostras

O grupo amostral estudado foi composto de 41 mulheres entre 18 e 35 anos de idade, entre os dias 12º e 21º dia do ciclo menstrual, sem histórico de alterações na mucosa da cérvix uterina, e negativas para doenças como sífilis, AIDS, diabetes e câncer.

As amostras de muco cervical foram colhidas com uma escova endocervical com volume aproximado de 700µL e dividida em duas alíquotas. A primeira foi acondicionada em 1 mL de solução preservante e encaminhada para avaliação em citológica e detecção do DNA viral. A segunda alíquota foi em acondicionada em solução de tampão fosfato (PBS) centrifugada a 1200G por 20 minutos para remoção de células e material sólido e o sobrenadante caminhado para quantificação de melatonina e citocinas.

Detecção do DNA do HPV

A detecção o DNA viral foi realizado através do Cobas® HPV Test. (Cobas z 480®Analyzer - Roche). O teste permite a detecção de 14 tipos de HPV de alto risco e discrimina os tipos 16 e 18 utilizando a amplificação do DNA alvo pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e hibridação de ácido nucleico.

Análise Citologia

A análise citológica foi realizada em por meio da Citologia em Base Líquida (CBL) onde as amostras são acondicionadas em solução preservante Cell Preserv® e encaminhadas a um processador de lâminas Koloplast Cell Preserv® e confecção das lâminas em monocamada celular. Posteriormente as amostras são classificadas de acordo com os achados celulares em: negativas para lesão intraepitelial ou malignidade NILM, LSIL, HSIL, ASC – US e ASC – H.

Quantificação das citocinas no muco cervical

As citocinas IL-6, IL-8 e IL-10 foram quantificadas no muco cervical por citometria de fluxo (CB) através do BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammatory Cytokines Kit (BD Biociences®) sendo processadas de acordo com as instruções do fabricante. Um citômetro de fluxo foi utilizado para essas análises (FACSCalibur, BD Biosciences, EUA). Os gráficos de citometria foram gerados usando o software CellQuest (BD Biosciences, EUA), e os dados foram obtidos usando o software 1.0 FCAP Array (BD).

Quantificação da melatonina no muco cervical

A dosagem de melatonina foi realizada utilizando kit de imunoensaio enzimático para a determinação quantitativa de melatonina (Melatonin ELISA® - IBL). As leituras foram realizadas em uma leitora de microplacas TP - Reader ® (Thermo Plate) a 405 nm. A concentração do hormônio foi calculada em função da curva padrão e expresso em pg/mL.

Análise estatística

Os dados gerados foram submetidos a análise de variância (ANOVA), seguido de pós-teste de Tukey, análise de correlação por Spearman. Para análise estatística foi considerado significativo quando o valor de $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

Análise de CBL e detecção do DNA de HPV

De acordo com a análise em CBL, entre as 41 amostras de muco cervical colhidas, sete apresentaram NILM (Figura 1a), cinco foram classificadas como LSIL (Figura 1b), nove continham HSIL (Figura 1c) e 7 foram classificadas como ASC-US (Figura 1d) e ASC-H (Figura 1e), sendo estas descartadas do estudo. A figura 1f apresenta carcinoma invasivo.

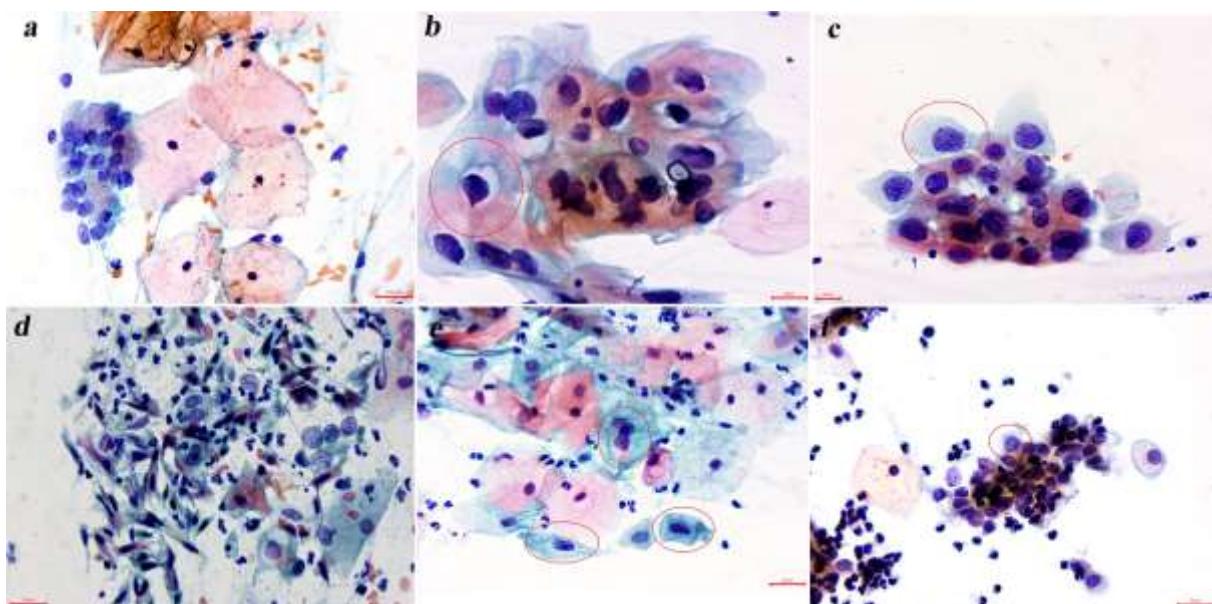


Fig. 1 Exame citopatológico obtido por CBL das amostras estudadas: NILM (a), LSIL (b), HSIL (c), ASC-US (d), ASC-H (e) e carcinoma invasivo (f). Os destaque referem-se aos achados histológicos.

No Cobas® HPV Test, utilizado para detecção do DNA todas as amostras NILM apresentaram negativas para presença do DNA de HPV. As amostras HSIL e LSIL apresentaram presença do DNA de HPV dos tipos 16 e 18.

Quantificação de MLT no muco cervical

As amostras NILM (grupo controle negativo) apresentou a concentração de melatonina de $13,77 \text{ pg.mL}^{-1}$, enquanto os grupos infectado LSIL e HSIL apresentaram $4,93$ e $5,75 \text{ pg.mL}^{-1}$ do hormônio, respectivamente. Estudos tem demonstrado a diferença da concentração do hormônio melatonina no muco cervical em amostras positivas e negativas para a presença do HPV [10]. Porém, na literatura científica não descreve a concentrações da melatonina de acordo com o tipo de lesão desenvolvida.

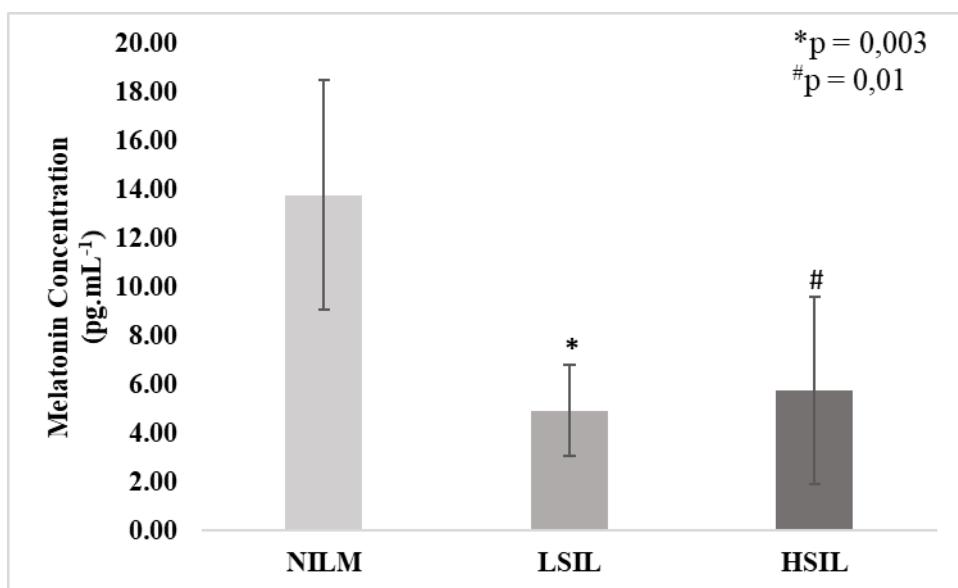


Fig. 2 Concentração de melatonina no muco cervical em amostras NILM, LSIL e HSIL. (*): diferença estatística significativa para p-valor < 0,05

A melatonina age no sistema reprodutor feminino sobre a função ovariana. Estudos já demonstraram a presença de receptores para melatonina do tipo MT1 e MT2 nos folículos ovarianos e no muco cervical [10, 11, 12], sugerindo assim uma ampla ação deste hormônio no aparelho reprodutor feminino.

Estudos têm demonstrado a diminuição da concentração de melatonina sérica em pacientes com câncer [8, 9]. Sugerimos que ocorra um comportamento semelhante nas neoplasias oriundas da infecção pelo HPV, pois a maior concentração de melatonina nas amostras NILM e a menor concentração do nas amostras LSIL e HSIL sugerem uma relação entre o hormônio e o desenvolvimento progressão das lesões.

Quantificação de citocinas no muco cervical

A quantificação de citocinas inflamatórias no muco cervical por CF, apresentou uma diferença significativa na expressão de IL-6 no grupo HSIL em relação ao grupo controlo e ao grupo LSIL (Figura 3). Estudos têm demonstrado o aumento na expressão de IL-6 em infecções por HPV e câncer cervical, sendo ela relacionadas a gravidade

e intensidade das lesões neoplásicas [13]. Os resultados obtidos para a citocina IL-6 corroboram os estudos que descreveram a maior expressão desta para grupos LSIL e HSIL em comparação com grupo NILM [5], embora esta diferença não tenha sido observada para o grupo LSIL no presente estudo. A menor expressão desta citocina nas amostras NILM e LSIL em comparação com as HSIL reforçam a relação dela com a gravidade, intensidade das lesões e progressão neoplásica.

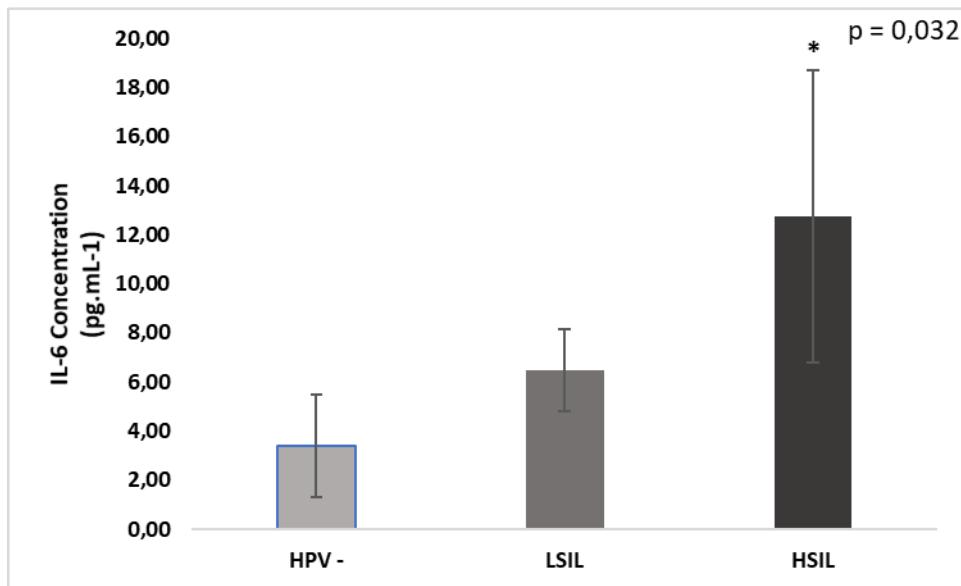


Fig.3 Concentração de citocinas IL-6 no muco cervical amostras NILM, HSIL e LSIL. (*): diferença estatística significativa para p-valor < 0,05.

Foi observado também o aumento da expressão da citocina IL-8 nos grupos HSIL e LSIL em comparação ao grupo controle (Figura 4). Os níveis de IL-8 não variaram significativamente entre as amostras LSIL E HSIL. O aumento da expressão sérica de IL-8 em infecção por HPV já foi relatado em vários estudos [12]. Nas infecções por HPV a maior concentração de IL-8 nas amostras de soro e lavado cervical está relacionada a progressão das lesões neoplásicas, a características angiogênicas e metastáticas dos tumores e ao processo de sinalização das angiogênese tumoral via PI3K/Akt [13, 15, 16]. Estudos relataram que células positivas para HPV são capazes de induzir a expressão pró-angiogênica de IL-8 promovendo o crescimento e a invasão de tumores em células endoteliais da veia umbilical humana [6]. Assim o aumento da expressão de IL-8 em células infectadas pelo HPV está relacionado a progressão e crescimento tumoral, justificando assim a maior ocorrência nas amostras HSIL.

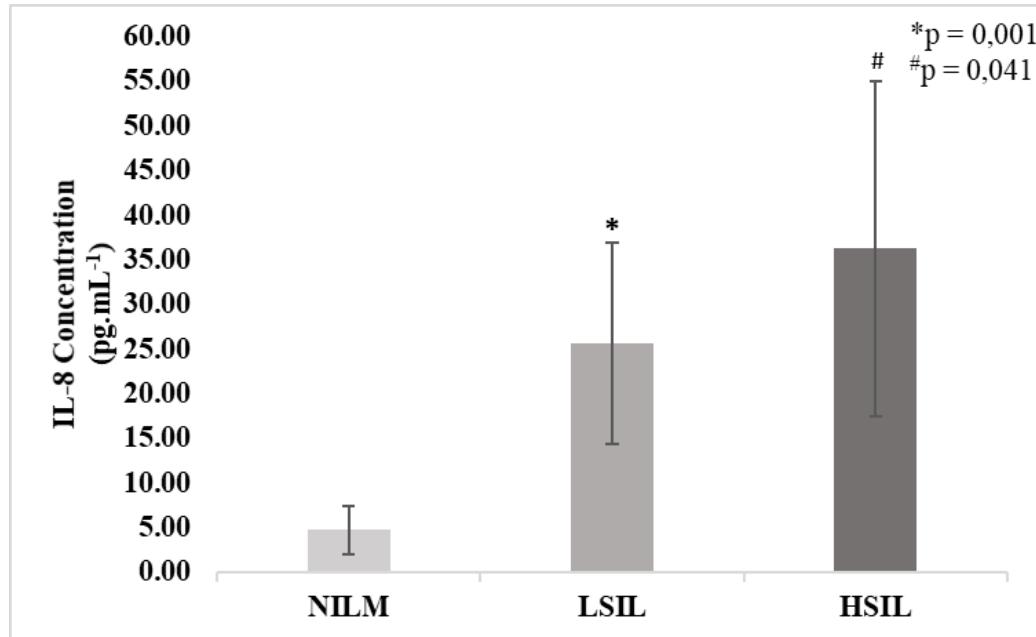


Fig.4 Concentração de citocinas IL-8 no muco cervical amostras NILM, HSIL e LSIL. (*): diferença estatística significativa para p-valor < 0,05.

Não foi observado diferença significativa na expressão da citocina IL-10 nas amostras LSIL, HSIL em relação ao grupo controle (Figura 5). Assim com a IL-6 a IL-10 esta citocina está relacionada a progressão e intensidade das lesões neoplásicas, sendo ela um marcador importante [13]. A ausência desta citocinas nas amostras estudadas pode estar relacionada a precocidade das lesões e ao não histórico de câncer cervical do grupo amostral.

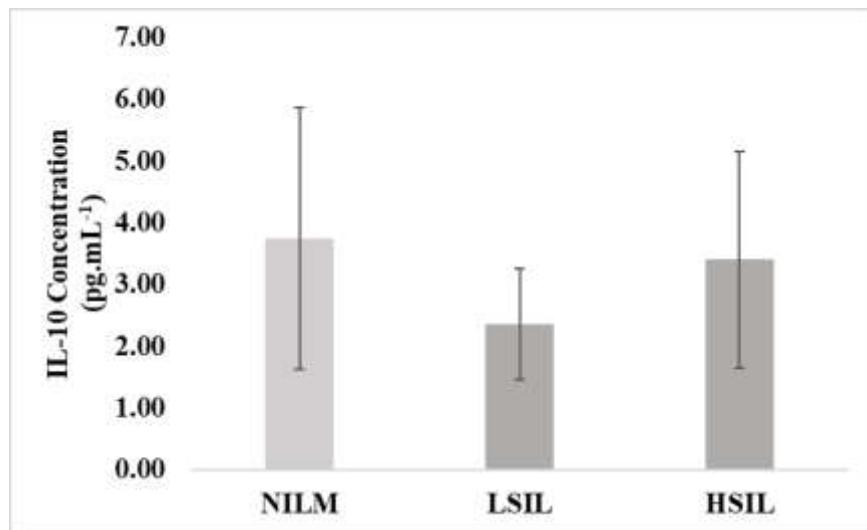


Fig.5 Concentração de citocinas IL-10 no muco cervical amostras NILM, HSIL e LSIL. (*): diferença estatística significativa para p-valor < 0,05.

Correlação entre a concentração de melatonina e citocinas no muco cervical

Como demonstrado nos resultados o aumento na expressão das citocinas IL-6 e IL8 contrasta com a diminuição da concentração de melatonina no muco cervical nas amostras LSIL e HSIL. Porém, apenas as amostras HSIL apresentou correlação negativa confirmada entre as variáveis pelo teste de correlação de Spearman (Tabela 1).

Tab. 1 Teste de correlação de Spearman entre a concentração e melatonina e a expressão de citocinas IL-6 e IL-8 nas amostras LSIL e HSIL

Grupos e	r-valor	p-valor
LSIL (MLT e	-0,60	1,60
HSIL (MLT e	-0,80	0,01
HSIL (MLT e	-0,40	0,02

As amostras HSIL apresentaram correlação negativa entre a concentração de melatonina e a citocinas IL-6 e IL-8. Estudos já demonstraram que a melatonina modula a defesa inflamatória do organismo, diminuindo a produção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β , IL-6 e fator de necrose tumoral α (TNF α) [17, 18, 19]. Em fibroblastos da gengiva humana, a melatonina é capaz de inibir a expressão de IL-8 e IL-6, diminuindo a resposta inflamatória da mucosa bucal [20].

Sugerimos que no muco cervical ocorra um comportamento semelhante, onde o decréscimo da concentração de melatonina está diretamente relacionado ao aumento da expressão de IL-6 e IL-8 nas amostras LSIL e HSIL, contribuindo assim para o desenvolvimento das lesões e progressão tumoral.

Referências Bibliográficas

1. Munoz N, Castellsagué X, González AB, Gissmann L (2006) HPV in the etiology of human cancer. Vaccine 24: S1-S10. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.05.115>
2. Alves DB, Tozetti IA, Gatto FA, Cassandri F, Ferreira AMT, Ferreira CES, Abdo MAGS (2010) Linfócitos CD4, CD8 e células NK no estroma da cérvix uterina de mulheres infectadas pelo papilomavírus humano. Rev. Soc. Bras. Med. Trop 43:425-429. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822010000400018>
3. Stanley M (2010) Pathology and epidemiology of HPV infection in females. Gynecol Oncol 117: S5-S10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2010.01.024>

4. Prata TTM, Bonin CM, Ferreira AMT, Padovani CTJ, Fernandes CEDS, Machado AP, Tozetti IA (2015) Local immunosuppression induced by high viral load of human papillomavirus: characterization of cellular phenotypes producing interleukin-10 in cervical neoplastic lesions. *Immunol* 146:113-121. <https://doi.org/10.1111/imm.12487>
5. Li B, Zhang L, Zhao J, Tan G, Zhang W, Zhang N, Tian J, Qu P (2019) The value of cytokine levels in triage and risk prediction for women with persistent high-risk human papilloma virus infection of the cervix. *Infect. Agents Cancer* 16:1-12. <https://doi.org/10.1186/s13027-019-0231-z>
6. Romero MB, Ocejo LO (2000) Angiogenesis modulators expression in culture cell lines positives for HPV-16 oncoproteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 277: 55-61. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3628>
7. Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni GJM, Cardinali DP, Poeggeler B, Hardeland R (2006) Melatonin: nature's most versatile biological signal? *FEBS J.* 273: 2813-2838. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05322.x>
8. Vijayalaxmi TJr, CR, Reiter RJ, Herman TS (2002) Melatonin: from basic research to cancer treatment clinics. *J. clin. Oncol* 20: 2575-2601. <https://doi.org/10.1200/JCO.2002.11.004>
9. Martínez-Campa C, Gonzalez A, Mediavilla MD, Alonso-Gonzalez C, Sanchez-Barcelo EJ, Cos S (2005) Melatonin enhances the inhibitory effect of aminoglutethimide on aromatase activity in MCF-7 human breast cancer cells. *Breast cancer res. Treat.* 94: 249-254. <https://doi.org/10.1007/s10549-005-9006-x>
10. Cotrim ACM, França EL, Honório-França AC, Martins JS, Silva KPG, Ghalfi YC, Machado IT, Tozetti, IA (2020) Effect of polyethylene glycol microspheres adsorbed with melatonin on oxidative stress and viscosity of cervical mucus samples infected with human papillomavirus. *BRIAC* 10: 6757-6772. <https://doi.org/10.33263/BRIAC106.67576772>
11. Masana MI, Soares JrJM, Dubocovich ML (2005) 17 β -estradiol modulates hMT1 melatonin receptor function. *Neuroendocrinol* 81: 87-95. <https://doi.org/10.1159/000084897>
12. Rönnberg L, Kauppila A, Leppäluoto J, Martikainen H, Vakkuri O (1990) Circadian and seasonal variation in human preovulatory follicular fluid melatonin concentration. *J. clin. endocrinol. Metab.* 71: 493-496. <https://doi.org/10.1210/jcem-71-2-493>
13. Tjiong MY, van der Vange N, ten Kate, FJ, Tjiong-A-Hung SP, Schegget J, Burger MP, Out TA (1999) Increased IL-6 and IL-8 levels in cervicovaginal secretions of

patients with cervical cancer. *Gynecol. Oncol.* 73: 284-291.
<https://doi.org/10.1006/gyno.1999.5358>

14. Marks MA, Viscidi RP, Chang K, Silver M, Burke A, Howard R, Gravitt PE (2011) Differences in the concentration and correlation of cervical immune markers among HPV positive and negative perimenopausal women. *Cytokine* 56: 798-803.
<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2011.09.012>

15. Shiau MY, Fan LC, Yang SC, Tsao CH, Lee H, Cheng YW, Lai LC, Chang YH (2013) Human Papillomavirus Up-Regulates MMP-2 and MMP-9 Expression and Activity by Inducing Interleukin-8 in Lung Adenocarcinomas. *Plos One* 8: 1-8.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054423>

16. Zhang E, Feng X, Liu F, Zhang P, Liang J, Tang X (2014) Roles of PI3K/Akt and c-Jun signaling pathways in human papillomavirus type 16 oncoprotein-induced HIF-1 α , VEGF, and IL-8 expression and in vitro angiogenesis in non-small cell lung cancer cells. *Plo One* 9: 1-13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103440>

17. Cutando A, Montero J, Gomez DR, Ferrera MJ, Lopez-Valverde A (2015) Effect of topical application of melatonin on serum levels of C-reactive protein (CRP), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in patients with type 1 or type 2 diabetes and periodontal disease. *J. Clin. Exp. Dente.* 7: e638-e633.
<http://dx.doi.org/10.4317/jced.52604>

18. Xu X, Wang G, Lingling Ai, Shi J, Zhang J, Chen YX (2018) Melatonin suppresses TLR9-triggered proinflammatory cytokine production in macrophages by inhibiting ERK1/2 and AKT activation. *Sci Rep.* 8: 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34011-8>

19. Choi EY, Jin JY, Lee JY, Choi JI, Choi IS, Kim SJ (2011) Melatonin inhibits *Prevotella intermedia* lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide and interleukin-6 in murine macrophages by suppressing NF- κ B and STAT1 activity. *J Pineal Res.* 50: 197-206. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2010.00829.x>

20. Zhou W, Zhang X, Zhu CL, He ZY, Liang JP, Song ZC (2016) Melatonin Receptor Agonists as the “Perioceutics” Agents for Periodontal Disease through Modulation of *Porphyromonas gingivalis* Virulence and Inflammatory Response. *PLOS ONE* 11:1-20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166442>

4. CONCLUSÕES

De acordo com os objetivos propostos e os resultados obtidos neste trabalho foi possível concluir que:

- ✓ Foi constatado a presença do hormônio melatonina no muco cervical em concentrações mensuráveis;
- ✓ A concentração da melatonina é diminuída no muco cervical nas amostras de pacientes infectadas pelo HPV, não diferindo entre os grupos LSIL e HSIL;
- ✓ As amostras de pacientes infectadas pelo HPV apresentam redução na atividade da CuZn-SOD;
- ✓ As amostras de pacientes infectadas pelo HPV apresentam aumento da concentração de ânion radical superóxido em relação as pacientes não infectadas;
- ✓ A microesferas de PEG-MLT foram eficientes no aumento da atividade da enzima CuZN-SOD nas amostras de pacientes infectadas pelo HPV;
- ✓ A microesferas de PEG-MLT foram eficientes na redução da concentração do ânion radical superóxido nas amostras de pacientes infectadas pelo HPV;
- ✓ O OxSI foi eficiente na avaliação do comprometimento das funções antioxidantes geradas na infecção pelo HPV em comparação com o grupo de pacientes não infectados, onde o menor valor de OxSI entre as amostras sugere um desequilíbrio nos mecanismos antioxidantes investigados;
- ✓ As amostras de pacientes positivas para a presença do HPV apresentaram um quadro de estresse oxidativo em relação as amostras de pacientes negativas de acordo com o valor de OxSI;
- ✓ A melatonina apresenta uma correlação inversamente proporcional a concentração do ânion radical superóxido;
- ✓ A melatonina apresenta uma correlação diretamente proporcional a atividade da enzima CuZn-SOD;
- ✓ O OxSI está diretamente correlacionado a concentração de melatonina, sendo que à medida que se eleva a concentração de melatonina ocorre também o aumento do OxSI.
- ✓ A PEG-MLT foi eficiente na redução do estresse oxidativo através do aumento da atividade da SOD e da diminuição da concentração do ânion superóxido;
- ✓ As amostras HSIL apresentam maior expressão de citocina IL-6 em relação as amostras NILM;

- ✓ As amostras HSIL e LSIL apresentaram aumento da expressão da citocina IL-8 em relação as amostras NILM;
- ✓ A citocina IL-8 apresenta maior expressão nas amostras HSIL em relação a LSIL;
- ✓ Os resultados sugerem uma correlação inversa entre a concentração e melatonina e as citocinas IL-6 e IL-8 nas amostras de pacientes que apresentaram HSIL;
- ✓ A melatonina apresenta uma correlação diretamente proporcional a viscosidade do muco cervical;
- ✓ Nas Infecções por HPV ocorre a diminuição da viscosidade do muco cervical;
- ✓ A MLT e a PEG-MLT foram eficientes na restauração dos padrões de viscosidade do muco cervical nas amostras de pacientes infectadas pelo HPV;

O estresse oxidativo e as alterações de viscosidade do muco cervical podem proporcionar as condições favoráveis para o desenvolvimento das lesões neoplásicas. Assim, melatonina associada a um moderno sistema de liberação, como a microesfera de PEG, pode potencializar seus efeitos moduladores sobre os mecanismos antioxidantes e de viscosidade do muco cervical, diminuindo o estresse oxidativo e restaurando a barreira protetora proporcionada pelo muco cervical.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ODEBLAD, Erik. The functional structure of human cervical mucus. **Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica**, v. 47, n. sup1, p. 57-79, 1968.
2. SALTZMAN, W. Mark et al. Antibody diffusion in human cervical mucus. **Biophysical journal**, v. 66, n. 2, p. 508-515, 1994. [http://10.1016/s0006-3495\(94\)80802-1](http://10.1016/s0006-3495(94)80802-1)
3. WOLF, Don P. Composition and function of human cervical mucus. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 630, n. 4, p. 545-558, 1980. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(80\)90009-4](https://doi.org/10.1016/0304-4165(80)90009-4)
4. OTANI, Sayaka et al. Cytokine expression profiles in cervical mucus from patients with cervical cancer and its precursor lesions. **Cytokine**, v. 120, p. 210-219, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.05.011>
5. BLASKEWICZ, Caitlin D.; PUDNEY, Jeffrey; ANDERSON, Deborah J. Structure and function of intercellular junctions in human cervical and vaginal mucosal epithelia. **Biology of reproduction**, v. 85, n. 1, p. 97-104, 2011. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.090423>
6. DOORBAR, John. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. **Clinical science**, v. 110, n. 5, p. 525-541, 2006. <https://doi.org/10.1042/CS20050369>
7. ALVES, Daniella Borges et al. Linfócitos CD4, CD8 e células NK no estroma da cérvix uterina de mulheres infectadas pelo papilomavírus humano. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 4, p. 425-429, 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822010000400018>
8. GRAHAM, Sheila V. The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review. **Clinical science**, v. 131, n. 17, p. 2201-2221, 2017. <https://doi.org/10.1042/CS20160786>
9. GRAVITT, Patti E.; WINER, Rachel L. Natural history of HPV infection across the lifespan: role of viral latency. **Viruses**, v. 9, n. 10, p. 267, 2017. <https://doi.org/10.3390/v9100267>
10. PRATA, Thiago Theodoro Martins et al. Local immunosuppression induced by high viral load of human papillomavirus: characterization of cellular phenotypes producing interleukin-10 in cervical neoplastic lesions. **Immunology**, v. 146, n. 1, p. 113-121, 2015. <https://doi.org/10.1111/imm.12487>
11. KOBAYASHI, A. et al. Evolving immunosuppressive microenvironment during human cervical carcinogenesis. **Mucosal immunology**, v. 1, n. 5, p. 412-420, 2008. <https://doi.org/10.1038/mi.2008.33>
12. MUÑOZ, Nubia et al. HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine**, v. 24, p. S1-S10, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.05.115>
13. STANLEY, Margaret. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. **Gynecologic oncology**, v. 117, n. 2, p. S5-S10, 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2010.01.024>

14. BURD, Eileen M.; DEAN, Christina L. Human papillomavirus. **Diagnostic Microbiology of the Immunocompromised Host**, p. 177-195, 2016.
<http://10.1128/microbiolspec.DMIH2-0001-2015>
15. SHANMUGASUNDARAM, Srinidhi; YOU, Jianxin. Targeting persistent human papillomavirus infection. **Viruses**, v. 9, n. 8, p. 229, 2017.
<https://doi.org/10.3390/v9080229>
16. LI, Tian et al. Exogenous melatonin as a treatment for secondary sleep disorders: A systematic review and meta-analysis. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 52, p. 22-28, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2018.06.004>
17. DE LOURDES MORA-GARCÍA, María et al. HPV-16 infection is associated with a high content of CD39 and CD73 ectonucleotidases in cervical samples from patients with CIN-1. **Mediators of inflammation**, v. 2019, 2019.
<https://doi.org/10.1155/2019/4651627>
18. WOODMAN, Ciaran BJ; COLLINS, Stuart I.; YOUNG, Lawrence S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 1, p. 11-22, 2007. <https://doi.org/10.1038/nrc2050>
19. VIRUS, Human Papilloma. A correlação do câncer do colo uterino com o Papilomavírus Humano. **Revista APS**, v. 9, n. 2, p. 128-135, 2006.
20. LETO, Maria das Graças Pereira et al. Infecção pelo papilomavírus humano: etiopatogenia, biologia molecular e manifestações clínicas. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 2, p. 306-317, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0365-05962011000200014>
21. ALMEIDA, Ana Paula Machado de et al. Infecção por múltiplos tipos de Papilomavírus humano em mulheres jovens sexualmente ativas. **Medicina (Ribeirão Preto)**, p. 573-579, 2015.
22. ALVARENGA, Gabriel C. et al. Papilomavírus humano e carcinogênese no colo do útero. **J bras doenças sex transm**, v. 12, n. 1, p. 28-38, 2000.
23. RIVOIRE, Waldemar Augusto et al. Biologia molecular do câncer cervical. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 6, n. 4, p. 447-451, 2006.
<https://doi.org/10.1590/S1519-38292006000400012>
24. NAKAGAWA, Janete Tamani Tomiyoshi; SCHIRMER, Janine; BARBIERI, Márcia. Virus HPV y el cáncer del cuello uterino. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 63, n. 2, p. 307-311, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0034-71672010000200021>
25. FRANÇA, Eduardo Luzía et al. Effects of Momordica charantia L. on the blood rheological properties in diabetic patients. **BioMed research international**, v. 2014, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/840379>
26. FERNANDES, R. T. S. et al. Nanodoses of melatonin induces apoptosis on human breast cancer cells co-cultured with colostrum cells. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 9, n. 5, p. 4416-4423, 2019.
<https://doi.org/10.33263/BRIAC95.416423>
27. LI, Tian et al. Exogenous melatonin as a treatment for secondary sleep disorders: A systematic review and meta-analysis. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 52, p. 22-28, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2018.06.004>

- 28SHAFABAKHSH, Rana et al. Melatonin: a new inhibitor agent for cervical cancer treatment. **Journal of cellular physiology**, v. 234, n. 12, p. 21670-21682, 2019. <https://doi.org/10.1002/jcp.28865>
29. KOCH, Birgit CP et al. Circadian sleep–wake rhythm disturbances in end-stage renal disease. **Nature Reviews Nephrology**, v. 5, n. 7, p. 407, 2009. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2009.88>
30. PANDI-PERUMAL, Seithikurippu Ratnas et al. Melatonin: nature's most versatile biological signal?. **The FEBS journal**, v. 273, n. 13, p. 2813-2838, 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05322.x>
31. REMY, Philippe et al. Depression in Parkinson's disease: loss of dopamine and noradrenaline innervation in the limbic system. **Brain**, v. 128, n. 6, p. 1314-1322, 2005. <https://doi.org/10.1093/brain/awh445>
32. REITER, Russel J.; SHARMA, Ramaswamy; MA, Qiang. Switching Diseased Cells from Cytosolic Aerobic Glycolysis to Mitochondrial Oxidative Phosphorylation: A Metabolic Rhythm Regulated by Melatonin?. **Journal of Pineal Research**, p. e12677, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03438-1>
33. CARLONI, Silvia et al. Melatonin protects from the long-term consequences of a neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats. **Journal of pineal research**, v. 44, n. 2, p. 157-164, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2007.00503.x>
34. GITTO, Eloisa et al. Oxidative and inflammatory parameters in respiratory distress syndrome of preterm newborns: beneficial effects of melatonin. **American journal of perinatology**, v. 21, n. 04, p. 209-216, 2004. <http://10.1055/s-2004-828610>
35. OLEGÁRIO, Janaína Grazielle Pacheco et al. Pulmonary innate immune response and melatonin receptors in the perinatal stress. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2013, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/340959>
36. SAMANTA, Saptadip. Melatonin: an endogenous miraculous indolamine, fights against cancer progression. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, p. 1-30, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00432-020-03292-w>
37. MAESTRONI, Georges JM. The immunotherapeutic potential of melatonin. **Expert opinion on investigational drugs**, v. 10, n. 3, p. 467-476, 2001. <https://doi.org/10.1517/13543784.10.3.467>
38. BARTSCH, Christian et al. Depression of serum melatonin in patients with primary breast cancer is not due to an increased peripheral metabolism. **Cancer**, v. 67, n. 6, p. 1681-1684, 1991. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19910315\)67:6<1681::AID-CNCR2820670634>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19910315)67:6<1681::AID-CNCR2820670634>3.0.CO;2-0)
39. BARTSCH, Christian et al. Melatonin and 6-sulfatoxymelatonin circadian rhythms in serum and urine of primary prostate cancer patients: evidence for reduced pineal activity and relevance of urinary determinations. **Clinica Chimica Acta**, v. 209, n. 3, p. 153-167, 1992. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(92\)90164-L](https://doi.org/10.1016/0009-8981(92)90164-L)
40. KARASEK, Michal; KOWALSKI, Andrzej J.; ZYLINSKA, Krystyna. Serum melatonin circadian profile in women suffering from the genital tract cancers. **Neuroendocrinology Letters**, v. 21, n. 2, p. 109-114, 2000.

41. KHOORY, Roderich; STEMME, Dietmar. Plasma melatonin levels in patients suffering from colorectal carcinoma. **Journal of pineal research**, v. 5, n. 3, p. 251-258, 1988. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.1988.tb00651.x>
42. NETO, Júlio Anselmo Sousa; CASTRO, Bruno Freire de. Melatonina, ritmos biológicos e sono-uma revisão da literatura. **Rev Bras Neurol**, v. 44, n. 1, p. 5-11, 2008.
43. PIN, G. et al. Puesta al día en las aplicaciones de la melatonina+ triptófano+ vitamina B6 en Pediatría. **PediatrálIntegral**, p. 290.
44. SILVA, José Nivaldo da et al. Immunohaematological and rheological parameters in canine visceral leishmaniasis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 27, n. 2, p. 211-217, 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/s1984-296120180021>
45. ALVES, Rosana S. Cardoso et al. A melatonina e o sono em crianças. **Pediatria (São Paulo)**, v. 20, n. 2, p. 99-105, 1998.
46. XU, Xiongfei et al. Melatonin suppresses TLR9-triggered proinflammatory cytokine production in macrophages by inhibiting ERK1/2 and AKT activation. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34011-8>
47. SALVADOR, MIRIAM; HENRIQUES, JOAO ANTONIO PEGAS. **Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo**. Editora da ULBRA, 2004.
48. NETO, J. A. S, De castro, B. F. Melatonina, ritmos biológicos e sono-uma revisão da literatura. Revista brasileira Neurologia e psiquiatria 2008; v. 44 (1): 5-11.
49. FRANÇA, Eduardo Luzia et al. Modulatory role of melatonin on superoxide release by spleen macrophages isolated from alloxan-induced diabetic rats. **Bratisl Lek Listy**, v. 110, n. 9, p. 517-22, 2009.
50. SEABRA, Aletéia Marieta da Silva et al. Efeito da melatonina sobre a migração de leucócitos, produção de óxido nítrico, citocinas e substâncias oxidantes na endotoxemia. 2012..
51. RIBEIRO, Aliny AL et al. Herbal mixture adsorbed to polyethylene glycol microspheres induces apoptotic effects on breast cancer cells. **Current drug delivery**, v. 15, n. 2, p. 227-234, 2018. <https://doi.org/10.2174/1567201814666171002141430>
52. REITER, Russell J. et al. Medical implications of melatonin: receptor-mediated and receptor-independent actions. **Advances in Medical Sciences (De Gruyter Open)**, v. 52, 2007.
53. SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, Ana M. et al. Intracellular redox state as determinant for melatonin antiproliferative vs cytotoxic effects in cancer cells. **Free radical research**, v. 45, n. 11-12, p. 1333-1341, 2011. <https://doi.org/10.3109/10715762.2011.62370033>
54. SANDYK, Reuven; KAY, Stanley R. Pineal melatonin in schizophrenia: a review and hypothesis. **Schizophrenia bulletin**, v. 16, n. 4, p. 653-662, 1990. <https://doi.org/10.1093/schbul/16.4.653>
55. MORVARIDZADEH, Mojgan et al. Effect of melatonin supplementation on oxidative stress parameters: A systematic review and meta-analysis. **Pharmacological Research**, p. 105210, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105210>

56. REITER, Russel J. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. **Experientia**, v. 49, n. 8, p. 654-664, 1993. <https://doi.org/10.1007/BF01923947>
57. RODRIGUEZ, A. B. et al. Correlation between the circadian rhythm of melatonin, phagocytosis, and superoxide anion levels in ring dove heterophils. **Journal of pineal research**, v. 26, n. 1, p. 35-42, 1999. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.1999.tb00564.x>
58. KLEPAC, Nataša; RUDEŠ, Zoran; KLEPAC, Ratimir. Effects of melatonin on plasma oxidative stress in rats with streptozotocin induced diabetes. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 60, n. 1, p. 32-35, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2005.08.005>
59. SUDNIKOVICH, Elena Ju et al. Melatonin attenuates metabolic disorders due to streptozotocin-induced diabetes in rats. **European Journal of pharmacology**, v. 569, n. 3, p. 180-187, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.05.018>
60. LIN, Xiang et al. Excessive oxidative stress in cumulus granulosa cells induced cell senescence contributes to endometriosis-associated infertility. **Redox biology**, v. 30, p. 101431, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101431>
61. BIANCHI, Maria de Lourdes Pires; ANTUNES, Lusânia Maria Greggi. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev Nutr**, v. 12, n. 2, p. 123-30, 1999. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-5273199900020000>
62. PRASAD, Ananda S. et al. Zinc supplementation decreases incidence of infections in the elderly: effect of zinc on generation of cytokines and oxidative stress. **The American journal of clinical nutrition**, v. 85, n. 3, p. 837-844, 2007. <https://doi.org/10.1093/ajcn/85.3.837>
- 63 GUILLAUMET-ADKINS, Amy et al. Epigenetics and oxidative stress in aging. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2017, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/9175806>
64. BARBOSA, Kiriaque Barra Ferreira et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013>
65. DE MARCO, Federico. Oxidative stress and HPV carcinogenesis. **Viruses**, v. 5, n. 2, p. 708-731, 2013. <https://doi.org/10.3390/v5020708>
66. KOLANJIAPPAN, K.; MANOHARAN, S.; KAYALVIZHI, M. Measurement of erythrocyte lipids, lipid peroxidation, antioxidants and osmotic fragility in cervical cancer patients. **Clinica Chimica Acta**, v. 326, n. 1-2, p. 143-149, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(02\)00300-5](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(02)00300-5)
67. MANJU, V.; SAILAJA, J. Kalaivani; NALINI, N. Circulating lipid peroxidation and antioxidant status in cervical cancer patients: a case-control study. **Clinical Biochemistry**, v. 35, n. 8, p. 621-625, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0009-9120\(02\)00376-4](https://doi.org/10.1016/S0009-9120(02)00376-4)
68. MANOHARAN, S. et al. Lipid peroxidation and antioxidant status in cervical cancer patients. **Journal of biochemistry, molecular biology, and biophysics: JBMBB: the official journal of the Federation of Asian and Oceanian Biochemists and**

Molecular Biologists (FAOBMB), v. 6, n. 3, p. 225, 2002.

<https://doi.org/10.1080/10258140290018685>

69. MANOHARAN, SHANMUGAM; KOLANJIAPPAN, KALIYAPERUMAL; KAYALVIZHI, MUTHUKUMAR. Enhanced lipid peroxidation and impaired enzymic antioxidant activities in the erythrocytes of patients with cervical carcinoma. **Cell Mol Biol Lett**, v. 9, n. 4A, p. 699-707, 2004.
70. SRIVASTAVA, S. et al. Lipid peroxidation and antioxidants in different stages of cervical cancer: Prognostic significance. **Indian journal of cancer**, v. 46, n. 4, p. 297, 2009. <https://doi.org/10.4103/0019-509x.55549>
71. WILLIAMS, Vonetta M. et al. HPV-DNA integration and carcinogenesis: putative roles for inflammation and oxidative stress. **Future virology**, v. 6, n. 1, p. 45-57, 2011. <https://doi.org/10.2217/fvl.10.73>
72. REITER, Russel J.; TAN, Dun-Xian; MALDONADO, Maria D. Melatonin as an antioxidant: physiology versus pharmacology. **Journal of pineal research**, v. 39, n. 2, p. 215-216, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079x.2005.00261.x>
73. DE MELO COTRIM, Aron Carlos; HONORIO-FRANCA, Adenilda Cristina; LUZIA FRANÇA, Eduardo. Rheology analysis can be added in thermal stability test for design microemulsion materials. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 6, n. 2, 2016.
74. DA SILVA, Fabiana Helen et al. Effects of barium chloride adsorbed to polyethylene glycol (PEG) microspheres on co-culture of human blood mononuclear cell and breast cancer cell lines (MCF-7). **Immunopharmacology and immunotoxicology**, v. 40, n. 1, p. 18-24, 2018. <https://doi.org/10.1080/08923973.2017.1392563>
75. RIBEIRO, Elton Brito et al. Microemulsions with levamisole delivery systems as novel immunomodulating agents with potential for amebiasis therapies. **Science of Advanced Materials**, v. 7, n. 1, p. 15-27, 2015.
<https://doi.org/10.1166/sam.2015.2003>
76. BURRUANO, Bríd T.; SCHNAARE, Roger L.; MALAMUD, Daniel. Synthetic cervical mucus formulation. **Contraception**, v. 66, n. 2, p. 137-140, 2002.
[http://10.1016/s0010-7824\(02\)00336-0](http://10.1016/s0010-7824(02)00336-0)
77. KARNI, Zvi et al. Newtonian viscosity of the human cervical mucus during the menstrual cycle. **International journal of fertility**, v. 16, n. 4, p. 185, 1971.
78. SILVA, José Nivaldo da et al. Immunohaematological and rheological parameters in canine visceral leishmaniasis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 27, n. 2, p. 211-217, 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/s1984-296120180021>
79. FREDULIN SCHERER, Edson et al. Immunomodulatory effects of poly (ethylene glycol) microspheres adsorbed with nanofractions of Momordica charantia L. on diabetic human blood phagocytes. **Science of Advanced Materials**, v. 3, n. 5, p. 687-694, 2011. <https://doi.org/10.1166/sam.2011.1236>
80. KIRKMAN-BROWN, Jackson C.; SMITH, David J. Sperm motility: is viscosity fundamental to progress? **MHR: Basic science of reproductive medicine**, v. 17, n. 8, p. 539-544, 2011. <https://doi.org/10.1093/molehr/gar043>

81. GUIMARÃES, Paulo Celso Leventi et al. Polyethyleneglycol nanoparticles adsorbed to glycine as a bioengineered neomaterial for application in inflammatory processes. **International Journal of Advanced Engineering Research and Science**, v. 5, n. 6. <https://dx.doi.org/10.22161/ijaers.5.6.3>
82. CÔRTES, Mayra Aparecida et al. Imunomodulação de fagócitos do sangue humano pelo extrato de Strychnos Pseudoquina ST. HILL adsorvido em microesferas de polietilenoglicol. **Polímeros**, v. 23, n. 3, p. 402-409, 2013.
<https://doi.org/10.1080/08923973.2017.1392563>
83. STANCZUK, Grazyna A. et al. Cancer of the uterine cervix may be significantly associated with a gene polymorphism coding for increased IL-10 production. **International Journal of Cancer**, v. 94, n. 6, p. 792-794, 2001.
<https://doi.org/10.1002/ijc.1543>
84. M EL-SHERIF, Amira et al. Quantitative analysis of IL-10 and IFN-γ mRNA levels in normal cervix and human papillomavirus type 16 associated cervical precancer. **The Journal of pathology**, v. 195, n. 2, p. 179-185, 2001. <https://doi.org/10.1002/path.929>
85. BERMUDEZ-MORALES, Victor H. et al. Correlation between IL-10 gene expression and HPV infection in cervical cancer: a mechanism for immune response escape. **Cancer investigation**, v. 26, n. 10, p. 1037-1043, 2008.
<https://doi.org/10.1080/07357900802112693>
86. DALTOÉ, Renata Dalmaschio et al. O papel paradoxal do sistema imune no câncer de ovário. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v. 39, n. 2, p. 87-92, 2010.
87. BARBISAN, Gisela et al. TNF-α and IL-10 promoter polymorphisms, HPV infection, and cervical cancer risk. **Tumor Biology**, v. 33, n. 5, p. 1549-1556, 2012.
<https://doi.org/10.1007/s13277-012-0408-1>
88. TORRES-POVEDA, Kirvis et al. Role of IL-10 and TGF-β1 in local immunosuppression in HPV-associated cervical neoplasia. **World journal of clinical oncology**, v. 5, n. 4, p. 753, 2014. <https://dx.doi.org/10.5306%2Fwjco.v5.i4.753>
89. KIMURA, Akihiro; KISHIMOTO, Tadamitsu. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. **European journal of immunology**, v. 40, n. 7, p. 1830-1835, 2010.
<https://doi.org/10.1002/eji.201040391>
90. TJIONG, Ming Y. et al. Increased IL-6 and IL-8 levels in cervicovaginal secretions of patients with cervical cancer. **Gynecologic oncology**, v. 73, n. 2, p. 285-291, 1999.
<https://doi.org/10.1006/gyno.1999.5358>
91. LI, Bohan et al. The value of cytokine levels in triage and risk prediction for women with persistent high-risk human papilloma virus infection of the cervix. **Infectious agents and cancer**, v. 14, n. 1, p. 16, 2019. <https://doi.org/10.1186/s13027-019-0231-z>
92. ZARIFFARD, M. Reza et al. Cleavage/alteration of interleukin-8 by matrix metalloproteinase-9 in the female lower genital tract. **PLoS one**, v. 10, n. 1, p. e0116911, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116911>
93. SHIAU, Ming-Yuh et al. Human papillomavirus up-regulates MMP-2 and MMP-9 expression and activity by inducing interleukin-8 in lung adenocarcinomas. **PLoS one**, v. 8, n. 1, p. e54423, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054423>

94. REINAQUE, Ana Paula Barcelos et al. Natural material adsorbed onto a polymer to enhance immune function. **Drug design, development and therapy**, v. 6, p. 209, 2012. <http://10.2147/DDDT.S34622>
95. FAGUNDES, Danny Laura Gomes et al. Immunomodulatory effects of poly (ethylene glycol) microspheres adsorbed with cortisol on activity of colostrum phagocytes. **Int J Pharmacol**, v. 8, p. 510-518, 2012. <http://10.3923/ijp.2012>
96. GUIMARÃES, Paulo Celso Leventi et al. Modulation of human colostrum phagocyte activity by the glycine-adsorbed polyethylene glycol microspheres. **Journal of chemistry**, v. 2013, 2013. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/845270>
- 97 HARA, Cristiane de Castro Pernet et al. Melatonin nanoparticles adsorbed to polyethylene glycol microspheres as activators of human colostrum macrophages. **Journal of Nanomaterials**, v. 2013, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/973179>
98. DA SILVA FERNANDES, Rubian Trindade et al. Melatonin bioengineered: A New Possible Strategy for Treatment of Breast Cancer. **International Journal of Advanced Engineering Research and Science**, v. 5, n. 10. <http://10.22161/ijaers.5.10.2>
99. YU, Deshan et al. Antitumor activity of poly (ethylene glycol)-camptothecin conjugate: The inhibition of tumor growth in vivo. **Journal of Controlled Release**, v. 110, n. 1, p. 90-102, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.09.050>

ANEXOS

ANEXO I

**UFMT - UNIVERSIDADE
FEDERAL DE MATO GROSSO - CAMPUS DO ARAGUAIA**


PARECER CONSUSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito imunomodulatório da melatonina sobre a produção de citocinas e comportamento reológico do muco cervical em amostras positiva para HPV

Pesquisador: ARON CARLOS DE MELO COTRIM

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 89628218.0.0000 5587

Instituição Proponente: Universidade Federal de Mato Grosso

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.757.302

Apresentação do Projeto:

O projeto está bem apresentado

Objetivo da Pesquisa:

O Objetivo Primário deste projeto é: Avaliar o efeito imunomodulador da melatonina sobre a produção de citocinas e correlacioná-lo ao comportamento reológico do muco cervical em mulheres com e sem o HPV.

Objetivo Secundário:

Quantificar a produção de citocinas no muco cervical na presença de melatonina em mulheres saudáveis e em portadoras de HPV de alto risco; Verificar a ocorrência de ativação celular na presença de melatonina através das dosagens de liberação de Ca²⁺ intracelular, liberação de ânion superóxido e ativação da enzima superóxido dismutase (SOD); Caracterizar o comportamento reológico do muco cervical através dos ensaios de viscosidade aparente, curva de fluxo, área de histerese e rampa de temperatura; Avaliar o efeito modulador da melatonina sobre o comportamento reológico do muco cervical; Correlacionar o comportamento reológico do muco cervical de mulheres negativas e positivas para o HPV; Correlacionar a produção de citocinas com a viscosidade e a área de histerese; Avaliar a complementação da melatonina em cultura de células HeLa;

[Assinatura]
Endereço: Rod. MT100 Km 3,5-ICBS

Bairro: Campus do Araguaia

CEP: 78.698-000

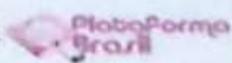
UF: MT

Município: PONTAL DO ARAGUAIA

Telefone: (65)3402-1121

E-mail: professoraramelyaguaria@gmail.com

UFMT - UNIVERSIDADE
FEDERAL DE MATO GROSSO -
CAMPUS DO ARAGUAIA



Continuação da Página: 2 757 302

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo o pesquisador: "Os riscos envolvidos no presente estudo estão relacionados a contaminação durante o procedimento de coleta do material e processamento da amostra. Porém, os problemas relacionados a tais etapas serão minimizados, pois as coletas clínicas serão efetuadas por profissionais qualificados e aproveitamento da demanda normal de exames dos laboratório e clínicas conveniadas. O laboratório onde serão efetuadas as análises moleculares e citiológica conta com estrutura apropriada e pessoal treinado."

O Benefício relatado é a produção de conhecimento científico relacionado aos mecanismos da patologia estudada, formas de terapias mais eficientes, epidemiologia da doença e diagnóstico e o incentivo a prática do exame ginecológico preventivo. O estudo ainda fornece dados importantes aos participantes como a tipagem viral.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Sendo o papilomavírus humano (HPV) o principal agente etiológico do câncer cervical, pesquisas na área de imunologia são importantes e constituem importante foco de interesse científico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi apresentado pelo pesquisador principal.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após avaliação verifico que o presente projeto está bem apresentado, apresentou termo de consentimento livre e esclarecido e possui caráter voluntário. Assim, após avaliação do mesmo, sou favorável a aprovação e submeto meu parecer ao Comitê de Ética local.

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto Aprovado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJECTO_1070910.pdf	26/06/2018 18:57:42		Aceito

Endereço: Rod. MT100 Km 3,5-ICBS

Bairro: Campus do Araguaia

CEP: 78.698-000

UF: MT

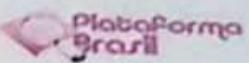
Município: PONTAL DO ARAGUAIA

Telefone: (66)3402-1121

E-mail: professoramarlysugusta@gmail.com

Página 02 de 03

UFMT - UNIVERSIDADE
FEDERAL DE MATO GROSSO -
CAMPUS DO ARAGUAIA



Continuação do Parecer: 2.757.302

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Brochura_efecto_imunomodulatorio_da_melatonina_sobre_a_producão_de_citocinas_e_comportamento_reológico_da_mucosa_cervical_em_amostras_positiva_para_hpv_aron_carlos_cotrim.pdf	26/06/2018 18:56:52	ARON CARLOS DE MELO COTRIM	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Efeito_imunomodulatorio_da_melatonina_sobre_a_producão_de_citocinas_e_comportamento_reológico_da_mucosa_cervical_em_amostras_positiva_para_HPV.pdf	26/06/2018 18:55:58	ARON CARLOS DE MELO COTRIM	Aceito
Folha de Rosto	Folha_Rosto_Comite_de_etica.pdf	07/05/2018 11:31:37	ARON CARLOS DE MELO COTRIM	Aceito

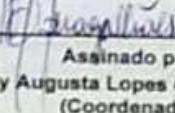
Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PONTAL DO ARAGUAIA, 05 de Julho de 2018


 Assinado por:
Marly Augusta Lopes de Magalhães
 (Coordenador)

Endereço: Rod. MT100 Km 3,5-HCBS

Bairro: Campus do Araguaia

CEP: 78.698-000

UF: MT

Município: PONTAL DO ARAGUAIA

Telefone: (65)3402-1121

E-mail: professoramarlyaugusta@gmail.com

ANEXO II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Projeto: Efeito imunomodulatório da melatonina sobre a produção de citocinas e comportamento reológico do muco cervical em amostras positiva para HPV.

Pesquisadores e instituições envolvidas: M.e Aron Carlos de Melo Cotrim – Instituto de Biociências – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS)

Profa. Dra. Inês Aparecida Tozetti – Instituto de Biociências – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS).

Prof. Dr. Eduardo Luzia França - Instituto Universitário do Araguaia – Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT).

Profa. Dra. Adenilda Cristina Honório-França - Instituto Universitário do Araguaia - Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT).

Prof. M.e Yehya Chakib Ghalfi – Universidade do Vale do Araguaia (UNIVAR)

Objetivo principal: Avaliar e efeito imunomodulador da melatonina sobre a produção de citocinas e correlacioná-lo ao comportamento reológico no muco cervical de mulheres com e sem o HPV.

Procedimentos: Serão utilizadas amostras de muco cervical positivas para DNA de HPV de alto risco oncogênico com diagnóstico histopatológico de neoplasia intraepitelial cervical e amostras negativas para DNA de HPV e negativa para lesão intraepitelial e malignidade (NILM) coletadas no município de Barra do Garças/MT em clínicas e hospitais através de parcerias previamente estabelecidos e mediante "Termo de Consentimento Livre e Esclarecido" sendo preservado a identidade dos pacientes. As amostras serão colhidas de acordo com a demanda normal do estabelecimento aproveitando o material coletado para o exame de citológico, não acarretando assim coletas ou riscos adicionais a paciente. Será utilizado escova endocervical para a colheita do muco e células.

Possíveis riscos e desconforto: Os riscos envolvidos no presente estudo estão relacionados a contaminação do material durante o procedimento de colheita e processamento da amostra. Poderá haver certo desconforto, resultante da coleta do material cervical, apesar desta serem realizadas com técnica adequada e de maneira cuidadosa por profissionais qualificados e aproveitamento da demanda normal de exames dos laboratório e clínicas parceiras.

Benefícios previstos: A pesquisa traz como benefício a produção de conhecimento científico relacionado aos mecanismos da patologia estudada, formas de terapias mais eficientes, epidemiologia da doença e diagnóstico e o incentivo a prática do exame ginecológico preventivo. O estudo ainda fornece dados importantes as participantes como a tipagem viral.

Eu.....

....., idade:..... fui informada dos objetivos, procedimentos, riscos e benefícios desta pesquisa, descritos acima. Entendo que terei garantia de confidencialidade, ou seja, que apenas os resultados dos exames realizados com o leite materno serão divulgados e ninguém, além dos pesquisadores, terá acesso aos nomes dos participantes desta pesquisa. Entendo também, que tenho direito de receber, sempre que desejar, outras informações sobre o estudo, entrando em contato com o pesquisador (M.e Aron C. M. Cotrim). Fui informada ainda, que a minha participação é voluntária e que, se eu preferir não participar ou deixar de participar deste estudo em qualquer momento, isso NÃO influenciará no meu atendimento junto ao Hospital. Compreendendo tudo o que me foi explicado sobre o estudo e, estando de acordo em participar, assino embaixo.

Assinatura do participante (ou do responsável, se menor)

**M.e Aron Carlos de Melo Cotrim
Pesquisador principal**

Prof. M.e Aron Carlos de Melo Cotrim. Rodovia BR-070, Km 5. Barra do Garças - Mato Grosso. CEP: 78600-000. E-mail: aroncarlosbg@gmail.com

Barra do Garças/MT, ____ de _____ de 2018.

ANEXO III**Cancer Immunology, Immunotherapy****Correlation between melatonin concentration and cytokines in cervical mucus in positive samples for the presence of human papillomavirus**

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:		
Full Title:	Correlation between melatonin concentration and cytokines in cervical mucus in positive samples for the presence of human papillomavirus	
Article Type:	Research Report	
Funding Information:	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (No: 447218/2014-0; No: 305725/2018-1)	Dr Eduardo França
	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (001)	Dr Aron Cotrim
Abstract:	<p>Human papilloma virus (HPV) is the main causative agent of cervical cancer, characterized by neoplastic lesions in the cervix. Based on the morphology of the cells of the uterine cervix, the findings are classified as negative intraepithelial lesions for malignancies (NILMs), low-grade squamous intraepithelial lesions (LSILs), high-grade squamous intraepithelial lesions (HSILs), atypical squamous cells of undetermined significance (ASCs - US) and atypical squamous cells of undetermined significance without excluding HSILs (ASCs - H). The progression of neoplastic lesions is related to the microenvironmental inflammatory process of the cervix and mediated by the expression and stimulation of cytokines. Cervical mucus is viscous liquid secretion composed of proteins, inorganic components and pro- and anti-inflammatory agents and is an important protective barrier. The aim of this study was to quantify and correlate the concentrations of cytokines IL-6, IL-8 and IL-10 and Melatonin (MLT) in cervical mucus. According to the results, a decrease in MLT was observed in LSIL and HSIL samples compared to NILM. The cytokines IL-6 and IL-8 showed greater expression in the LSIL and HSIL samples compared to the NILM group. HSIL samples showed a negative correlation between the concentration of MLT and IL-6 and IL-8. We suggest that the levels of IL-6, IL-8 and MLT in HSIL samples are decisive for the progression of neoplastic lesions in HPV infections. New cervical cancer treatment strategies may include cytokine and melatonin control targets for effective immunotherapy.</p>	
Corresponding Author:	<p>Eduardo França, PhD UFMT: Universidade Federal de Mato Grosso Barra do Garças, Mato Grosso BRAZIL</p>	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	UFMT: Universidade Federal de Mato Grosso	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	Aron Cotrim	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	<p>Aron Cotrim Eduardo França, PhD Jordana Martins Katleyn Silva Mahmi Fujimori Yehya Ghalfi Isabela Machado Adenilda Honorio-França Inês Tozetti</p>	