

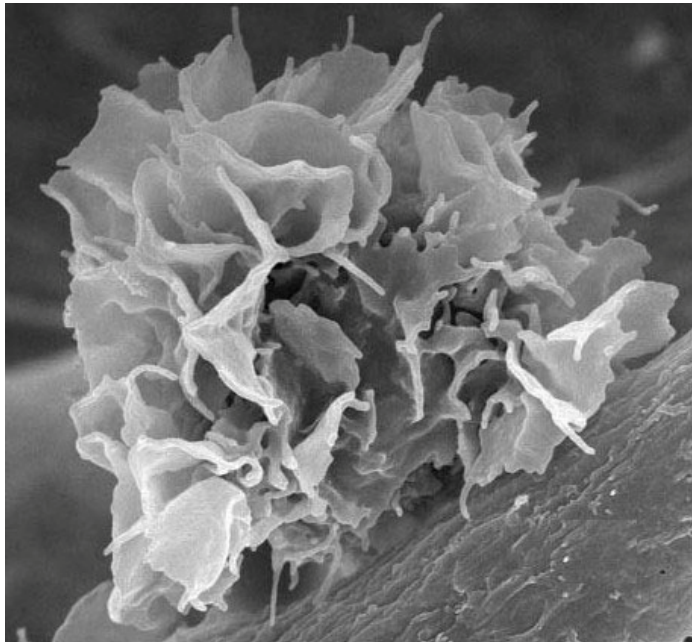


UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA



Programa de Pós-graduação em Biologia Celular

**ANÁLISE DAS POPULAÇÕES DE CÉLULAS DE
LANGERHANS E LINFOCITÁRIAS EM LESÕES
ESCAMOSAS INTRA-EPITELIAIS CERVICAIS E
INVASORAS DO COLO UTERINO**



Daniele de Souza Camargos

2015

Daniele de Souza Camargos

**ANÁLISE DAS POPULAÇÕES DE CÉLULAS DE
LANGERHANS E LINFOCITÁRIA EM LESÕES
ESCAMOSAS INTRA-EPITELIAIS CERVICAIS E
INVASORAS DO COLO UTERINO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular, do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção ao grau de Doutor em Biologia Celular.

Orientadora: Prof^a Walderez Ornelas Dutra

Co-orientadora: Prof^a Annamaria Ravara Vago

Aluna: Daniele de Souza Camargos

Belo Horizonte

2015

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Patogênese Molecular do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas, ICB, UFMG.

Colaboradores:

- Dr. Alexandre Tafuri, Laboratório de Patologia Tafuri.
- Dr. Marcelo Antônio Pascoal Xavier, Departamento de Anatomia Patológica, Faculdade de Medicina, UFMG.
- Dr. Marcelo Vidigal Caliari, Laboratório de Protozooses, Departamento de Patologia Geral, ICB, UFMG.
- Dr. Marcos Xavier Silva, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, UFMG.
- Dra. Paula Ávila Fernandes, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, UFMG.

Órgãos Financiadores:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- CAPES**
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais- FAPEMIG**

Agradecimentos

Gostaria de expressar os meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho:

- À minha querida orientadora Annamaria pelo apoio e conhecimento compartilhado, pela paciência e dedicação, por me ensinar o caminho a trilhar, pela amizade e carinho;
- À minha orientadora Walderez pelo apoio, paciência e compreensão;
- À minha mãe Mariley e ao meu pai Fábio, pelo carinho, incentivo e infinita compreensão;
- Ao meu esposo Neimer, pelo companheirismo, dedicação, atenção, compreensão e extrema paciência;
- À minha irmã, Rafaela, pela amizade e apoio incondicional;
- À querida Elisângela, pela amizade, companheirismo e grande ajuda na finalização deste trabalho;
- À Soraya, Lara, Keila, Larissa, Vitor e Eduardo pela amizade e pela grandiosa contribuição no desenvolvimento do presente trabalho;
- À pós-graduação em Biologia Celular, pela oportunidade;
- À todos os colaboradores e às pacientes que contribuíram para realização deste trabalho.

Muito obrigada!

ABSTRACT

Squamous Intraepithelial Lesions (SILs) are pre-malignant cervical lesions, which can progress to cervical cancer (CC). Several studies demonstrated that high-risk (HR) Human Papillomaviruses (HPVs) are involved with the development of cervical pre-malignant/malignant conditions, in addition to the abolishment of an effective Immune response. Langerhans cells (LC) are considered the first and most important cells responsible for the recognition, processing and presenting-antigen in mucosa, including the cervical one. Whereas T cells require the transportation and processing of antigens, their functional dependence of CL is absolute requirement for them to initiate and perform their duties as effector cells. This study was focused on performing in histological sections of HPV-induced cervical SILs, the analysis of (i) HPV DNA presence and eight oncogenic types through Nested and Hemi-nested PCR technique (ii) the LC density by means of Indirect Immunofluorescence technique, and (iii) the CD4+, CD8+ and granzyme B+ subpopulations by Immunohistochemical staining. By analyzing the LC density ascertained by four distinct markers (S-100, Langerin, CD1a and CD83), a clear decrease of Langerin+ cells number in SIL lesions *versus* the normal epithelium was observed. Additionally, it was verified a significant increasing in the number of S100, CD1a, CD83 (LC), CD8, CD4 and granzyme B (immune-competent) positive cells along with the severity of cervical disease, when compared with the normal group. A higher quantity of CD1a+,CD83+ (LC) and CD8+ and granzyme B+-lymphocytes was observed of HPV+ and HPV16/18+ tissue/samples when compared to normal cervix. A severe decrease in LC and lymphocytes was observed in CINIII samples from those HPV+ and HPV16/18+ group. HPV 16 was the most prevalent in the samples studied, being present in 50% of CINIII samples and 60% of CC samples. 84% of CINIII samples had multiple infections. Thus, the increase of LC number through the distinct SIL degrees might be associated with a possible increasing of LC migration to the site of cervical injury and recruitment of lymphocyte population in an attempt to control hrHPVs associated cervical lesion development.

O carcinoma de células escamosas da cérvix uterina é precedido por uma série de modificações do epitélio original, que constituem as neoplasias intra - epiteliais cervicais (NIC), transformações progressivas que podem evoluir a lesões invasoras. Estudos demonstram que os Papilomavírus Humano (HPVs) de alto risco estão intimamente associados ao desenvolvimento de processos celulares malignos e na subversão da resposta imune na cérvix uterina. As células de Langerhans (CL) têm-se mostrado as primeiras células responsáveis pelas funções de reconhecimento, processamento e apresentação de antígeno em mucosas. Tais células representam absoluto requerimento para que Linfócitos T possam iniciar e exercer as suas funções como células efetoras. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo efetuar a análise (i) da presença do DNA do HPV e de oitos tipos oncogênicos por meio da técnica de *Nested* e *Hemi-nested* PCR, (ii) da densidade de células de Langerhans no epitélio de amostras de Lesões Escamosas Intra-epiteliais (LEIs) e invasoras do colo uterino induzidas pela presença do HPV, por meio da técnica de Imunofluorescência indireta e (iii) das subpopulações de linfócitos T CD4+, CD8+ e de células granzima B+ no epitélio e no estroma, pela técnica de Imunohistoquímica. A análise da densidade de LC determinada por quatro marcadores diferentes (S100, Langerina, CD1a e CD83) revelou queda no número de células Langerina+ em amostras com lesões em relação ao epitélio normal. No entanto, verificou-se um aumento significativo no número de células de Langerhans S100, CD1a, CD83 positivas e de células imuno-competentes, CD8, CD4 e granzima B positivas, em LEIs e câncer, quando comparado com o grupo normal. Observou-se um aumento na densidade de CL (CD1a+, CD83+) e de células CD8+ e granzima B+ em amostras de NICII quando comparado às amostras controles, tanto no grupo de amostras HPV+ quanto nas amostras HPV16/18+. Porém, observou-se queda expressiva no número de CL e linfócitos em lesões de NICIII, com a maioria dos marcadores utilizados. O HPV16 foi o mais prevalente nas amostras estudadas, estando presente em 50% das amostras de NICIII e 60% das amostras de câncer. 84% das amostras de NICIII apresentaram múltiplas infecções. Assim, o aumento do número de CL através dos graus distintos de lesão pode estar associado com um possível aumento da migração de CL para o local da lesão cervical e recrutamento de populações de linfócitos, na tentativa de controlar LEIs associadas com HPVs de alto risco.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgNO ₃	Nitrato de Prata
APCs	<i>Antigen Presenting Cells</i> (Células Apresentadoras de Antígenos)
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Albumina Bovina Sérica)
CAF	Cirurgia de Alta Frequência
CC	Câncer Cervical
CCE	Carcinoma de Células Escamosas
CCPI	<i>Cytotoxic Cell Proteinase I</i> (Proteinase I da Célula Citotóxica)
CCR	Chemokine Receptor (Receptor de Quimiocina)
CDD	Célula Dendrítica Dermal
CD	<i>Cluster of differentiation</i> (marcador de diferenciação)
CIS	Carcinoma <i>in situ</i>
CL	Célula de Langerhans
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CTL	<i>Cytotoxic T lymphocytes</i> (linfócitos T citotóxicos)
DAB	Diaminobenzidina
DC	<i>Dendritic cell</i> (célula dendrítica)
dd H ₂ O	Água bidestilada
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido Desóxi-ribonucleico)
dNTP	Desóxi-ribonucleotídeos Trifosfatados
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i> (Fator de Crescimento Epidérmico)
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> (Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico)
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> (Separação celular ativada por fluorescência)
GB	Grânulos de Birbeck
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> (Fator estimulador de Colônia Granulócito-Macrófago)
GrB	Granzima B
HIV	Vírus da Imunodeficiência Adquirida
HLA	<i>Human Leucocyte Antigen</i> (Antígeno Leucocitário Humano)

HPV	Papilomavírus Humano
HSIL	<i>High-grade Squamous Intraepithelial Lesion</i> (Lesão Escamosa Intraepitelial de Alto Grau)
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i> (Agência Internacional de Pesquisas sobre o Câncer)
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IL	Interleucina
IFN	Interferon
INCA	Instituto Nacional do Câncer
Kda	<i>Kilodalton</i>
LCR	<i>Long Control Region</i> (Região de Controle Longa)
LEI	Lesão Escamosa Intraepitelial
LNL	<i>Lymph-node lymphocytes</i>
LSIL	<i>Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion</i> (Lesão Escamosa Intraepitelial de Baixo Grau)
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (Complexo de Histocompatibilidade Principal)
µg	Micrograma
µL	Microlitro
mL	Mililitro
µM	Micromolar
mM	Milimolar
MMR	<i>Macrophage Manose Receptor</i> (Receptor de Manose do Macrófago)
NaOAc	Acetato de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical
NK	<i>Natural Killer</i>
NUPAD	Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORI	Origem de Replicação
pb	Pares de Base
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Solução Salina Tamponada)
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> (Células Mononucleares de Sangue Periférico).

PBL	<i>Peripheral Blood Lymphocytes</i> (Linfócitos de sangue periférico)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i> (Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas)
PHT	<i>Phoneutria</i>
pmol	Picomol
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ácido Ribonucleico)
RI	Resposta Imune
rpm	Rotações por Minuto
SIL	<i>Squamous Intraepithelial Lesion</i> (Lesão Escamosa Intraepitelial)
SND	Sobrenadante
TBE	Solução de Tris-Borato-EDTA
tILs	<i>Tissue Infiltrating Lymphocytes</i> (Linfócitos infiltrantes de tecido)
TILs	<i>Tumor Infiltrating Lymphocytes</i> (Linfócitos infiltrantes de tumor)
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i> (Fator de Crescimento Transformante)
Th1	<i>T helper type 1</i> (Linfócitos T auxiliaries de resposta tipo I)
Th2	<i>T helper type 2</i> (Linfócitos T auxiliaries de resposta tipo II)
TLR	<i>Toll Like Receptor</i> (Receptor do tipo Toll)
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i> (Fator de Necrose Tumoral)
TSBST	Tris-buffered Saline with Tween 20 (Solução Salina Tamponada com Tris e Twen)
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
URR	<i>Upstream Regulatory Region</i> (Região Regulatória localizada a 5' do Promotor)
VLP	<i>Virus Like Particles</i> (Partículas tipo Virais)

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1:	Secções de lesões precursoras do Carcinoma de Células Escamosas	18
FIGURA 2:	Organização do genoma do HPV	19
FIGURA 3:	Ciclo de vida durante a infecção produtiva por HPV.....	24
FIGURA 4:	Reconhecimento e Resposta do Sistema Imune Adaptativo à presença de células tumorais e ou infectas.....	34
FIGURA 5:	Imagens representativas de células de Langerhans S100+ Em Lesões Escamosas Intraepiteliais.....	60
FIGURA 6:	Imagens representativas de células de Langerhans Lang+ em Lesões Escamosas Intraepiteliais.....	61
FIGURA 7:	Imagens representativas de células de Langerhans CD1a+ em Lesões Escamosas Intraepiteliais.....	62
FIGURA 8:	Imagens representativas de células de Langerhans CD83+ em Lesões Escamosas Intraepiteliais.....	63
FIGURA 9:	Imagens representativas de células imunocompetentes em Lesões Escamosas Intraepiteliais e Amostra Controle.....	64
FIGURA 10:	Comparação do número de células de Langerhans em amostras cervicais.....	70
FIGURA 11:	Comparação do Número de Células de Langerhans em Amostras Cervicais.....	71
FIGURA 12:	Comparação do Número de Linfócitos T CD4+, CD8+ e granzima B+ em amostras cervicais	74
FIGURA 13:	Imagens representativas de células imunocompetentes no epitélio e no estroma de amostras cervicais.....	77
FIGURA 14:	Comparação do Número de Linfócitos T CD4+, CD8+ e granzima B+ em amostras cervicais	85

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1:	Relação entre o tipo de HPV e a patologia associada.....	21
TABELA 1:	Especificações dos anticorpos utilizados na técnica de imunofluorescência	50
TABELA 2:	Especificações dos anticorpos utilizados na técnica de Imunohistoquímica	52
TABELA 3:	Porcentagens dos tipos de DNA do HPV.....	58
TABELA 4:	Quantificação das Células de Langerhans e Subpopulações de Linfócitos T no Grupo HPV+.....	66
TABELA 5:	Quantificação das Células de Langerhans e Subpopulações de Linfócitos T no Grupo de Amostras Positivas para os HPVs 16 ou 18.....	68
TABELA 6:	Porcentagens dos tipos de DNA do HPV.....	76
TABELA 7:	Quantificação das Subpopulações de Linfócitos T no Grupo de Amostras HPV+.....	81
TABELA 8:	Quantificação das Subpopulações de Linfócitos T no Grupo de Amostras HPV16/18+.....	84

SUMÁRIO

1	REVISÃO DA LITERATURA.....	15
1.1	O Câncer Cervical.....	15
1.2	As Lesões Precursoras do Carcinoma de Células Escamosas.....	16
1.3	O Papilomavírus Humano.....	18
1.3.1	Classificação do HPV	20
1.3.2	Vacinas contra o HPV.....	22
1.3.3	O Ciclo de Vida do HPV.....	23
1.4	A Resposta Imune Local à infecção pelo HPV.....	24
1.4.1	A Resposta Imune Estabelecida na Cérvix Uterina.....	25
1.4.2	A Resposta Imune Adaptativa.....	27
1.5	As células Dendríticas.....	28
1.5.1	Aspectos Morfológicos e Fenotípicos das Células de Langerhans.....	30
1.5.2	Propriedades Funcionais das Células de Langerhans.....	31
1.5.3	Maturação, ativação e migração das Células de Langerhans.....	32
1.5.4	O papel das Células de Langerhans no Controle da Infecção pelo HPV	34
1.5.5	O papel das Células de Langerhans nas Lesões Escamosas Intra-epiteliais	36
1.6	O Papel da Imunidade Celular no Controle da Infecção pelo HPV e das Lesões Cervicais.....	38
1.7	O Papel da Granzima na Ativação de Linfócitos T Citotóxicos na Cérvix Uterina.....	40
2	JUSTIFICATIVA.....	43
3.	OBJETIVOS.....	45
3.1	Objetivo Geral.....	45
3.2	Objetivos Específicos	45
4.	METODOLOGIA.....	46

4.1	Preparação das Amostras Cervicais: Coleta, Fixação e Processamento Histológico.....	46
4.2	Extração do DNA das Amostras.....	47
4.3	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	47
4.3.1	Amplificação de um Fragmento do Gene de β -Globina Humano.....	47
4.3.2	Detecção da Infecção por HPV e Genotipagem.....	48
4.3.2.1	Detecção do Genoma Viral.....	48
4.3.2.2	Tipagem dos HPVs Oncogênicos.....	48
4.3.2.3	Tipagem por PCR dos HPVs 16, 18, 31, 52 e 58.....	49
4.3.2.4	Tipagem por PCR do HPV33.....	49
4.3.2.5	Tipagem por PCR do HPV35.....	49
4.4	Imunofluorescência Indireta.....	50
4.5	Imunohistoquímica.....	52
4.6	Avaliação e Interpretação das Marcações de S-100, Langerina, Cd1a e Cd83.....	53
4.6.1	Avaliação e Interpretação das Marcações de CD4, CD8 e Granzima B.....	54
4.7	Análise Estatística.....	55
5.	RESULTADOS.....	56
5.1	Padronização da Técnica de Imunofluorescência para Quantificação das Células de Langerhans.....	56
5.2	Padronização da Reação de Imunohistoquímica para Quantificação dos Linfócitos T CD4+, CD8+ e Granzima B+.....	56
5.3	Análise das Populações de Células de Langerhans e Linfocitária no Epitélio das Amostras Cervicais.....	57
5.3.1	Detecção do DNA do HPV e Genotipagem.....	57
5.3.2	Análise Global das Subpopulações de Células de Langerhans e de Linfócitos no Epitélio	59
5.3.3	Análise Global do Número de Células de Langerhans no Epitélio de Amostras Cervicais.....	69

5.3.4	Análise Global das Subpopulações de Células de Langerhans e de Linfócitos no Epité	72
5.4	Estudo das Subpopulações de Linfócitos T no Epitélio e no Estroma de Amostras de Pacientes Portadores ou Não de Lesões IntraEpiteliais Cervicais.....	75
5.4.1	Detecção do DNA do HPV e Genotipagem.....	75
5.4.2	Subpopulações de Linfócitos T em Amostras Cervicais.....	76
5.4.3	Subpopulações de Linfócitos T em Amostras Normais.....	78
5.4.4	Subpopulações de Linfócitos T em Amostras HPV+.....	78
5.4.5	Subpopulações de Linfócitos T em Amostras HPV16/18+.....	81
6.	DISCUSSÃO.....	86
7.	CONCLUSÕES.....	96
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98
9.	SEÇÃO DE ANEXOS.....	119

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 O Câncer Cervical

O câncer do colo do útero corresponde, aproximadamente, a 15% de todas as categorias de câncer feminino, sendo o terceiro tumor mais frequente na população feminina, com incidência menor apenas do que o câncer de mama e do câncer de cólon e reto, constituindo a quarta causa de morte de mulheres por câncer no Brasil (Instituto Nacional do Câncer - INCA, 2015).

Com o surgimento de 527 mil casos novos por ano no mundo, o câncer do colo do útero é responsável pela morte de, aproximadamente, 230 mil mulheres a cada ano. Em 2013 esse câncer foi responsável pelo óbito de 265 mil mulheres, sendo que 87% desses ocorreram em países em desenvolvimento (BOSCH *et al*, 2013; IARC 2014). A sobrevida média mundial estimada para essa neoplasia em 5 anos é de 52%, mas em países desenvolvidos essa sobrevida varia de 59 a 69%, sendo aproximadamente de 49% nos países em desenvolvimento, onde os casos são encontrados em estádios relativamente avançados (BOSCH & MUNOZ, 2002; INCA, 2015).

Na América Latina e no Sudeste Asiático, as taxas de incidência são geralmente altas enquanto, na América do Norte, na Austrália, no Norte e Oeste europeus são consideradas baixas (BOSCH *et al.*, 1995; BOSCH & MUNOZ, 2002, BOSCH *et al*, 2013). No Brasil, existe uma grande variação nas taxas de incidência, sendo as maiores observadas nas regiões Norte (23,57 / 100 mil), Centro-Oeste (22,19 / 100 mil) e Nordeste (18,79 / 100 mil), sendo o segundo tipo de câncer mais frequente nas duas últimas. Nas regiões Sudeste (10,15 / 100 mil) e Sul (15,87 / 100 mil), esse tipo de câncer é o quarto e quinto mais frequente, respectivamente. Uma maior incidência do câncer de colo evidencia-se na faixa etária de 20 a 29 anos e o risco aumenta rapidamente até atingir seu pico, geralmente na faixa etária de 50 a 60 anos (INCA 2015). Segundo estimativas do INCA (2015) no ano de 2014 ocorreram no Brasil 15.590 novos casos de câncer do colo uterino (com 4.370 novos casos na região Sudeste), com um risco estimado de 15,33 casos a cada 100 mil mulheres.

Como demonstrado em importantes estudos epidemiológicos, o câncer cervical é o primeiro dentre os demais tipos, reconhecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como sendo quase em sua totalidade atribuído à infecção pelo HPV, embora

outros fatores associados ao vírus e aos pacientes estejam seguramente envolvidos (SPINILLO *et al.*, 1993; BOSCH *et al.*, 2008; KASAP *et al.*, 2011; BOSCH *et al.*, 2013).

1.2 As Lesões Precursoras do Carcinoma de Células Escamosas

As neoplasias invasivas do colo uterino são em geral precedidas por uma longa fase de doença pré-invasiva, que correspondem às lesões precursoras do câncer cervical.

O termo Neoplasia Intra-epitelial Cervical (NIC) foi introduzido em 1968, por Richart que propôs sua divisão em graus I, II e III, de acordo com o grau de acometimento dos estratos do epitélio (Figura1). Na classificação proposta por Richart a NICI correspondia à displasia leve, a NICII à displasia moderada e a NICIII à displasia grave e CIS (Carcinoma *in situ*). A identificação de lesões coilocitóticas, ao longo dos anos 80, levou à proposição por Richart em 1990, de uma terminologia baseada em dois graus da doença, NIC de baixo grau (alterações compatíveis com atipia coilocitótica e lesões NICI) e NIC de alto grau (abrangendo as NICs de grau II e III (SANKARANARAYANAN *et al.*, 2003; SELLORS *et al.*, 2004; BRASILEIRO - FILHO 2006).

Em 1988 foi criado o Sistema Bethesda para classificação citopatológica das lesões uterinas, sendo o mesmo publicado em 1991 e revisado em 2001. Esse sistema propôs a criação do termo Lesões Escamosas Intra-epiteliais ou LEIs e um esquema de categorização das lesões em dois graus, baixo e alto grau. Assim a classificação de Bethesda considera como LSIL (lesões de baixo grau) as alterações compatíveis com o efeito citopático do HPV e a NIC de baixo grau (NICI), enquanto que as HSIL (lesões de alto grau) compreendem as NICs mais avançadas de grau II e III. No presente estudo, baseado na análise da correlação do número de células de Langerhans e linfócitos T em diferentes tipos de lesões, utilizou-se a terminologia Neoplasia Intra-epitelial Cervical, que é normalmente utilizada para a categorização histopatológica das lesões cervicais.

A maior parte das displasias leve (NICI) a moderada (NICII) evolui geralmente para a regressão. Aproximadamente 20% das NICs I progredem para NICII, 30% destas lesões irão progredir para NICIII e 40% dessas lesões irão progredir ao câncer invasivo MELNIKOW *et al.*, 1998; ZUR-HAUSEN 2002; MOSCICKI *et al.*, 2004; PETO *et al.*, 2004).

Diversos trabalhos epidemiológicos, desenvolvidos nas últimas três décadas, foram dedicados à elucidação dos fatores de risco associados à patologia do câncer

cervical. Evidências atuais indicam que a infecção persistente por tipos oncogênicos de HPVs e a carga viral, representem fatores de risco essenciais para o desenvolvimento do câncer cervical (BOSCH & MUÑOZ, 2002; BOSCH & SANJOSÉ, 2002; JASTREBOFF & CYMET, 2002; ZUR HAUSEN, 2009). Porém, a presença de fatores de risco imunológicos (a imunossupressão) e comportamentais (a presença de múltiplos parceiros sexuais, o tabagismo, a multiparidade e o uso de anticoncepcionais orais) acarretam um aumento na probabilidade de progressão das lesões cervicais em direção ao carcinoma invasor (BOSCH & SANJOSÉ, 2002; JASTREBOFF & CYMET, 2002, KASAP *et al.*, 2011; BOSCH *et al.*, 2013).

De fato, o modelo atualmente mais aceito para a progressão de lesões intra-epiteliais cervicais ao carcinoma é baseado na infecção e persistência de HPVs de alto risco que associadas à deficiência imunológica e à exposição a fatores mutagênicos (que elevariam a atividade de genes virais como E6 e E7), poderiam causar a progressão das LSIL para as HSIL que poderiam evoluir ao carcinoma invasor (ZUR-HAUSEN, 2002; KASAP *et al.*, 2011; HIBMA *et al.*, 2012).

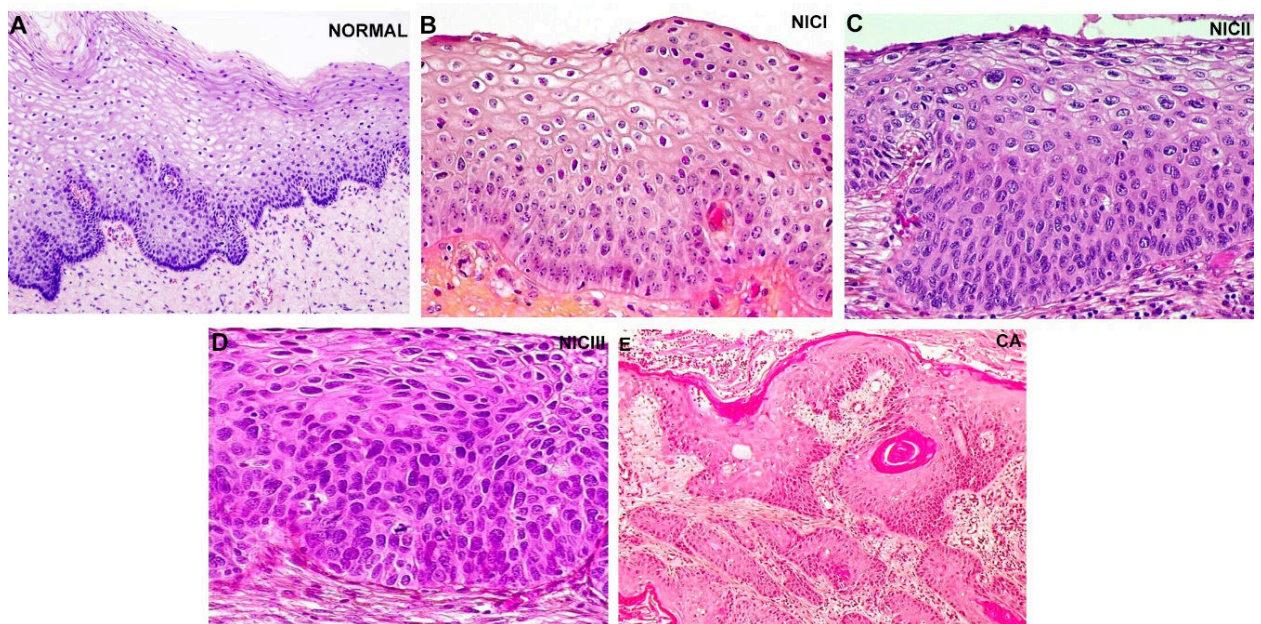


FIGURA 1: Secções de lesões precursoras do Carcinoma de Células Escamosas. A letra A representa o epitélio escamoso normal com uma única camada de células basais, camadas intermediária e superficial ricas em glicogênio e apresentando núcleos picnóticos. Em B, observa-se uma amostra de NICI com presença de desorganização no terço basal do epitélio e de coilócitos nas camadas superiores. A letra C mostra uma imagem de NICII com desorganização nos dois terços basais do epitélio e critérios celulares de malignidade e infecção viral. Em D, uma amostra de NICIII, onde as células apresentam alto grau de anormalidade nuclear e celular em toda a espessura do epitélio. NIC – Neoplasia Intra-epitelial Cervical. Em E, Carcinoma de células escamosas (CCE) invasor moderadamente diferenciado, com presença de necrose e reação inflamatória. Coloração de HE. Em A: aumento de 40X, B: aumento de 400X, C-E: aumento de 100X. (Fonte: <http://en.wikimedia.org> e <http://screening.iarc.fr>).

1.3 O Papilomavírus Humano

O Papilomavírus, incluído na família *Papillomaviridae* (DE VILLIERS *et al.*, 2004), consiste em um vírion de 55nm, icosaédrico, com 72 capsômeros, sem envoltório, apresentando genoma de DNA circular de dupla fita. Esses vírus, que são altamente específicos para seus respectivos hospedeiros, infectam o epitélio de revestimento da pele e de certas mucosas. Esse tropismo celular se traduz por interações específicas entre o vírus e sua célula hospedeira, o queratinócito (PEREYRA *et al.*, 1996; VILLA, 1997; DE VILLIERS *et al.*, 2004).

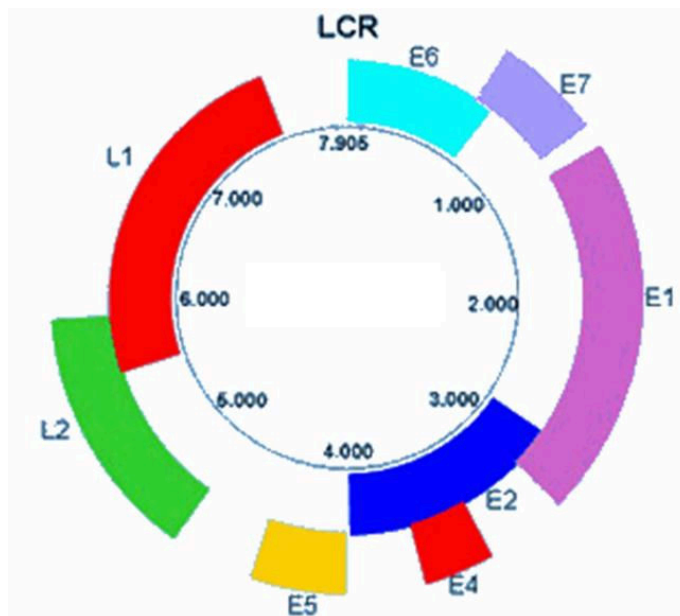


FIGURA 2: Organização do genoma do HPV. O genoma do Papilomavírus humano contém aproximadamente 8.000 pares de bases sendo dividido em três regiões: E (*early* ou precocemente transcrita), L (*late* ou tardiamente transcrita) e LCR (*long-control-region* ou região de controle longa). (Fonte: www.ipoportorito.min-saude.pt).

O genoma do HPV consiste em um DNA circular de dupla fita, contendo aproximadamente 8.000 pares de base (pb), podendo apresentar em sua totalidade deleções de até 25%. O genoma viral é dividido em três segmentos: região precoce ou “*early-region*” (E), constituída por seis genes (E1, E2, E4, E5, E6 e E7); região tardia ou “*late-region*” (L), responsável pela codificação das duas proteínas estruturais do capsídeo viral e região de controle longa, ou “*long-control-region*” (LCR), também denominada de “*upstream regulatory region*” (URR), (TYRING, 2000) - Figura 2. Essa última varia em tamanho, de 500 a 1000pb nos diferentes tipos de HPV, e contém a origem de replicação (ORI) viral e os elementos de controle transcricional, os quais regulam a expressão gênica do HPV (PEREYRA *et al.*, 1996; VILLA, 1997; MACIAG & VILLA, 1999; revisão em TYRING, 2000 e em DOORBAR, 2005). Os dois genes tardios, *L1* e *L2* codificam, respectivamente, a proteína principal e secundária do capsídeo viral. Por codificarem proteínas estruturais, esses genes são especialmente conservados na grande maioria dos vários tipos de HPVs (TYRING, 2000; DE VILLIERS *et al.*, 2004).

1.3.1 - CLASSIFICAÇÃO DO HPV

A análise da seqüência de DNA do genoma dos HPVs permitiu a identificação de mais de 150 distintos tipos virais. Desses, cerca de 40 tipos podem infectar o trato genital. Atualmente considera-se um novo tipo de HPV quando as seqüências de nucleotídeos dos genes *L1*, *E6* e *E7* (aproximadamente 30% do genoma viral) diferirem acima de 10% dos tipos conhecidos. Se esse percentual for inferior a 2%, o novo vírus isolado é designado como uma variante do mesmo tipo. Os subtipos virais possuem genomas cuja seqüência nucleotídica nessas regiões difere entre 2% e 10% dos tipos já descritos (BERKHOUT *et al.*, 2000; BURD *et al.*, 2003; DE VILLIERS *et al.*, 2004; BERNAUD *et al.*, 2010).

A diferença entre os tipos de HPV encontrados em tumores benignos e malignos permite classificá-los como HPVs de baixo e alto risco oncogênico (CAVALCANTI *et al.*, 2000) - Quadro 1. Doze HPVs (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59) são designados pela OMS como sendo HPVs de alto risco para o desenvolvimento do câncer cervical, com alguns tipos adicionais (68 e 73) sendo reconhecidos como possíveis causadores dessa neoplasia. O HPV 16 é o mais prevalente HPV de alto risco, sendo responsável por aproximadamente 50% de todos os cânceres cervicais (DOORBAR, 2006; DOORBAR *et al.*, 2012).

Os HPVs infectam tanto as mucosas quanto os tecidos cutâneos e são classificados segundo o seu tropismo como cutaneotrópicos e mucosotrópicos - Quadro 1 (CRISH *et al.*, 2000; ZUMBACH 2000; SILVA *et al.*, 2002). Os determinantes que desencadeiam as diferenças de tropismo observadas no Papilomavírus ainda não foram elucidados, porém, acredita-se que variações discretas em certas porções do genoma viral possam resultar em potencial patogênico distinto (STUBENRAUCH *et al.*, 1999).

Quadro 1 – Relação entre o tipo de HPV e a patologia associada.

Tropismo	Patologia	Tipos de HPV *
Cutaneotrópico	Verrugas plantares	1,2,4,63
	Verrugas comuns	2,1,7,4,26,27,29,41,57,65,77, 1,3,4,10,28
	Verrugas vulgares (planas)	3,10,26,27,28,38,41,49,75,76
	Outras lesões cutâneas (ex.: cistos epidérmicos, carcinoma de laringe)	6,11,16,30,33,36,37,38,41,48, 60,72,73
	Epidermodisplasia verruciformis	2,3,10,5,8,9,12,14,15,17,19,
	Papilomatose respiratória recorrente	20,21,22,23,24,25,36,37,38, 47,50
	Papilomas/Carcinomas conjuntivos	6,11,16
	Condiloma acuminado (verrugas genitais)	6,11,30,42,43,45,51,54,55,70
Mucosotrópico	Neoplasia Intra-epitelial Cervical (NIC) <ul style="list-style-type: none"> • Não específicos • Baixo risco (NICI) • Alto risco (NICII e NICIII) 	30,34,39,40,53,57,59,61,62,64, 66,67,68,69 6,11,16,18,31,33,35,42,43,44,45 51,52,74 16,18,6,11,31,34,33,35,39,42,44, 45,51,52,56,58, 59,66
	Carcinoma cervical	16,18,31,45,33,35,39,51,52,56, 58,66,68,70

*A ordem numérica indica a frequência relativa da cada tipo. Os HPVs de baixo risco estão destacados em verde, enquanto que os de alto risco estão assinalados em vermelho. **Fonte: DOORBAR, 2005 (modificado).**

1.3.2 – VACINAS CONTRA O HPV

Nos últimos anos, duas novas vacinas desenvolvidas contra tipos de HPV começaram a ser comercializadas. Cervarix (Glaxo Smith Kline ®) é uma vacina profilática desenvolvida contra os HPV's 16, 18, 31, 33, e 45, os tipos mais comumente relacionados ao desenvolvimento do câncer cervical, incluindo os adenocarcinomas (HARPER, 2009; SCHILLER & MULLER, 2015). Gardasil (Merck, Sharp & Dohme ®) é uma vacina profilática efetiva contra os HPV's 16, 18 e 31 sendo também efetiva contra os HPV's 6 e 11, que causam verrugas genitais e a Papilomatose respiratória (HARPER, 2009; SCHILLER & MULLER, 2015). Recentemente uma nova vacina considerada de “segunda geração” se encontra em desenvolvimento e promete oferecer proteção contra tipos de HPV's adicionais, não contemplados pelas duas vacinas anteriores. A vacina nonavalente V503 (Merck, Sharp & Dohme ®) atualmente submetida à aprovação do US-FDA, parece ser segura e efetiva na prevenção de infecção persistente e lesões associadas aos tipos de HPV de alto risco 16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58, além dos HPV's 6 e 11 mais associados a verrugas anogenitais (DROLET *et al.*, 2014; CHATTERJEE 2014; RIETHMULLER *et al.*, 2015; SCHILLER & MULLER 2015).

O objetivo da vacinação contra o HPV é estimular nas pacientes submetidas à imunização, a produção de anticorpos capazes de se ligar fortemente à superfície do vírus, impedindo-o fisicamente de infectar a célula hospedeira, e prevenindo dessa forma, a infecção. Proteínas estruturais do capsídeo como a L1, representam alvos importantes para a produção desses anticorpos. Quando expressa em leveduras ou outras células, L1 agrega-se para formar capsídeos vazios, conhecidos como VLPs (*Virus-like Particles* ou partículas tipo-virais), partículas constituídas por proteínas virais recombinantes, não oncogênicas ou patogênicas, uma vez que não contem material genético infeccioso, sendo, portanto, ideais para o uso em vacinas (EIBEN *et al.*, 2003; LIN *et al.*, 2010; DROLET *et al.*, 2014).

Estas vacinas mantêm uma forte promessa para reduzir a incidência das doenças relacionadas ao HPV, e podem ter um grande impacto em países onde outros programas de prevenção ao câncer cervical não sejam amplamente disponíveis. A implementação de um amplo programa de vacinação contra o HPV em um dado país, deve ainda considerar importantes questões e/ou limitações como: (i) a possível evasão de mulheres vacinadas aos exames cito/histopatológicos de rotina e aos programas institucionais de

rastreamento; (ii) o alcance das vacinas atuais à apenas uma pequena percentagem dos tipos oncogênicos; (iii) a ausência de atividade terapêutica dessas vacinas profiláticas, ainda incapazes de inibir a progressão da infecção pelo HPV em células basais previamente infectadas (EIBEN *et al* 2003; LIN *et al*, 2010; DROLET *et al* 2014). No entanto, há uma esperança clínica de que no futuro essas vacinas sejam capazes de neutralizar os virions dos HPVs não só na cérvix, mas em outros sítios comumente associados ao HPV, como pênis, vagina, vulva, anus, cavidade oral e orofaringe (D'ANDRILLI *et al.*, 2010; DROLET *et al.*, 2014).

1.3.3 - O CICLO DE VIDA DO HPV

O ciclo produtivo do vírus inicia-se pela infecção das células basais e parabasais do epitélio cervical e seguindo em direção ao topo do epitélio. Para que os vírus alcancem as células da camada basal é necessário que ocorra a perda da integridade do epitélio (micro-abrasões), o que facilita a penetração das partículas virais. Ao se dividir, as células tronco basais infectadas produzem células que vão posteriormente se diferenciar, carregando os HPVs em seu interior ou seu genoma, além de células contendo os vírus que se conservarão na camada basal do epitélio, determinando assim a cronificação da infecção (ZUR HAUSEN, 2000, TYRING, 2000; DOORBAR, 2005).

A internalização do vírus é um processo lento e complexo que pode durar horas e que ocorre, no caso dos HPV16 e 31, via endocitose mediada por clatrina e por caveolina, respectivamente (BOUSARGHIM *et al.*, 2003). O desnudamento viral intracelular que se segue a infecção permite que o DNA do vírus seja transportado para o núcleo das células hospedeiras, onde será mantido sob a forma de DNA epissomal abrangendo aproximadamente 50 a 100 cópias do HPV por célula após a replicação viral (ZUR-HAUSEN, 2000 e 2002; DOORBAR, 2005, HORVATH *et al.*, 2010).

Para a produção de virions infecciosos, os papilomavírus devem replicar o seu genoma e empacotá-lo em partículas virais. A replicação ocorre nas células em proliferação (inicialmente naquelas da camada basal do epitélio), e requer a expressão de duas proteínas (E4 e E5), cujas funções na replicação não estão bem definidas (Figura 3). Para que a replicação viral ocorra é necessária a ligação de E2 à região regulatória do DNA viral, assim como o recrutamento mediado por E2 para a ORI viral, da proteína E1 que atua como uma helicase (ZUR-HAUSEN, 2000; DOORBAR, 2005).

Para que ocorra a produção de partículas virais, L2 a proteína secundária, assim como L1, a proteína principal do capsídeo, são produzidas assim que a replicação do genoma viral é finalizada, expressas nas camadas médias ou superficiais do epitélio infectado somente em células que expressam E4. Desse modo, as partículas virais são formadas e liberadas somente quando as células infectadas alcançam a superfície do epitélio – Figura 3 (ZUR-HAUSEN 2000 e 2002; DOORBAR, 2005).

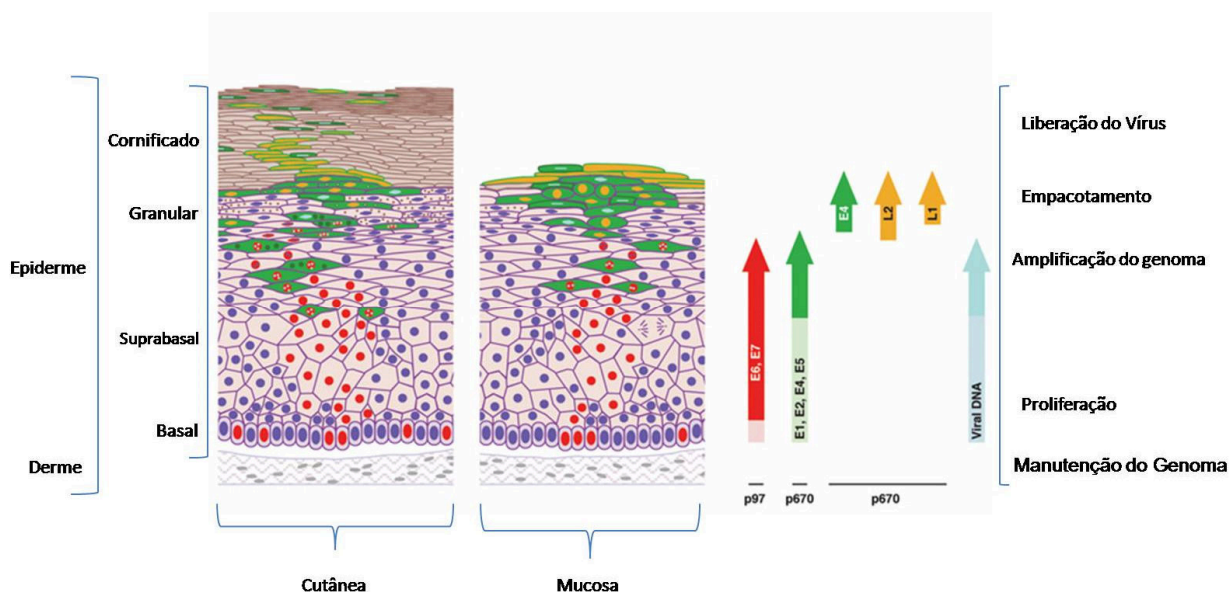


FIGURA 3: Ciclo de vida durante a infecção produtiva por HPV. Representação da mucosa escamosa e expressão gênica do HPV 16. Durante a diferenciação epitelial, p97 promove a expressão dos oncogenes virais *E6* e *E7* (vermelho). Nas camadas superiores do epitélio, p670 induz proteínas de replicação viral (verde) facilitando a amplificação do genoma viral (azul). Os genes *L1* e *L2* (amarelo) são expressos nas células superficiais. **Fonte: DOORBAR, 2005 (modificado).**

1.4 A Resposta Imune Local à Infecção pelo HPV

A importância da imunidade mediada por células (IMC) no controle da infecção pelo HPV é demonstrada em extenso número de artigos, que documentam o aumento da prevalência do HPV e de doenças associadas em pacientes imunossuprimidos, como os

receptores de transplantes e aqueles infectados pelo HIV (TYRING *et al.*, 2000; SCOTT *et al.*, 2001; TINDLE *et al.*, 2002).

Porém, uma das maiores evidências da associação entre a deficiência da imunidade celular e a infecção pelo HPV, se deve à realização de estudos desenvolvidos em portadores do HIV. Esses indivíduos apresentam um aumento na prevalência da infecção anogenital pelo HPV, assim como longos períodos de persistência da infecção. Além disso, as infecções por múltiplos tipos de HPV e por tipos oncogênicos são mais comuns nesses pacientes (SPINILLO *et al.*, 1993; ARANY *et al.*, 1998; LEVI *et al.*, 2005; CECCATO JUNIOR *et al.*, 2015).

O risco para o desenvolvimento de câncer cervical em pacientes HIV positivas, parece ser ainda maior em mulheres com baixa contagem de linfócitos T CD4⁺ (CASTELLSAGUÉ *et al.*, 2002). Porém, as tentativas de associação entre os marcadores do estágio da infecção pelo HIV (carga viral e contagem de linfócitos CD4⁺) e a infecção pelo HPV, tem sido inconsistentes. Alguns estudos sugerem que a doença avançada e o alto grau de deficiência imunológica, determinados por baixos níveis de T CD4⁺ em sangue periférico, estejam associados com maior prevalência e persistência da infecção pelo HPV. Por outro lado, outros estudos têm mostrado que o HIV influencia a presença da infecção pelo HPV e de LEIs, independente da contagem de linfócitos T CD4⁺. Os diferentes resultados observados nesses estudos, talvez sejam devido às características específicas de cada população, tais como idade jovem ou estágios iniciais da infecção pelo HIV (PALEFSKY *et al.*, 1999; SCOTT *et al.*, 2001, STRICKLER *et al.*, 2005; TEIXEIRA *et al.*, 2012; CAMARGO *et al.*, 2014).

1.4.1 – A RESPOSTA IMUNE INATA ESTABELECIDADA NA CÉRVICE UTERINA

O sistema imune inato consiste na primeira linha de defesa contra organismos invasores, enquanto que o sistema imune adaptativo desenvolve uma resposta diante de uma nova exposição ao mesmo patógeno. Ambos os sistemas apresentam tanto componentes celulares como humorais, através dos quais executam suas funções na proteção contra patógenos. Entre as diferenças observadas entre os dois sistemas imunes destacam-se: (i) no sistema imune inato, a presença de componentes de defesa constitutivos e disponíveis para serem prontamente mobilizados diante de uma infecção, além da inespecificidade de resposta para uma variedade de organismos invasores; (ii) no

sistema imune adaptativo, a presença de elevada especificidade antigênica e de memória imunológica, embora esse sistema necessite de um tempo maior para reagir frente a um determinado antígeno (AKTAS *et al.*, 2009; KENNEDY, 2010).

Na cérvix uterina, as células do sistema imune inato (macrófagos, células de Langerhans, células dendríticas, células *Natural Killer*, linfócitos T $\gamma\delta$ e queratinócitos) reconhecem estruturas estranhas através de receptores como aqueles do tipo Toll (revisão em ZHANG *et al.*, 2007), os quais sinalizam para a expressão de citocinas inflamatórias e quimiocinas como interleucinas (ILs) IL1 β , IL6, IL8 e IL12, fator de necrose tumoral (TNF α) e os interferons (IFNs) α , β e λ . Essas moléculas promovem o recrutamento de células do sistema imune, a secreção de fatores anti-microbianos e a ligação entre os sistemas imune inato e adaptativo (MEDZHITOV *et al.*, 2000).

As células dendríticas são APCs (*Antigen Presenting Cells* ou células apresentadoras de antígenos) que sob o estímulo de citocinas inflamatórias e o reconhecimento antigênico, aumentam a expressão do complexo de histocompatibilidade principal (MHC/HLA), visando a apresentação de peptídeos antigênicos às células T (DEGLI-ESPOSTI *et al.*, 2005). Para isso, DCs (*Dendritic Cells* ou células dendríticas) têm que migrar para os tecidos linfóides secundários, sofrer maturação e expressar moléculas co-estimulatórias como CD40, CD80 (B7.1) ou CD86 (B7.2), as quais irão se ligar a CD154 (CD40L) ou CD28, proteínas expressas em células T específicas (CELLA *et al.*, 1996). Essa ligação resulta na indução da proliferação de células T, produção de IL-2, e no aumento da expressão de genes anti - apoptóticos.

De acordo com o perfil de citocinas produzidas, a resposta de células T CD4+ pode ser classificada como celular ou Th1 (caracterizada pela produção de IL2, IL12, IL15, TNF α e IFN γ), humoral ou Th2 (relacionada a expressão de IL4, IL5, IL6, IL10 e IL13), modulatória ou Treg/Th3 (baseada principalmente na produção de IL10, TGF- β , e IFN γ) e Th17 (relacionada a expressão de IL17, IL23 e IL32). Entretanto, a resposta de células T CD8+ desencadeia o desenvolvimento de células T-citotóxicas, capazes de secretar enzimas proteolíticas, granzima e perforina (BROERE *et al.*, 2011).

Estudos desenvolvidos nos modelos *in vivo* e *in vitro* indicam que os queratinócitos, incluindo os cervicais, secretam constitutivamente baixos níveis de uma variedade de citocinas (como TNF α , IFN- α , IFN- β , TGF- β), fatores de crescimento e quimiocinas e podem ser induzidos por vários estímulos a produzir quantidades mais

significativas dessas moléculas (BARKER *et al.*, 1991; revisão em SCOTT *et al* 2001; GIANNINI *et al* 2002).

Alguns estudos investigaram a capacidade das citocinas, em particular TGF- β , TNF- α e os interferons, de inibir a proliferação *in vitro* de queratinócitos normais e infectados pelo HPV, assim como a expressão dos genes precoces do HPV, *E6* e *E7* cujas proteínas são consideradas críticas para os eventos de transformação das células infectadas (CROOK *et al.*, 1989; HAWLEY *et al.*, 1989). Entretanto os resultados advindos de estudos *in vitro* foram conflitantes, e altamente dependentes das condições experimentais (revisão em SCOTT *et al.*, 2001). Assim, os efeitos variados atribuídos aos diferentes interferons talvez sejam HPVs específicos ou dependentes das linhagens e/ou outras condições experimentais (revisão em SCOTT *et al.*, 2001).

1.4.3 – A RESPOSTA IMUNE ADAPTATIVA

Os diversos componentes celulares envolvidos nas fases de reconhecimento e efetora da resposta imune epitelial adaptativa tem sido alvo de inúmeros estudos tanto nas infecções cutâneas, quanto nas de mucosas causadas pelo HPV. Esses componentes incluem (i) as células dendríticas (incluindo as células de Langerhans) que constituem uma população heterogênea de células hematopoiéticas raras presentes na maioria dos tecidos e que são essenciais para a indução da imunidade e da tolerância (STEINMAN & WITMER, 1978; BIRNBERG *et al.*, 2008; OHNMACHT *et al.*, 2009), e (ii) as células T proliferativas que retornam aos tecidos epiteliais infectados, através de mecanismos envolvendo a ação de quimiocinas, moléculas de adesão e moléculas acessórias.

A rede de DCs é composta por vários subtipos dessas células que variam em sua origem, localização anatômica, tempo de vida e função. Na pele humana, duas principais sub-populações de DCs podem ser discriminadas, as células de Langerhans (CL) e as células dendríticas dermais (CDDs) residentes na derme. Estudos de diferenciação *in vitro* de precursores da medula óssea CD34+, sugerem que as CL e as CDDs são originadas a partir de um precursor mielóide comum, e apresentam alguns aspectos em comum, como a expressão de antígenos MHC classes I e II e de alguns marcadores mielóides e leucocitários (CD45RO, CD13, CD33), assim como a perda dos marcadores de linhagem CD3, CD16, CD19, CD20 e CD56 (LARREGINA *et al.*, 2001).

As CL são as únicas células dendríticas encontradas na epiderme da pele e da mucosa, e contêm grânulos em forma de raquete denominados de Grânulos de Birbeck

nos quais a proteína Langerina, uma lectina tipo C, é um componente essencial (VALLADEAU *et al.*, 2000; revisão em CHOPIN *et al.*, 2012). Adicionalmente as CL expressam um receptor de adesão de membrana (E-caderina), uma ATPase de membrana (adenosina tri-fosfatase) além do receptor de quimiocinas CCR6 (CHARBONNIER *et al.*, 1999; SANTGOETS *et al.*, 2008). As células dendríticas dermais (CDDs) podem ser distinguidas das CL pela expressão de certas proteínas como a lectina ligadora de manose MMR (*Macrophage Mannose Receptor*), a molécula de adesão SIGN (I-CAM específica de CD), o receptor CD36, o fator de coagulação XIIIa e o marcador de macrófago/monócito CD14 (De GRUIJL *et al.*, 2006; revisão em CHOPIN *et al.*, 2012).

Como “sensores-chave” de perigo, as células dendríticas imaturas residem em tecidos periféricos e órgãos, que estejam normalmente muito expostos a antígenos como a pele, mucosas, pulmões, estômago e intestinos. A indução da resposta imune adaptativa tem início, quando um dado patógeno é fagocitado por DCs imaturas que sofrem maturação resultando na inibição da capacidade de captura de antígenos, assim como na mudança na expressão de receptores de superfície, especialmente de quimiocinas (revisão em ROMANI *et al.*, 2003). Em seguida, essas células migram para órgãos linfóides secundários em direção às áreas onde estão presentes os linfócitos T, para que ocorra o evento de apresentação de antígenos. Alguns trabalhos têm demonstrado a importante participação de citocinas (como as interleucinas IL-1 α e IL-1 β , e o TNF- α) e de seus receptores nesse processo, facilitando e guiando a migração das DCs (ROAKE *et al.*, 1995; CUMBERBATCH *et al.*, 1999 e 2003). Esse processo culmina na apresentação apropriada de antígenos processados aos linfócitos T e no início do desenvolvimento de uma resposta imune adequada (VALLADEAU & SAELAND, 2005).

1.5 AS CÉLULAS DE LANGERHANS

As células de Langerhans, intimamente envolvidas no estabelecimento da resposta imune na epiderme, residem na camada mais basal da epiderme e dos demais epitélios, aonde formam uma estrutura em forma de rede (ROMANI *et al.*, 2003). Representam entre 2 a 4% das células da epiderme e sua densidade varia de 200 a 1000 cels/mm² de acordo com a localização anatômica.

Desde a descoberta de que as CL desempenhavam importante função como APCs, essas células têm sido utilizadas como o principal modelo de estudo da biologia das células dendríticas. De fato, importante conhecimento acerca da função das DCs foi

estabelecido em estudos desenvolvidos em CL, como (i) a descoberta de GM-CSF (*Granulocyte-macrophage colony stimulating factor* ou Fator estimulador de Colônia Granulócito - Macrófago) como fator de crescimento crucial para a sobrevivência das células dendríticas (HEUFLER *et al.*, 1988; WITMER-PACK *et al.*, 1987); (ii) o conceito de maturação dessas células; (iii) o aumento na capacidade estimulatória de células T (SHULLER *et al.*, 1985) e (iv) a capacidade de translocação de moléculas de MHCII para a superfície celular após sofrerem maturação (PIERRE *et al.*, 1997), entre outros (ROMANI *et al.*, 1989; LEE *et al.*, 1993; REIS E SOUSA *et al.*, 1993).

Entretanto, CL possuem aspectos próprios que as distinguem das demais células dendríticas, e que lhes conferem propriedades específicas na participação da resposta imune local no seu sítio de ação, o epitélio (revisão em ROMANI *et al.*, 2003).

Embora relativamente pouco seja conhecido acerca da migração das CL recém-geradas na medula óssea para a epiderme, sabe-se acerca de sua renovação na epiderme que apresentam um baixo “*turnover*” ou capacidade de renovação, sendo capazes de permanecer na epiderme por longos períodos, que variam de algumas semanas até 4 meses. Esse fato pode ser devido tanto ao baixo nível de divisão, quanto à elevada longevidade dessas células dentro do ambiente epidermal (CZERNIELEWSKI *et al.*, 1985; KAMATH *et al.*, 2002; MERAD *et al.*, 2002, revisão em ROMANI *et al.*, 2012)

Destaca-se que duas importantes citocinas estão criticamente envolvidas no processo de migração de precursores mielóides das CL para a epiderme, o TGF- β 1 e a proteína MIP-3 α (*Macrophage Inflammatory Protein-3 α*)/CCL20 (BORKOWSKI *et al.*, 1996; GINHOUX *et al.*, 2006). O TGF- β 1, citocina derivada de queratinócitos, é essencial para estimular o influxo de precursores de CL na pele, assim como o adequado desenvolvimento dos grânulos de Birbeck nessas células, pela indução do fator de transcrição Id2 (BORKOWSKI *et al.*, 1996; TAKAHARA *et al.*, 2002). Da mesma forma, a quimiona MIP-3 α /CCL20 produzida por queratinócitos na presença de inflamação, é capaz de se ligar ao receptor CCR6 e possivelmente ao CCR2, presentes na superfície de precursores de CL, favorecendo a migração desses para a epiderme (BORKOWSKI *et al.*, 1997; CHARBONNIER *et al.*, 1999).

1.5.1 ASPECTOS MORFOLÓGICOS E FENOTÍPICOS DAS CÉLULAS DE LANGERHANS

Os grânulos de Birbeck (GB) são estruturas que geralmente apresentam forma de raquete presentes unicamente nas CL, cuja estrutura foi intensamente estudada e estabelecida por microscopia eletrônica (BIRBECK *et al.*, 1961). A função desses grânulos permaneceu obscura durante longo período, com duas principais correntes liderando essa questão: (i) a de que os mesmos seriam organelas envolvidas no transporte de segmentos da membrana plasmática, para a renovação da membrana em compartimentos endossomais citoplasmáticos (HASHIMOTO, 1971; TAKARASHI *et al.*, 1985); (ii) a de que os grânulos estariam envolvidos no estabelecimento de uma via endocítica para captação de antígenos (STOSSEL *et al.*, 1990). A última hipótese tem sido fortemente suportada pela identificação da expressão da molécula de Langerina/CD207 não só na membrana das CL, mas principalmente na membrana dos grânulos de Birbeck da qual é parte estrutural (VALLADEAU *et al.*, 1999 e 2000).

A molécula de Langerina consiste em uma lectina tipo C manose-específica, membro da família de receptores envolvidos na captura de substâncias e patógenos (VALLADEAU *et al.*, 1999 e 2000). Porém, diferente de outros receptores lectina tipo C, Langerina não apresenta co-localização com moléculas de MHC-classe II, e, por essa razão, parece não estar envolvida na via clássica de processamento de antígenos exógenos, mas talvez no fenômeno de apresentação cruzada de antígenos (VALLADEAU *et al.*, 2000).

A expressão de Langerina está diretamente relacionada à formação dos grânulos de Birbeck. De fato, experimentos de transfecção do cDNA de Langerina em fibroblastos, foram capazes de mostrar *in vitro* a criação de uma rede compacta de estruturas de membrana com o aspecto típico de grânulos de Birbeck, ou seja, estruturas sobrepostas e com aspecto de *zipper* induzidas pela molécula de Langerina (VALLADEAU *et al.*, 2000). Os últimos autores sugeriram que a capacidade de formação dos GB pela Langerina seria uma consequência da sua função de captura de antígenos, permitindo o transporte antigênico através dessas organelas, e fornecendo o acesso a uma via não-clássica de processamento de antígenos. Considerando que as CD são capazes de realizar a apresentação cruzada (*cross-presentation*) entre as moléculas MHC de classes I e II (ROMANI *et al.*, 1989; DEN HAAN *et al.*, 2001), os autores propuseram que o material

endocitado pelas CL, poderia ganhar acesso à membrana dessas células por meio da via de MHC classe I (VALLADEAU *et al.*, 2000).

O papel das CL em disseminar o vírus HIV para células T CD4⁺ de memória foi investigado por vários estudos (POPE *et al.*, 1994; SUGAYA *et al.*, 2004), sendo posteriormente verificada a capacidade das CL de se ligar ao vírus via Langerina e degradá-lo em seus grânulos de Birbeck, impedindo assim a transmissão viral para células T (DE WITTE *et al.*, 2007). Sugere-se que o vírus do sarampo possa ser erradicado de forma similar pelas células de Langerhans (VAN DER VLIST *et al.*, 2011; revisão em ROMANI *et al.*, 2012).

Assim, a utilização de anticorpos anti - Langerina constitui não só uma excelente ferramenta para o estudo funcional dos grânulos de Birbeck, mas também para o estudo e identificação das CL em importantes aspectos biológicos, como a sua ontogenia, maturação e ativação (VALLADEAU *et al.*, 1999 e 2000).

1.5.2 PROPRIEDADES FUNCIONAIS DAS CÉLULAS DE LANGERHANS

Como mencionado, as células dendríticas da epiderme (CL) e aquelas derivadas da derme (CDDs) não são completamente idênticas, diferindo tanto funcionalmente como na expressão de moléculas de superfície.

As CL apresentam maior capacidade de captura de antígenos, enquanto que as CDDs parecem possuir maior capacidade de apresentação de antígenos. Além da captura, as CL são capazes de transportar antígenos, incluindo auto-antígenos da epiderme para linfonodos próximos. Um elegante estudo demonstrou intenso transporte de melanossomas da epiderme e da derme para linfonodos próximos em camundongos normais, que foi marcadamente abolido em camundongos *knock-out* para TGF- β em cujos tecidos as CL estavam praticamente ausentes (HEMMI *et al.*, 2001).

As diferenças observadas na expressão de lectinas tipo C, sugerem que ambos os subgrupos de DCs da pele (CL e CDD) podem reconhecer e responder a um diferente espectro de patógenos (ROMANI *et al.*, 2003; SANTEGOETS *et al.*, 2008, ROMANI *et al.*, 2012). Além disso, as CDD geradas *in vitro*, induzem mais eficientemente a diferenciação de células B *naive* em células plasmáticas secretoras de IgM, em resposta à estimulação por CD40 e IL-2, enquanto que as CL não apresentam essa propriedade. Porém estudos *in vitro* revelam que as CL parecem ser mais potentes estimuladoras de

linfócitos T citotóxicos, assim como indutoras mais potentes de uma resposta Th1 (CAUX *et al.*, 1997; DE SAINT-VIS *et al.*, 1998).

Como mencionado, por estímulos de diversas origens (antígenos/processo inflamatório ou liberação de citocinas), as CL são induzidas a migrar de seus sítios periféricos para próximo de tecidos linfóides onde se encontram os linfócitos T. Além dos antígenos ou estímulos inflamatórios, sinais como quimiocinas ou receptores de quimiocinas, poderiam funcionar como agentes mediadores e recrutadores de células dendríticas (SCOTT *et al.*, 2001; FLORES *et al.*, 2005; LEVI *et al.*, 2005; VALLADEAU *et al.*, 2005). Esses eventos complexos culminarão na maturação das CL e na apresentação apropriada de antígenos aos linfócitos T, para desencadeamento de uma resposta imune eficiente, como descrito adiante.

1.5.3 MATURAÇÃO, ATIVAÇÃO E MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS DE LANGERHANS

As células dendríticas incluindo as células de Langerhans, apresentam morfologia diversa de acordo com o seu estágio de maturação. Estudos demonstraram que existem dois tipos de CDs que diferem fenotipicamente e funcionalmente, denominadas de CDs imaturas e maduras (FLORES *et al.*, 2005; HAYATI & ZULLKARNAEN *et al.*, 2007; SANTGOETS *et al.*, 2008). Considera-se que as células imaturas são capazes de identificar e capturar antígenos, enquanto que as células maduras possuem a capacidade de funcionar como APCs. As DCs residentes da pele e mucosas (CL da epiderme e CDs da derme) são células imaturas típicas, que necessitam sofrer maturação para funcionar como APCs. A característica diferencial entre essas duas populações é a expressão de algumas moléculas acessórias, especialmente CD83, que pode ser demonstrada imunohistoquimicamente (HAYATI & ZULLKARNAEN 2007, SANTGOETS *et al.*, 2008).

As células de Langerhans imaturas que residem na periferia da epiderme normal são altamente especializadas na identificação de antígenos, estando posicionadas nesse sítio de maneira ideal para a detecção de qualquer patógeno que venha a invadir a barreira da epiderme. Essas células verificam constantemente o seu micro-ambiente à procura desses antígenos, pela extensão e retração de seus prolongamentos ou dendritos (ROMANI *et al.*, 2003; STEINMAN *et al.*, 2007). Após a captura dos antígenos pelas CL, ocorre o processamento desses (Figura 4A) e a apresentação dos antígenos

processados na superfície dessas células, por meio das moléculas MHC classes I ou II e da ligação a citocinas pró-inflamatórias, eventos que garantem a ativação das CL.

Após ativação, há um aumento drástico na expressão de moléculas co-estimulatórias na superfície das CL, e o início da produção de citocinas requeridas para o desencadeamento de uma resposta inflamatória do tipo Th1 ou Th2 (Figura 4B), como por exemplo, do receptor de quimiocina CCR7, que apresenta importante função na migração dessas células para o encontro com células T nos linfonodos (ROMANI *et al.*, 2003). Além disso, quando ativadas essas células diminuem a expressão de E-caderina, integrina de adesão celular responsável pela manutenção das CL na epiderme (TANG *et al.*, 1993).

Assim, após a fase de reconhecimento e transporte de antígenos ocorre a migração das CL para órgãos linfóides periféricos, eventos essenciais para garantir a interação das CL com células T. As citocinas parecem ser cruciais na mediação do processo de migração das CL, como a IL-1 α e o TNF- α (produzidas principalmente por queratinócitos) e a IL-1 β (produzida principalmente pelas células de Langerhans). Porém, a IL-10, produzida por queratinócitos atua como inibidora da migração das CL (CAUX *et al.*, 1997), enquanto que o GM-CSF também produzido por queratinócitos, promove o início da maturação das células de Langerhans (revisão em WANG *et al.*, 1999 e em ROMANI *et al.*, 2003).

Dessa forma, quando as CL chegam aos linfonodos adquirem uma superfície fenotipicamente característica de CDs maduras, capazes de ativar as células T CD8⁺ ou T CD4⁺ através da apresentação cruzada com as moléculas MHC de classe I e II, respectivamente (Figura 4C). Destaca-se a co-estimulação estabelecida pela ligação de CD28 (expresso na superfície das células T) com o ligante da família B7 (expresso na membrana das CL) e outros sinais co-estimulatórios das CDs, que transmitem o estímulo de ativação para células T tornando-as efetoras, ou seja, linfócitos T CD8⁺ citotóxicos e células T CD4⁺ *helper* (auxiliar). Células efetoras adquirem moléculas que auxiliam na sua migração para os tecidos afetados, no qual exercerão sua função imune especificamente reconhecendo e eliminando as células infectadas e/ou alteradas, como apresentado na Figura 4A (JANEWAY *et al.*, 2002; TINDLE *et al.*, 2002; ROMANI *et al.*, 2003; STEINMAN *et al.*, 2007).

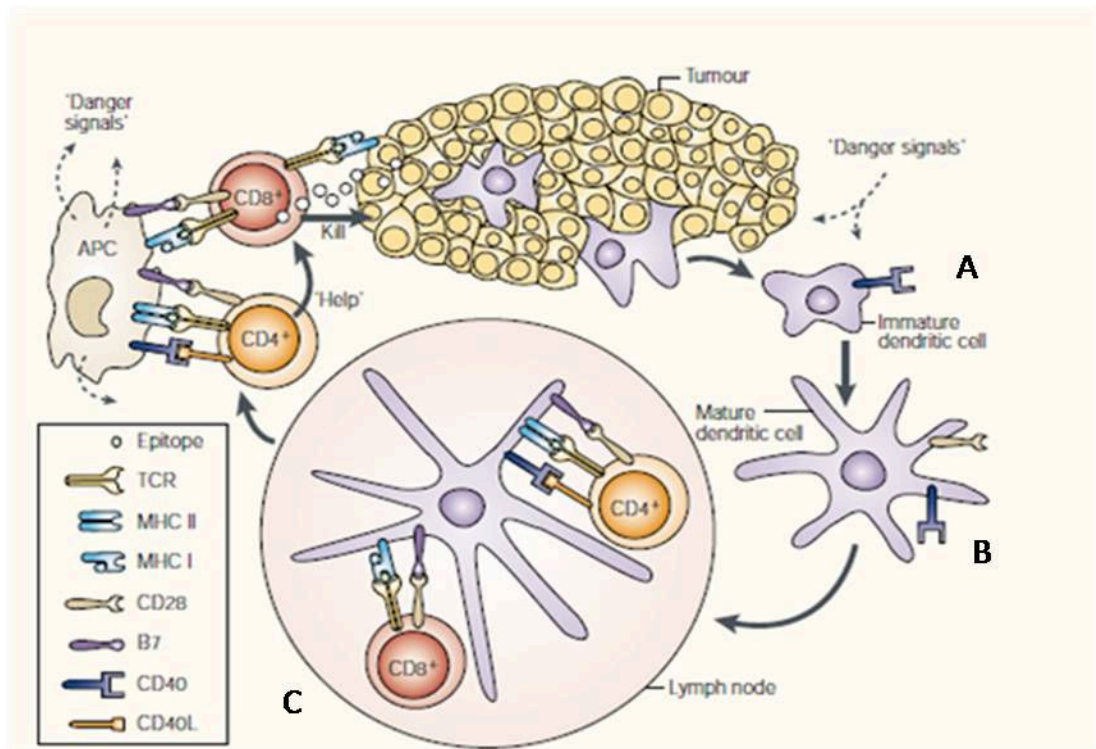


FIGURA 4: Reconhecimento e resposta dos sistemas imunes Inato e Adaptativo à presença de células alteradas e ou infectadas. A, B -As CDs/CL imaturas reconhecem proteínas antigênicas que uma vez internalizadas são processadas em peptídeos e expostas através de MHC classe I e II. C-Quando as CL chegam aos linfonodos adquirem uma superfície fenotipicamente característica de CD madura capaz de ativar as células T CD8+ ou T CD4+ através da apresentação cruzada com as moléculas MHC classe I e II, respectivamente. Destaca-se a co-estimulação estabelecida pela ligação de CD28 com o ligante da família B7 e outros sinais co - estimulatórios das células dendríticas que transmitem o estímulo de ativação para células T tornando-as efetoras. Células T efetoras adquirem moléculas que auxiliam na sua migração para os tecidos afetados, no qual exercerão sua atacando especificamente as células alteradas e/ou infectadas. Fonte: TINDLE, 2002 (modificado).

1.5.4 O PAPEL DAS CÉLULAS DE LANGERHANS NO CONTROLE DA INFECÇÃO PELO HPV

Considerando que os linfócitos T necessitam do transporte e processamento de antígenos, a sua dependência funcional das DCs/CLs constitui requerimento absoluto para que possam eficientemente, iniciar e exercer as suas funções como células efetoras.

Devido ao seu grande potencial fagocitário dentro do epitélio escamoso, as células de Langerhans têm-se mostrado as primeiras células responsáveis pela função de reconhecimento e apresentação de antígeno, constituindo-se em elementos importantes da defesa imune local (ROMANI *et al.*, 1989 e 2003). Portanto, como destacado, dado o confinamento da infecção pelo HPV na camada epitelial, a presença de células dendríticas ou de células de Langerhans nesse sítio, parece ser crucial na geração de uma resposta imune eficiente (MERAD *et al.*, 2008; DOORBAR *et al.*, 2012).

O papel da imunidade celular, especialmente da importante ação dos linfócitos T CD8+ e CD4+ no controle à infecção pelo HPV ainda não foi completamente esclarecido, sendo que os trabalhos direcionados a elucidar essa questão foram principalmente desenvolvidos no modelo *in-vitro*, apresentando muitas vezes resultados contraditórios (revisão em SCOTT *et al.*, 2001; FRAZER *et al.*, 2004). Por outro lado, inúmeros trabalhos têm demonstrado que o HPV é capaz de induzir vários mecanismos que resultam na subversão da resposta imune do hospedeiro (revisão em TYRING *et al.*, 2000; em TINDLE, 2002; em MANICKAM *et al.*, 2007; em PATEL *et al.*, 2009; em DOORBAR *et al.*, 2012; em STANLEY, 2012; em CONESA-ZAMORA, 2013).

Os estudos que foram direcionados a análise da resposta imune local à infecção pelo HPV, e que avaliaram a densidade das células de Langerhans em lesões HPV positivas (LEIs, condilomas e verrugas genitais) em comparação a lesões HPV negativas (LEIs), ou mesmo a tecidos cervicais de pacientes controles não infectadas, também diferiram quanto aos resultados encontrados. A grande maioria desses trabalhos verificou uma redução do número das CL em lesões HPV positivas (MORRIS *et al.*, 1983; McARDLE *et al.*, 1986; TAY *et al.*, 1987; DRIJKONINGEN *et al.*, 1988; HAWTHORN *et al.*, 1988; VIAC *et al.*, 1990; MORELLI *et al.*, 1992 e 1993; LEHTINEM *et al.*, 1993; CONNOR *et al.*, 1999; FLORES *et al.*, 2006). Entretanto, outros trabalhos não encontraram alteração significativa da densidade dessas células em lesões cervicais HPV positivas em comparação à amostras controles não infectadas (VAYRINEM *et al.*, 1984; AL-SALEH *et al.*, 1995).

Portanto, o importante papel das CL no controle da infecção local pelo HPV na mucosa cervical e no controle da progressão das Lesões Escamosas Intra-epiteliais rumo ao carcinoma invasor, permanece por ser investigado.

1.5.5 O PAPEL DAS CÉLULAS DE LANGERHANS NAS LESÕES ESCAMOSAS INTRA-EPITELIAIS

Com o objetivo de investigar a participação das CL - elementos chave no reconhecimento e apresentação de antígeno - no controle da progressão das neoplasias cervicais, diversos trabalhos foram direcionados à análise comparativa da densidade das CL em amostras controle e histopatologicamente afetadas por graus diversos de NICs. A maior parte desses estudos foi baseada na detecção imuno-histoquímica de moléculas de superfície das CL como S100, CD1a, CD83 e Langerina.

A proteína S100, uma proteína ligadora ao cálcio presente em uma grande variedade de tecidos, foi observada pela primeira vez em células de Langerhans da pele por Cochia e colaboradores (1981). Embora não seja específico para a identificação desse tipo celular, o anticorpo anti-S100 marca fortemente as extensões dendríticas de células de Langerhans, característica morfológica que a distingue de outras células do epitélio cervical (McARDLE *et al.*, 1986; TAY *et al.*, 1987a; HACHISUGA *et al.*, 1989 e 2001; XIE *et al.*, 1990; AL-SALEH *et al.*, 1995; TAKEHARA *et al.*, 1996; ABDU *et al.*, 1999; CONNOR *et al.*, 1999; UCHIMURA *et al.*, 2004; LEVI *et al.*, 2005; CAMPANER *et al.*, 2007).

A glicoproteína CD1a, que pertence à família de moléculas apresentadoras de antígenos não-protéicos aos linfócitos T, consiste em um marcador eficiente da superfície de células de Langerhans, especialmente das células imaturas, em amostras cervicais (VAYRINEM *et al.*, 1984; TAY *et al.*, 1987a; HAWTHORN *et al.*, 1988; HUGHES *et al.*, 1988; MORELLI *et al.*, 1992 e 1993; CONNOR *et al.*, 1999; MOTTA *et al.*, 1999; FLORES *et al.*, 2006; HAYATI & ZULLKARNAEN *et al.*, 2007).

Células dendríticas maduras expressam CD83 e altos níveis de CD40/80/86, enquanto que as células imaturas expressam altos níveis de CD1a e baixos níveis de CD40/80/86 (SANTGOETS *et al.*, 2008). Estudos direcionados à quantificação das células dendríticas em carcinoma mamário, observaram que CDs imaturas residiam principalmente no interior do tumor, enquanto as células maduras se localizavam na área peritumoral. Os autores concluíram que a infiltração de células maduras (CD83+) nos tumores, seria um parâmetro favorável ao prognóstico de sobrevivência em pacientes com câncer de mama (BELL *et al.*, 1999; IWAMOTO *et al.*, 2003).

Contudo, um único estudo foi direcionado a análise do número de CL maduras (CD83) e imaturas (CD1a) na cérvix uterina. Ao comparar a densidade dessas células

em amostras de tecidos normais, NICIII e câncer, Hayati & Zullkarnaen (2006) observaram aumento significativo de células CD83+ de acordo com a progressão das lesões, associado a uma marcante redução na densidade de CLs CD1a+ (imaturas) de acordo com a severidade das lesões cervicais.

A expressão de Langerina em células de Langerhans foi inicialmente demonstrada por imuno-histoquímica em amostras de diversos órgãos como pele, linfonodos e timo humanos (KASHIHARA *et al.*, 1986), sendo posteriormente utilizada em dois únicos trabalhos para a análise da densidade de CL em biópsias cervicais derivadas de amostras de pacientes (GIANNINI *et al.*, 2002; FLORES *et al.*, 2006). Embora a expressão de Langerina não seja exclusiva das CL, é amplamente aceito que no epitélio cervical as células de Langerhans são as únicas células a expressar essa proteína. Langerina consiste em uma lectina tipo C associada à membrana e apresentando de 40 a 42 KDa, expressa não somente na superfície celular, mas também intracelularmente em associação com os grânulos de Birbeck (KASHIHARA *et al.*, 1986; VALLADEAU *et al.*, 1999 e 2000), o que a torna um excelente marcador deste tipo celular (ROMANI *et al.*, 2012).

Como mencionado, um grande número de trabalhos descritos na literatura foi dedicado, à análise da densidade das CL em amostras provenientes do trato genital feminino, especialmente da cérvix. Contudo, esses estudos apresentaram resultados conflitantes no que diz respeito ao número de células encontrado.

Alguns estudos observaram uma redução do número das CL em amostras cervicais, com significativa associação entre o número dessas células e a severidade das lesões cervicais, utilizando anticorpo **anti-S100** (TAY *et al.*, 1987a; AL-SALEH *et al.*, 1995; CONNOR *et al.*, 1999; UCHIMURA *et al.*, 2004), **anti-CD1a** (TAY *et al.*, 1987a; HAWTHORN *et al.*, 1988; HUGHES *et al.*, 1988; VIAC *et al.*, 1990; MORELLI *et al.*, 1992 e 1993; CONNOR *et al.*, 1999; MOTTA *et al.*, 1999; FLORES *et al.*, 2006; HAYATI & ZULLKARNAEN *et al.*, 2007) e **anti-Langerina** (FLORES *et al.*, 2006). Esses resultados são compatíveis com a hipótese, de que uma redução local das CL poderia ser responsável pela geração de uma resposta imune celular ineficiente, incapaz de deter a progressão das lesões Intra-epiteliais de baixo grau em direção a lesões invasoras mais severas.

Entretanto, de maneira oposta, outros estudos, utilizando o anticorpo **anti-S100** verificaram um aumento da densidade das CL em amostras cervicais portadoras de graus distintos de alterações cervicais em comparação às amostras controles (MORRIS *et al.*, 1983; McARDLE *et al.*, 1986; TAKEHARA *et al.*, 1996; CAMPANER *et al.*, 2007).

Dois estudos que utilizaram a técnica de impregnação por ZnI e OsO₄ (CAORSI *et al.*, 1986) e por AuCl₃ (ABDOU *et al.*, 1999) para a contagem das CL em amostras cervicais, também observaram um aumento do número dessas células, quando compararam amostras normais com aquelas portadoras de Neoplasias Intra-epiteliais Cervicais. Esses autores defenderam a hipótese de que o aumento observado das CL, poderia ser devido a um possível aumento da migração das CL para o sítio da lesão cervical. Outra hipótese também considerada foi a de que, embora presentes em número normal ou elevado as CL poderiam apresentar alterações funcionais e morfológicas. De fato, alterações morfológicas das CL já foram descritas em alguns estudos, como a diminuição do número de dendritos e o volume de citoplasma dessas células (MORRIS *et al.*, 1983; UCHIMURA *et al.*, 2004).

Portanto, o importante papel das CL no controle da infecção local pelo HPV na mucosa cervical e no controle da progressão das Lesões Escamosas Intra-epiteliais permanece por ser mais completamente investigado.

1.6 O PAPEL DA IMUNIDADE CELULAR NO CONTROLE DA INFECÇÃO PELO HPV E DAS LESÕES CERVICAIS

A demonstração da resposta imune celular específica ao HPV no sangue periférico de pacientes tem sido um desafio, uma vez que alguns fatores têm dificultado a realização satisfatória de estudos relacionados, incluindo: (i) a impossibilidade de manutenção do HPV *in vitro*; (ii) a observada variabilidade inter-laboratorial dos antígenos-alvo, dos ensaios utilizados, das populações estudadas, assim como dos métodos empregados na tipagem desses vírus; (iii) a ausência de manifestações sistêmicas significativas decorrentes da infecção pelo HPV, considerando que a mesma é sempre confinada aos sítios de células escamosas epiteliais.

Apesar desses fatos, nos últimos anos têm-se observado avanços significativos na elucidação da importância da imunidade celular na história natural da infecção pelo HPV (revisão em SCOTT *et al.*, 2001; PATEL & CHIPLUNKAR, 2009). Em um estudo *in vitro* que avaliou a resposta de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) frente à estimulação de proteínas do HPV, observou-se maior proliferação do número de células T CD4⁺ frente aos peptídeos do HPV-16, nos casos que regrediram em comparação àqueles que persistiram (KIM *et al.*, 2012). Em estudo anterior desenvolvido pelo mesmo grupo, uma maior porcentagem de linfócitos T CD8⁺ foi verificada em resposta ao

antígeno E6 do HPV-16 em PBMCs provenientes de pacientes que apresentaram regressão da lesão (NAKAGAWA *et al.*, 2010).

Entretanto, considera-se que a resposta imune celular local ocorrendo diretamente na cérvix uterina, estaria mais diretamente relacionada tanto ao controle das infecções quanto das lesões que acometem esse sítio anatômico. Assim, mudanças na imunidade celular da cérvix uterina poderiam ter implicações diretas no desenvolvimento de diferentes graus de lesões cervicais. Porém, escassos estudos foram direcionados à análise das subpopulações linfocitárias em tecidos cervicais.

Dois estudos, que avaliaram a presença de células T CD4 em lesões da cérvix uterina, observaram o predomínio dessas células em lesões de baixo grau associada a lesões verrucosas (COLEMAN *et al.*, 1994; HONG *et al.*, 1997). Em um estudo baseado na análise de subpopulações de linfócitos T no epitélio e no estroma de amostras controles *versus* NICI, III e câncer, observou-se predominância de linfócitos T CD4+ no estroma de lesões do tipo NICI com capacidade de regressão, com maior razão CD4+/CD8+ do que a observada em NICI progressivas, NICIII e câncer invasivo. Nas amostras de câncer houve predomínio de células T CD8+ e CD45RO+ em relação aos linfócitos T CD4+ (MONNIER-BENOIT *et al.*, 2006). Maluf e colaboradores (2008) por meio da técnica de imuno-histoquímica constataram forte expressão do marcador de linfócitos T CD3 em pacientes com NICIII que apresentaram recorrência da lesão (MALUF *et al.*, 2008). Similarmente, outros estudos observaram um elevado número de linfócitos T CD8+ em amostras de NICIII (TAKEHARA *et al.*, 1996) e câncer (MONNIER-BERNOIT *et al.*, 2006) em comparação aquele verificado em amostras controle.

Entretanto, ao analisarem a densidade de linfócitos T CD4+ e CD8+ na cérvix uterina de mulheres infectadas pelo HPV, Alves e colaboradores (2010) observaram maior quantidade de células T CD8+ em amostras de NICII e NICIII. A presença de linfócitos T CD4+ foi observada em NICII e III e em 87,5% das amostras de câncer, enquanto apenas 50% das amostras de CCE demonstraram semelhante proporção de células T CD8+ (ALVES *et al.*, 2010).

Um estudo recente foi direcionado à análise do significado prognóstico da frequência de subpopulações de células T CD4+, CD8+ e CD11+ em pacientes afetadas por NICII e NICIII haviam sido submetidas à cirurgia de conização (CAF). Observou-se que uma maior densidade de células T CD4+ apresentou correlação significativa com maior taxa de regressão da doença, associação não verificada com células T CD8 citotóxicas (ORIGONI *et al.*, 2013). Contudo, outro estudo observou que amostras de

câncer cervical apresentando grandes áreas de infiltrados de linfócitos T CD8⁺ foram associadas à ausência de metástase em linfonodos adjacentes (PIERSMA *et al.*, 2007).

Portanto, constata-se que os trabalhos que foram direcionados à análise de subpopulações de linfócitos T no sangue periférico, especialmente aqueles baseados na resposta *in vitro* a antígenos do HPV produziram resultados conflitantes. Além disso, a maioria dos trabalhos baseada na análise tecidual das subpopulações linfocitárias não avaliou a presença da infecção pelo HPV.

Com base nos aspectos acima mencionados, destaca-se a necessidade da realização de estudos direcionados à avaliação da resposta imune celular da cérvix uterina na progressão das lesões cervicais, no importante contexto da infecção pelo HPV.

1.7 O PAPEL DA GRANZIMA NA ATIVAÇÃO DE LINFÓCITOS T CITOTÓXICOS NA CÉRVIX UTERINA

Dois mecanismos básicos são responsáveis pela lise das células-alvo por linfócitos T citotóxicos: aquele mediado pela interação do receptor Fas – FasL (ligante de Fas) e aquele baseado na ação de grânulos citoplasmáticos. Este último consiste no mais importante mecanismo de destruição de células-alvo, e envolve a liberação de moléculas efetoras citolíticas (entre elas a perforina e a granzima), que levam à rápida fragmentação do DNA da célula-alvo e apoptose.

A família das granzimas compreende um grupo especial de serino-proteases que permanecem armazenadas, completamente processadas e na forma ativa, em grânulos citoplasmáticos dos linfócitos T citotóxicos, diferentemente de outras serino-proteases que permanecem armazenadas na forma pré-ativa de zimogênio como a tripsina (JENNE & TSCHOPP, 1988). As granzimas são classificadas em 8 grupos de enzimas (A, B, C, D, E, F, G e H) que compartilham algumas características estruturais. A granzima B (GrB), codificada pelo gene *C11* e também conhecida como CCPI (*Cytotoxic cell proteinase I* ou proteinase I da célula citotóxica) é a variante mais abundante nos linfócitos T citotóxicos, sendo a sua função fisiológica relacionada aos eventos proteolíticos no processo de reconhecimento de células-alvo (HEUSEL *et al.*, 1994).

As granzimas liberadas dos grânulos dos linfócitos T citotóxicos atuam na célula-alvo determinando o desencadeamento de uma série de eventos que culminam com a morte celular por apoptose, processo que tem a função de destruir as células infectadas por vírus ou as células malignas antes que se perpetue a infecção viral ou que se

desenvolva um câncer. O mecanismo de entrada da granzima B no citoplasma das células-alvo ainda não é completamente elucidado. Em estudos iniciais acreditava-se que as granzimas ganhavam acesso à célula-alvo por meio dos poros formados na membrana pela perforina, mas trabalhos posteriores sugeriram que granzima B entra na célula-alvo via receptor manose-6-fosfato-cátion-dependente, sendo, no entanto, o papel da perforina importante na liberação de granzima B das vesículas endocíticas (LORD *et al.*, 2003). Uma vez no citoplasma da célula-alvo, a granzima B é capaz de induzir a apoptose de células-alvo infectadas ou transformadas por duas vias diferentes (i) pela via dependente de caspase, baseada na ativação de DNAase e na formação do apoptossoma, e (ii) pela via caspase-independente, envolvendo a translocação de Bax, que leva à liberação citoplasmática do citocromo C. Portanto, considera-se que ambas proteínas, perforina e granzima B, desencadeiem de forma sinérgica o sinal para que ocorra apoptose nas células tumorais (BLINK *et al.*, 1999).

Um dos primeiros estudos a avaliar a presença de células T / granzima B⁺ em amostras cervicais, verificou que embora a maioria dos carcinomas cervicais analisados apresentassem extensas áreas de infiltração por linfócitos T, observou-se ausência da expressão da granzima B em quase todos os casos avaliados (CROMME *et al.*, 1995). Em estudo posterior desenvolvido pelo mesmo grupo, a análise de células T expressando granzima B em lesões pré-malignas foi avaliada pela primeira vez, sendo observada uma reduzida taxa de ativação de células T (linfócitos TIA positivos) em amostras de NIC, enquanto que alguns exemplares de carcinomas de colo exibiram maciça infiltração de linfócitos T ativados. Além disso, observou-se absoluta correlação entre o número de linfócitos T CD8⁺ ativados (TIA⁺) e aqueles expressando granzima B de acordo com a severidade das lesões Intra-epiteliais (BONTKES *et al.*, 1997).

Um estudo demonstrou que a marcação por granzima B poderia ser considerada como um valioso marcador de melhor prognóstico nas lesões Intra-epiteliais de alto grau. Um número crescente de linfócitos T granzima B⁺ foi observado em amostras de colo normal, de NIC de alto grau e no carcinoma invasor com significativa redução na expressão da granzima B no estroma cervical dos casos de NIC de alto-grau recidivantes (KONDO *et al.*, 2005).

Portanto, em face da constatação de que os linfócitos T citotóxicos são as principais células efetoras no processo de erradicação de células infectadas por vírus e neoplásicas, e que por meio da ação da perforina a granzima B é capaz de induzir a apoptose em células-alvo, torna-se importante realizar a análise da densidade de células

granzima B⁺, em comparação à densidade de outras células que também apresentam importante papel no estabelecimento da resposta imune na cérvix uterina.

2. JUSTIFICATIVA

O câncer do colo do útero corresponde à terceira neoplasia mais frequente na população feminina, e no Brasil é a quarta causa de morte de mulheres por câncer. Estudos epidemiológicos apontam que, embora apresente uma origem multifatorial é principalmente causado pela infecção persistente por tipos oncogênicos do HPV. O câncer cervical é precedido por lesões pré-invasoras histopatologicamente classificadas como Neoplasias Intra-epiteliais Cervicais de graus I, II, III, de acordo com o nível de acometimento das camadas do epitélio cervical. Grande parte das infecções causadas pelo HPV são extintas como resultado do estabelecimento de uma resposta imune efetiva. No entanto, a maioria das infecções causadas por HPVs de alto risco apresentam maior taxa de progressão para lesões cervicais de alto grau ou câncer.

Mudanças na resposta imune da mucosa do colo uterino podem ter implicações para o desenvolvimento de diferentes graus de NIC e câncer cervical. A mucosa cervical possui sítios tanto indutores quanto efetores da resposta imune, e a infecção por HPV pode interferir com os mecanismos imunes locais tanto na fase de indução (apresentação de antígenos) quanto na fase efetora (ativação de células imuno-competentes).

Dentro do epitélio escamoso, as células de Langerhans correspondem às células responsáveis pelo reconhecimento, transporte e apresentação de antígenos, constituindo-se essas APCs em elementos-chave na defesa imune local da cérvix uterina, na fase inicial da resposta imune. Dentre os marcadores preferencialmente expressos pelas CL, destacam-se a molécula da Langerina e de CD1a, sendo a última marcadora de células imaturas.

Muitos estudos já foram desenvolvidos para a determinação do número de CL em amostras cervicais normais ou apresentando graus distintos de lesões escamosas intra-epiteliais, sendo a maior parte desses baseados na detecção imunohistoquímica de S100, CD1a e Langerina. Contudo, o conjunto dos resultados obtidos nesses estudos quanto à densidade das CL em lesões cervicais, e de acordo com a severidade dessas lesões cervicais, apresenta controvérsias. Além disso, existe uma lacuna na literatura acerca de estudos sobre a densidade das CL (imaturas ou maduras) no contexto da infecção pelo HPV, especialmente considerando a presença de tipos específicos.

Portanto, o importante papel das CL no controle da infecção local pelo HPV na mucosa cervical, e no controle da progressão das lesões escamosas intra-epiteliais

permanece por ser melhor investigado. A nossa hipótese é a de que existam alterações na densidade das subpopulações de CL de acordo com o grau da lesão cervical, e com os tipos de HPV presentes nessas lesões.

Assim, acreditamos que a análise (i) da densidade das células de Langerhans totais expressando os marcadores S100 e Langerina, e (ii) da densidade de CL imaturas e maduras, respectivamente expressando, as moléculas de CD1a e CD83, em amostras cervicais portadoras de graus distintos de lesões e câncer cervical, e da infecção por HPVs de alto risco, contribuirá de forma relevante para um melhor entendimento da resposta imune local na progressão das neoplasias cervicais.

Como destacado, a atividade eficiente de CL como APCs contribui diretamente à ativação das células envolvidas no estabelecimento da fase adaptativa da resposta imune na cérvix uterina, os linfócitos T CD4 e CD8.

Com base nessas considerações ressaltamos a importância da infecção pelo Papilomavírus humano na patogênese do CC e lesões precursoras, e na necessidade de desenvolvimento de estudos que investiguem o papel da resposta imune celular no controle dessa infecção e da progressão do CC. Dessa forma, o presente estudo se propõe a avaliar no epitélio e no estroma de amostras cervicais portadoras de níveis distintos de lesão e câncer, a densidade de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, além de linfócitos expressando granzima B⁺. A nossa hipótese é a de que há diferenças nas subpopulações linfocitárias localmente recrutadas para o estabelecimento de uma resposta celular efetiva e que atue no controle da progressão da lesão e/ou da infecção por HPVs de alto risco.

Pretende-se, por meio desse estudo, avaliar de forma conjunta a densidade, o perfil da maturação ou citotoxicidade das principais células envolvidas, tanto na fase inicial quanto na fase efetora da resposta imune local da cérvix uterina.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o papel da resposta imune local em lesões escamosas intra-epiteliais e no câncer cervical associados à infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) por meio da análise da densidade, do nível de maturação e da citotoxicidade das células envolvidas na resposta imune inata e adaptativa da cérvix uterina.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Em amostras cervicais com distintos graus de neoplasias intra-epiteliais, câncer ou amostras controle, avaliar:

- O número de células de Langerhans totais, imaturas e maduras.

- A densidade de linfócitos T CD4+, T CD8+ e granzima B positivos (no epitélio e no estroma.

- A presença do DNA do HPV e de oito tipos oncogênicos por meio da técnica de *Nested* e *Hemi-nested* PCR.

- A correlação existente entre o número de células de Langerhans maduras e imaturas e de linfócitos T CD4+, CD8+ e granzima B positivos, em comparação à presença da infecção pelo Papilomavírus Humano.

4. METODOLOGIA

4.1 PREPARAÇÕES DAS AMOSTRAS CERVICAIS: COLETA, FIXAÇÃO E PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Neste trabalho, foram analisadas 66 amostras cervicais obtidas por Cirurgia de Alta Frequência (CAF), 15 amostras de câncer invasor obtidas por biópsia ou cirurgia, todas correspondentes a espécimes incluídos em parafina. As amostras foram selecionadas de um banco de amostras arquivadas no Laboratório de Anatomia Patológica Tafuri, Belo Horizonte, MG, e gentilmente cedidas pelo Dr. Alexandre Tafuri, coordenador do referido laboratório. Destaca-se que tais amostras foram concedidas sob a forma de empréstimo durante o período de realização da pesquisa, ficando os blocos de parafina utilizados no presente estudo sob a guarda provisória do Laboratório de Patogênese Molecular, do Departamento de Morfologia, ICB, UFMG, mediante a assinatura de um termo de responsabilidade. O diagnóstico histopatológico foi independentemente, revisado e confirmado por três médicos patologistas com larga experiência profissional.

Assim, as amostras avaliadas incluíram 10 amostras de mucosa cervical normal sem alterações histopatológicas e obtidas de pacientes submetidas à histerectomia, 21 amostras de NICI, 23 de NICII, 22 amostras de NICIII e 15 amostras de câncer cervical.

A prática da coleta amostral para realização de exame histopatológico de rotina foi realizada sob visão colposcópica por médicos ginecologistas. Para realização das Cirurgias de Alta Frequência utilizou-se o aparelho *Wavetronic 2000* acoplado ao aspirador de fumaça. Após a coleta, as amostras de tecido foram processadas rotineiramente para inclusão em parafina, sendo inicialmente realizada a fixação dos tecidos em formalina a 10% por 24 horas. Em seguida, os fragmentos foram submetidos à desidratação gradativa em álcool absoluto, posteriormente à diafanização em xilol e à impregnação e inclusão em parafina, sob temperatura média de 75°C. Destaca-se que para a realização desse trabalho, foram utilizadas amostras cervicais coletadas no período de 2004 a 2009.

A utilização destas amostras parafinadas para fins de pesquisa havia sido aprovada pelo Comitê em Ética e Pesquisa (COEP) da UFMG, em dois outros estudos anteriores. Para a realização do presente estudo, o projeto de pesquisa foi encaminhado e submetido à aprovação do COEP – UFMG (Anexo 1, Seção de Anexos).

4.2 EXTRAÇÃO DO DNA DAS AMOSTRAS CERVICAIS

Para a realização da extração do DNA, foi necessária a obtenção de cortes histológicos em micrótomo (*MICROM*, Modelo HM335E), realizada no Laboratório de Experimentação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, do Departamento de Morfologia, ICB, UFMG. Cinco cortes com cerca de 10µm foram obtidos de cada amostra, e transferidos com o auxílio de um palito estéril para um microtubo de 1,5mL. No intervalo de cada bloco, o micrótomo foi cuidadosamente limpo com xilol e a navalha do micrótomo também cuidadosamente limpa com xilol, etanol e solução de hipoclorito de sódio a 2,5%, nesta ordem, para prevenir a contaminação cruzada entre as amostras (GREER *et al.*, 1991; WRIGHT & MANOS, 1990; SHIMIZU & BURNS, 1995). Além disso, no intervalo entre cada amostra foram realizados dois cortes de um bloco que continha apenas parafina, sendo esses cortes considerados os controles negativos para avaliar a presença de contaminação cruzada. Para a extração do DNA das amostras parafinadas foi utilizado o protocolo de extração abaixo, descrito por WRIGHT & MANOS (1990), com pequenas modificações.

Para remoção da parafina por duas vezes, os cortes foram imersos em 1 ml de xilol, lentamente agitados em *shaker* por período de 1 hora, e após, centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos, sendo o sobrenadante (SND) desprezado. Em seguida os cortes foram lavados por 2 vezes com álcool etílico absoluto para remoção da mistura xilol e parafina residual, com consecutiva centrifugação e desprezo do SND. Foi realizada a secagem do tecido precipitado cobrindo-se os tubos com *Parafilm* (*American N.C.*) e os deixando à temperatura ambiente por 30 minutos. Por último foi realizada a lise do tecido a 37°C *overnight* com 450µL de solução de digestão contendo: 50mM de Tris-HCl pH 8,5 (Promega), 1mM de EDTA (Gibco), 0,5% de Tween 20 (Invitrogen) e 200µg/mL proteinase K (Sigma). Em seguida os tubos foram centrifugados e o sobrenadante de células (lisado de células) transferido para outro tubo para ser utilizado nas reações de PCR.

4.3 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

4.3.1 Amplificação de um Fragmento do Gene de β -Globina Humano

Como controle da integridade do DNA obtido das amostras após extração, foi utilizada a amplificação do gene de beta-globina humana por meio dos iniciadores PC03 e PC04 (SAIKI *et al.*, 1985), capazes de amplificar um fragmento de 110pb do gene de β -globina. As condições de preparo da reação e o programa de amplificação utilizado estão descritos no Anexo 2, na Seção de Anexos.

Como controle positivo da amplificação do gene de β -globina humano, foram utilizadas amostras de DNA extraídas de sangue, gentilmente cedidas pelo Laboratório de Genética Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, UFMG. Como controle negativo da reação de PCR, foi utilizado o branco do Mix da reação, que consiste em uma mistura de todos componentes da reação (dNTP's, Tampão 1B-10X Phusion, iniciadores e *Taq* DNA polimerase PHT- Phusion) sem adição de qualquer amostra de DNA.

4.3.2 DETECÇÃO DA INFECÇÃO POR HPV E GENOTIPAGEM

4.3.2.1 Detecção do Genoma Viral

Com o objetivo de se aumentar a sensibilidade e a especificidade da PCR, assim como a chance de detecção do DNA do HPV nas amostras sob análise foi utilizada a técnica de *Nested* – PCR. Assim, os iniciadores genéricos MY09 e MY11 (MANOS *et al.*, 1989) foram utilizados em uma primeira reação de PCR para amplificação de um fragmento de 450pb do gene *L1*, conservado nos diversos tipos de HPV e numa segunda reação de PCR foram utilizados os iniciadores GP5 e GP6+ (MOLIJN *et al.*, 2005), capazes de amplificar um fragmento de 150pb interno ao fragmento amplificado na primeira reação (DE RODA HUSMAN *et al.*, 1995; WILANDER *et al.*, 1996; HUSNJAK *et al.*, 2000; GRAVITTI *et al.*, 2000; FUESSEL HAWS *et al.*, 2004). As condições da reação de *Nested* - PCR estão descritas no Anexo 2, na Seção de Anexos.

Como controle positivo da reação de *Nested* PCR para o HPV foi utilizado o DNA extraído de células HeLa, que possuem o DNA do HPV18 integrado ao seu genoma. Como controle negativo da reação de PCR, foi utilizado o branco do Mix da reação.

4.3.2.2 Tipagem dos HPVs Oncogênicos

Após a identificação das amostras positivas para o DNA do HPV foi realizada nessas amostras a tipagem dos HPVs de alto risco (16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 e 58), utilizando-se metodologias e iniciadores específicos para cada tipo.

4.3.2.3 Tipagem dos HPVs 16, 18, 31, 52 e 58

A tipagem dos HPVs 16, 18, 31, 52 e 58 foi realizada por meio de um protocolo de *Hemi-nested* PCR, utilizando-se os iniciadores genéricos E6CF4 e E7CR3 complementares aos genes *E6* e *E7*, para a amplificação de um primeiro fragmento de tamanho variável (350 a 390pb) de acordo com o tipo de HPV (YAMAGUCHI *et al.*, 2002). Em seguida foi realizada uma segunda reação de amplificação, utilizando-se como DNA molde o produto obtido na primeira reação, o iniciador reverso E7CR3 e os iniciadores diretos, HPV16SF, HPV18SF, HPV31SF, HPV52SF e HPV58SF (YAMAGUCHI *et al.*, 2002), capazes de amplificar fragmentos de 149pb, 177pb, 249pb, 300pb e 375pb, respectivamente. Os protocolos de amplificação empregados (condições de preparo da reação e programa de amplificação) estão descritos no Anexo 2, na Seção de Anexos.

4.3.2.4 Tipagem por PCR do HPV33

A tipagem do HPV33 foi realizada baseada em um protocolo descrito por GRCE *et al.* (1997), modificado, utilizando-se os iniciadores descritos na seção de Anexos. Para amplificação do fragmento de 455pb do HPV33 foi utilizado o programa de amplificação *Touchdown-PCR* (descrito no Anexo 2), padronizado e gentilmente cedido pela Dra. Maria Gabrielle de Lima Rocha, Professora do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia, UFMG.

4.3.2.5 Tipagem por PCR do HPV35

A tipagem do HPV35 foi realizada baseada em um protocolo descrito por SOTLAR *et al.*, (2004), modificado, e no uso de iniciadores específicos para o HPV35 capazes de amplificar um fragmento de 290pb da região de *E6* e *E7* do genoma viral. As condições do Mix da reação, assim como o programa de amplificação do PCR específico estão descritos no Anexo 2, na Seção de Anexos.

Como controles positivos das reações de PCR para tipagem dos HPVs foram utilizadas: (i) amostras de DNA do Laboratório de Patogênese Molecular, do Departamento de Morfologia, ICB, UFMG, sabidamente portadoras de tipos específicos

do HPV; (ii) amostras de DNA extraído de células HeLa que possuem o DNA do HPV18 integrado ao seu genoma e (iii) amostras de DNA tipo – específicas gentilmente cedidas pela Dra. Dora Mendez do NUPAD, Núcleo de Apoio e Diagnóstico da Faculdade de Medicina da UFMG. Como controle negativo da reação de PCR, foi utilizado o branco do Mix da reação.

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de Poliacrilamida 6% por duas horas em tampão 1X TBE (Tris-Borato-EDTA), a uma voltagem constante de 100V. Cinco microlitros de cada produto da PCR foram homogeneizados com 5µl de tampão de amostra 2X (5X TBE/ azul de bromofenol a 0,25%/ Ficoll 400 a 15%) e aplicados por canaleta do gel. Após o término da eletroforese, os produtos de interesse foram visualizados nos géis de poliacrilamida após coloração pela prata (Anexo 2, Seção de Anexos).

4.4 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

Para análise da expressão das proteínas CD1a, CD83, S100 e Langerina foram utilizados os seguintes anticorpos seguindo protocolo estabelecido no Laboratório:

TABELA 1: Especificações dos anticorpos utilizados na técnica de Imunofluorescência Indireta:

Anticorpo	Especificações	Hospedeiro	Marca	Código
<i>Primários</i>	Anticorpo anti – S100	<i>Polyclonal rabbit</i>	Dako	Z0311
	Anticorpo anti – Langerina	<i>Monoclonal mouse</i>	Abcam	Ab49730
	Anticorpo anti- CD1a	<i>Monoclonal mouse</i>	Abcam	Ab113618
	Anticorpo anti- CD83	<i>Polyclonal rabbit</i>	Santa Cruz	SC20083
<i>Secundários</i>	Anticorpo anti- <i>rabbit</i> conjugado com Cy5 (<i>Cy5-conjugated - Affini Pure</i>)	Goat	Jackson Immuno	111-175-144
	Anticorpo anti- <i>mouse</i> conjugado com biotina (<i>Biotin-SP-conjugated – Affini Pure</i>)	Goat	Jackson Immuno	111-065-146
	Estreptoavidina conjugada com Cy2 (<i>Cy2-conjugated Streptavidin</i>)	-	Jackson Immuno	016-220-084

A marcação dos núcleos foi realizada com Iodeto de Propídeo (*Molecular Probes*; Código P1304MP).

Os cortes de 7µm dos tecidos foram desparafinizados em 4 banhos com xilol por 10 minutos e reidratados através de uma série graduada de etanol (100 a 25%). Para aumentar a detecção do antígeno foi realizada a recuperação antigênica, onde os cortes foram imersos em solução de Tris/EDTA pH 9,0 e aquecidos em banho-maria à 100°C durante 30 minutos. Após o resfriamento, os cortes passaram por uma etapa de bloqueio com solução de BSA (*Bovine Serum Albumin*) a 2% em 1X-PBS (*Phosphate - Buffered Saline*), durante 60 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, os cortes foram incubados com o anticorpo primário anti-S100 a uma diluição de 1:200, por 60 minutos à temperatura ambiente. A diluição adequada dos anticorpos primários foi estabelecida em experimentos de padronização para o uso dos anticorpos. Após a lavagem em 1X - PBS, os cortes foram incubados por 60 minutos à temperatura ambiente com o anticorpo secundário anti-*rabbit* conjugado com Cy5 à diluição de 1:200, e 0,5µL de Iodeto de Propídeo para cada 100µL de solução. Para os demais anticorpos, após desparafinização e recuperação antigênica em solução de Tris/EDTA pH: 9.0, realizou-se a lavagem dos cortes com 1X-PBS seguida por uma etapa de bloqueio com solução 2% BSA/1X-PBS, durante 60 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente os cortes foram incubados com o anticorpo primário anti-Langerina à diluição de 1:400, anti- CD1a (à diluição de 1:100) e anti-CD83 (à diluição de 1:50) por 18 horas à 4°C. No dia seguinte, após a lavagem com 1X-PBS os cortes foram incubados por 60 minutos à temperatura ambiente, com o anticorpo anti-*mouse* ou anti-*rabbit* (para detecção do anticorpo anti-CD83) marcados com Biotina-SP à diluição de 1:200. Realizou-se novamente a lavagem das lâminas em 1X-PBS, e, posteriormente os cortes foram incubados por 60 minutos à temperatura ambiente em uma única solução contendo o anticorpo conjugado à estreptoavidina e marcado com Cy2 (*Cy2-Streptavidin* ou Cy5 (*Cy5-Streptavidin*) e 0,5 µL de Iodeto de Propídeo para cada 100µL de solução. Finalmente após lavagem em 1X-PBS, a montagem das lâminas foi realizada com o meio de montagem *Hydromount* (*National Diagnostics*, Georgia, Atlanta, USA).

Para controle negativo de cada reação, realizou-se a substituição do anticorpo primário pela solução de bloqueio (2% BSA em 1X-PBS). Para controle positivo utilizou-se uma amostra de NICII sabidamente positiva para a marcação de células de Langerhans.

As imagens obtidas pela técnica de Imunofluorescência foram capturadas por meio de microscópio confocal à laser (*Carl Zeiss LSM 510 Meta*), utilizando-se o programa *Carl Zeiss Laser Scanning Microscope (LSM) 510 Meta* (versão 3.2). Para a detecção da fluorescência gerada pelos anticorpos secundários marcados com Cy2 e Cy5,

e pelo Iodeto de Propídeo, foram utilizados os lasers 488, 633 e 543, que emitem fluorescência nas cores verde, branco e vermelho, respectivamente.

Essa etapa do trabalho foi realizada em colaboração com o Prof. Gregory Thomas Kitten, do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Departamento de Morfologia, ICB, UFMG.

4.5 IMUNOHISTOQUÍMICA

A expressão das proteínas CD4, CD8 e Granzima B foi analisada por meio da técnica de Imunohistoquímica, sendo utilizados os seguintes anticorpos seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante e as condições estabelecidas no Laboratório.

TABELA 2: Especificações dos anticorpos utilizados na técnica de Imunohistoquímica

Anticorpo	Especificações	Hospedeiro	Marca	Código
Primário	Anticorpo anti – CD4	<i>Monoclonal mouse</i>	Santa Cruz	SC59034
	Anticorpo anti – CD8	<i>Polyclonal rabbit</i>	Abcam	AB4055
	Anticorpo anti- granzima B	<i>Polyclonal rabbit</i>	Abcam	AB4059

Para a marcação dos núcleos foi realizada a contra coloração com Hematoxilina de Harris (*Merck Millipore*; Código 3203 00 10, USA).

Os cortes dos tecidos de 7µm foram desparafinizados em 4 banhos com xilol por 10 minutos e reidratados através de uma série graduada de etanol (100 a 25%). Para aumentar a detecção do antígeno foi realizada a recuperação antigênica, onde os cortes foram imersos em solução de Tris/EDTA pH 9,0 e aquecidos durante 30 minutos em banho-maria à 100°C. Após o resfriamento, os cortes passaram por uma etapa de bloqueio com solução 2% BSA em 1X-PBS, durante 60 minutos à temperatura ambiente. Os cortes foram então incubados com os anticorpos primários (anti-CD4 à diluição de 1:50, anti-CD8 à diluição de 1:200 e anti-granzima B à diluição de 1:100) por 18 horas à 4°C. No dia seguinte, após a lavagem com 1X-PBS os cortes foram imersos em solução de bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% por 30 minutos à temperatura ambiente. Após lavagem, foram incubados com anticorpo secundário biotinilado diluído a 1:500 em BSA à 0.3% em 1X-PBS (Kit *Vectastain*;

Vector Laboratories, USA) por 30 minutos à temperatura ambiente. Realizou-se novamente a lavagem das lâminas em 1X-PBS, e, posteriormente os cortes foram incubados, na solução ABC Vector (*Vectastain ABC KIT- PK 6101 ou -PK 6102; Vector Laboratories, USA*) por 30 minutos à temperatura ambiente. A revelação foi realizada após lavagem das lâminas, utilizando-se como cromógeno Diaminobenzidina (DAB) do Kit Vector (SK-4100; *Vector Laboratories*). Os cortes foram lavados em água destilada por 10 minutos, contra-corados com Hematoxilina de Harris (*Merck Millipore, Código 3203 00 10, USA*) por 30 segundos, lavados em água corrente por 10 minutos, desidratados através de uma série crescente de álcool, diafinizados em xilol e as lâminas montadas em Entellan (*Merck Millipore, Código 3208 20 10, USA*).

Para controle negativo de cada reação, realizou-se a substituição do anticorpo primário pela solução de bloqueio (2%BSA em 1X-PBS) e para controle positivo utilizou-se amostras de linfonodo pélvico obtidas de pacientes com lesões cervicais do NICII e NICIII.

4.6 AVALIAÇÃO E INTERPRETAÇÃO DAS MARCAÇÕES DE S100, LANGERINA, CD1a E CD83

As medidas da área de tecido lesionado e do número de células positivas para os marcadores foram obtidas pelo *software* KS300 do analisador de imagens Carl Zeiss (Oberkochen, Germany). Essa etapa do trabalho foi realizada em colaboração e sob a Orientação do Prof. Marcelo Vidigal Calliari, do Laboratório de Protozooses do Departamento de Patologia Geral, ICB, UFMG.

A imunoreatividade foi avaliada quanto à distribuição de células positivas para os diferentes marcadores. O epitélio lesionado foi visualizado pela objetiva de 40X e foram digitalizadas imagens de toda a extensão da lesão. Para a identificação, seleção e contagem das células de Langherans marcadas por S100, Langerina, CD1a e CD83 utilizou-se como critério a presença de células marcadas cujo núcleo e prolongamentos celulares, ou parte do núcleo com prolongamentos eram evidentes. Não foram incluídas na contagem, células que apresentavam apenas os prolongamentos corados, mas cujo núcleo não era visível ou núcleos isolados corados, porém sem a presença de prolongamentos. As imagens obtidas pela técnica de Imunofluorescência foram capturadas através de microscopia confocal (*Carl Zeiss LSM 510 Meta*) utilizando-se o programa *Carl Zeiss Laser Scanning Microscope LSM 510 Meta* (versão 3.2). De cada

imagem foi obtida, em escala quantitativa, a extensão em micrômetros de toda a área do epitélio lesionado.

Considerando-se os diferentes tamanhos de área de epitélio presentes em cada amostra, foi realizado um ajuste prévio do número de células positivas para cada biomarcador, obtido pela análise de amostras cervicais individuais. Esse ajuste foi realizado em etapa anterior ao cálculo da expressão mediana de cada marcador, determinada para cada grupo de lesão. Assim, para todos os marcadores, o número de células marcadas por um dado anticorpo foi ajustado para aquele obtido na menor área de epitélio lesionado, em cada amostra analisada.

4.6.1 AVALIAÇÃO E INTERPRETAÇÃO DAS MARCAÇÕES DE CD4, CD8 E GRANZIMA B

Nesse estudo, dois tipos distintos de análise foram empregadas para a quantificação de linfócitos T (i) no epitélio de amostras de NIC e em áreas do tecido conjuntivo referentes às regiões de invasão em amostras de câncer, e no (ii) epitélio de amostras de NIC e no estroma adjacente à área de epitélio lesionado, assim como em áreas de estroma associadas à invasão de origem epitelial. A imuno-expressão foi avaliada pela distribuição de células positivas para os diferentes marcadores. O epitélio lesionado foi visualizado pela objetiva de 40X e foram digitalizadas imagens de toda a extensão da lesão, do estroma adjacente e/ou do estroma associado à invasão. De cada imagem foi obtida, em escala quantitativa, a área de epitélio e do estroma, utilizando-se como padrão, a extensão em micrômetros do epitélio lesionado. Em escala quantitativa, foi analisada a distribuição de células positivas para os marcadores acima relacionados, sendo consideradas positivas quando observada a presença de coloração marrom associada às características morfológicas das células analisadas. As medidas da área epitelial, do estroma e do número de células positivas para os marcadores foram obtidas pelo *software* KS400 contido no analisador de imagens Carl Zeiss (Oberkochen, Germany).

Como descrito no item anterior, um ajuste do número de células CD4+, CD8+ e granzima B+ obtidos em cada amostra, foi realizado em etapa anterior ao cálculo da expressão média e mediana de cada marcador, verificada por grupo de lesão. Assim, para os três marcadores o número de células marcadas foi ajustado para aquele encontrado na menor área de epitélio lesionado ou estroma adjacente à lesão, para cada amostra analisada.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados morfométricos e numéricos obtidos pela análise do epitélio e/ou estroma das lesões de colo uterino foram expressos como mediana e intervalo interquartil. O teste de comparação não-paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para avaliação de significância estatística das medianas de células contadas por mm² entre dois grupos diferentes. O teste de Kruskal- Wallis 1-way ANOVA foi usado para determinar as diferenças significativas entre três ou mais grupos. A análise foi realizada no software *Graphpad Prism 5*. O nível de significância considerado foi de $P < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA A QUANTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS DE LANGERHANS

Visando a otimização do uso dos anticorpos primários anti-S100, anti-Langerina, anti-CD1a e anti-CD83 para determinação do número de células de Langerhans em amostras cervicais, os seguintes experimentos foram realizados: curvas de diluição e testes de tempo e da temperatura de incubação dos anticorpos.

Para a otimização do uso dos anticorpos primários foram testadas (i) as diluições de 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 e 1:1000, (ii) os períodos de incubação de 1 hora, 2 horas, 3 horas e 18 horas (*overnight*) e (iii) as temperaturas de incubação de 4°C ou ambiente, utilizando-se amostras representativas de todos os grupos de lesões.

Considerando a padronização do anticorpo anti-S100, observou-se boa intensidade de marcação pelo uso do anticorpo diluído a 1:200 e incubado por 1 hora à temperatura ambiente. Em relação à padronização dos anticorpos anti-Langerina, anti-CD1a e anti-CD83, verificou-se que a melhor intensidade de marcação foi alcançada pelo uso do anticorpo na diluição de 1:400, 1:100 e 1:50, respectivamente, por cerca de 18 horas a 4°C.

Em relação ao uso dos anticorpos secundários, a utilização desses anticorpos diluídos a 1:200 durante período de incubação de 1 hora à temperatura ambiente, mostrou os melhores resultados para a revelação dos anticorpos primários.

5.2 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE IMUNOHISTOQUÍMICA PARA QUANTIFICAÇÃO DOS LINFÓCITOS T CD4+, CD8+ E GRANZIMA B+

Para quantificação das populações linfocitárias em amostras cervicais por meio do uso dos anticorpos anti-CD4, anti-CD8 e anti-granzima B foram realizadas curvas de diluição e testes do tempo e da temperatura de incubação para otimização do uso dos anticorpos primários. Assim, foram testadas (i) as diluições de 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800, (ii) os períodos de incubação de 1 hora, 2 horas, 3 horas e 18 horas (*overnight*) e (iii) as temperaturas de incubação ambiente ou de 4°C, utilizando-se amostras representativas de todos os grupos de lesões.

Pela realização dos experimentos de padronização dos anticorpos anti-CD4, anti-CD8 e anti-granzima B, observou-se boa qualidade de marcação dos anticorpos diluídos a 1:50, 1:200 e 1:100, respectivamente, e incubados por cerca de 18 horas a 4°C.

Em relação à diluição dos anticorpos secundários e demais reagentes, seguiu-se o protocolo do Kit utilizado, conforme descrito na seção anterior.

5.3 ANÁLISE DAS POPULAÇÕES DE CÉLULAS DE LANGERHANS E LINFOCITÁRIA NO EPITÉLIO DE AMOSTRAS CERVICAIS

Um total de 77 amostras cervicais (9 de mucosa normal sem alteração histopatológica, 16 amostras de NICI, 19 de NICII, 18 de NICIII e 15 de câncer, foram analisadas quanto à imunoreatividade para os marcadores S100, Langerina, CD1a, CD83, CD4, CD8 e granzima B, no epitélio de amostras controles, de amostras de NIC, e em massas tumorais de amostras de câncer.

Estas amostras também foram submetidas à análise molecular para a pesquisa da presença ou ausência do DNA do papillomavírus humano e de 8 tipos de alto risco, sendo então divididas em dois grupos. O grupo HPV+ foi composto por 68 amostras cervicais obtidas de mulheres portadoras de lesões que foram positivas para o DNA do HPV ou de algum dos 8 tipos de alto-risco pesquisados. Nove amostras controles foram incluídas nesse grupo para fins de comparação. O grupo de amostras HPV16/18+ foi composto por 34 amostras com alterações cervicais exclusivamente positivas para o DNA dos HPVs 16 e/ou 18, além de amostras controles (Tabelas 1 e 2, Anexo 3).

5.3.1 DETECÇÃO DO DNA DO HPV E GENOTIPAGEM

A presença do DNA do HPV nas amostras cervicais foi avaliada por meio da amplificação (i) pela *Nested-PCR* do fragmento de 150pb da região do gene *L1*, conservado entre os tipos de HPV, e (ii) por *Hemi-nested PCR* ou PCR convencional dos fragmentos de DNA dos genes *E6* e *E7*, específicos para cada um dos 8 tipos. O DNA/HPV foi encontrado em 64/68 (94%) das amostras apresentando lesões cervicais (Tabela 1, Anexo 3).

Os resultados obtidos para a pesquisa do DNA de tipos específicos do HPV nas amostras cervicais com NIC ou câncer (n=68) revelaram que o HPV16 foi o tipo mais prevalente (28/68-41%), seguido pelo HPV35 (20/68-29%), HPV18 (16/68-23,5%) e HPV31 (13/68-19,1%). Nas amostras de tecido analisadas, o DNA dos HPVs 52(10/68-

14,7%) e 58(9/68-13,2%) foi encontrado em proporções semelhantes, bem como do HPV33 (8/68-11,76 %) e do HPV45 (5/68-7,35 %).

Considerando a frequência dos tipos de HPV por categoria de lesão, nas lesões de NICI os HPVs 33 e 35 (5/16-31%) foram os mais prevalentes, seguidos pelos HPVs 45 (4/16-25%) e 18 (3/16-18,7%). Vinte e cinco por cento das amostras de NICI apresentaram positividade para dois ou mais tipos de HPV (Tabela 3). Nas lesões de NICII observou-se maior prevalência do HPV16 (8/19-42%), com 21% das amostras de NICII (4/19) apresentando múltiplas infecções (Tabelas 3 e Tabela 1, Anexo 3). Cinquenta por cento (9/18) dos tecidos de pacientes com NICIII foram positivos para o DNA do HPV16 e do HPV35, seguidos pelo DNA do HPV18 (8/18-42%) (Tabela 1, Anexo 3). Os HPVs 52 e 58 apresentaram frequências semelhantes (4/18-22%) nas amostras de NICIII, sendo que quinze das 18 (83 %) amostras foram infectadas com dois ou mais tipos de HPV, enquanto cinco (27%) pacientes com NICIII apresentaram positividade para três tipos de HPV (Tabela 3). Maior proporção das mulheres com câncer invasivo (9/15-60%) foi positiva para o DNA do HPV16, com prevalências similares do DNA dos HPVs 31 e 35 (4/15-26%), seguido do HPV18 (3/15-20%) (Tabela 3 e Tabela 1, Anexo 3).

Tabela 3- Porcentagem dos tipos de DNA do HPV encontrados em cada grupo de pacientes com lesão pré-neoplásicas e neoplasias do colo do útero: NICI, II, III e CA*

Grupos (n=68)	HPV16	HPV18	HPV31	HPV33	HPV35	HPV45	HPV52	HPV58
NICI (n=16)	12,5%	18,75%	25%	31,25%	31,25%	25%	6,25%	6,25%
NICII (n=19)	42%	10,52%	0	5,26%	10,52%	5,26%	21,05%	5,26%
NICIII (n=18)	50%	42%	26%	5,26%	50%	0	22%	22%
CA (n=15)	60%	20%	26,6%	6,6%	26,6%	0	6,6%	20%

*NIC= Neoplasia intra-epitelial cervical; CA= Câncer cervical invasor.

5.3.2 ANÁLISE DAS POPULAÇÕES DE CÉLULAS DE LANGERHANS E DE LINFÓCITOS NO EPITÉLIO

A Figura 5 mostra imagens representativas de células de Langerhans positivas para S100 presentes no epitélio de pacientes sem alterações cervicais (Fig.5A), de portadoras de NICI (Fig.5B), II (Fig.5C), III (Fig.5D) ou câncer cervical (Fig.5E). Observa-se abundantes células de Langerhans S100 positivas com típica morfologia dendrítica em toda a extensão do epitélio em amostras sem alteração (5A), e nos terços inferior (5B), no terço médio (5C) e no terço superior (5D) nas amostras de NICI, NICII e NICIII, respectivamente.

Na Figura 6 são mostradas imagens de tecidos cervicais apresentando células Langerina positivas em amostras controle (Fig.6A), em amostras de NICI (Fig.6B), NICII (Fig.6C), NICIII (Fig.6D) e câncer cervical (Fig.6E). Embora seja evidente a presença de células Langerina positivas em todos os tipos de lesão intra-epitelial e em câncer, observa-se um predomínio de células dendríticas na amostra controle (Fig.6A).

As imagens representativas de células CD1a positivas (Fig.7) evidenciam células dendríticas bem caracterizadas por sua morfologia estrelada e presença de prolongamentos. No entanto, verificou-se maior concentração de células CD1a+ no terço basal do epitélio de amostras normais (Fig.7A), assim como no limite inferior das lesões de NICI (7B), NICII (7C) e NICIII(7D).

Células CD83+ são observadas no epitélio de amostras normais (Fig.8A), como em amostras de Neoplasia Intra-epitelial Cervical graus I (8B), II (8C) e III (8D). De forma interessante, verifica-se maior número de células de Langerhans CD83+ no primeiro e no segundo terço do epitélio de amostras de NICI (8B) e NICII (8C), respectivamente.

A figura 9 apresenta imagens representativas de infiltrados de linfócitos T CD4+, CD8+ e granzima B+ no epitélio de amostras normais (Fig.9A, F, K), de NICI (9B, G, L), II (9C, H, M), III (9D, I, N) e câncer (9E, J, O). Observa-se maior número de células CD4+ (9C), CD8+ (9H) e granzima B+ (9M) presentes no epitélio de amostras cervicais com NICII quando comparado às amostras normais, demais tipos de lesão e câncer.

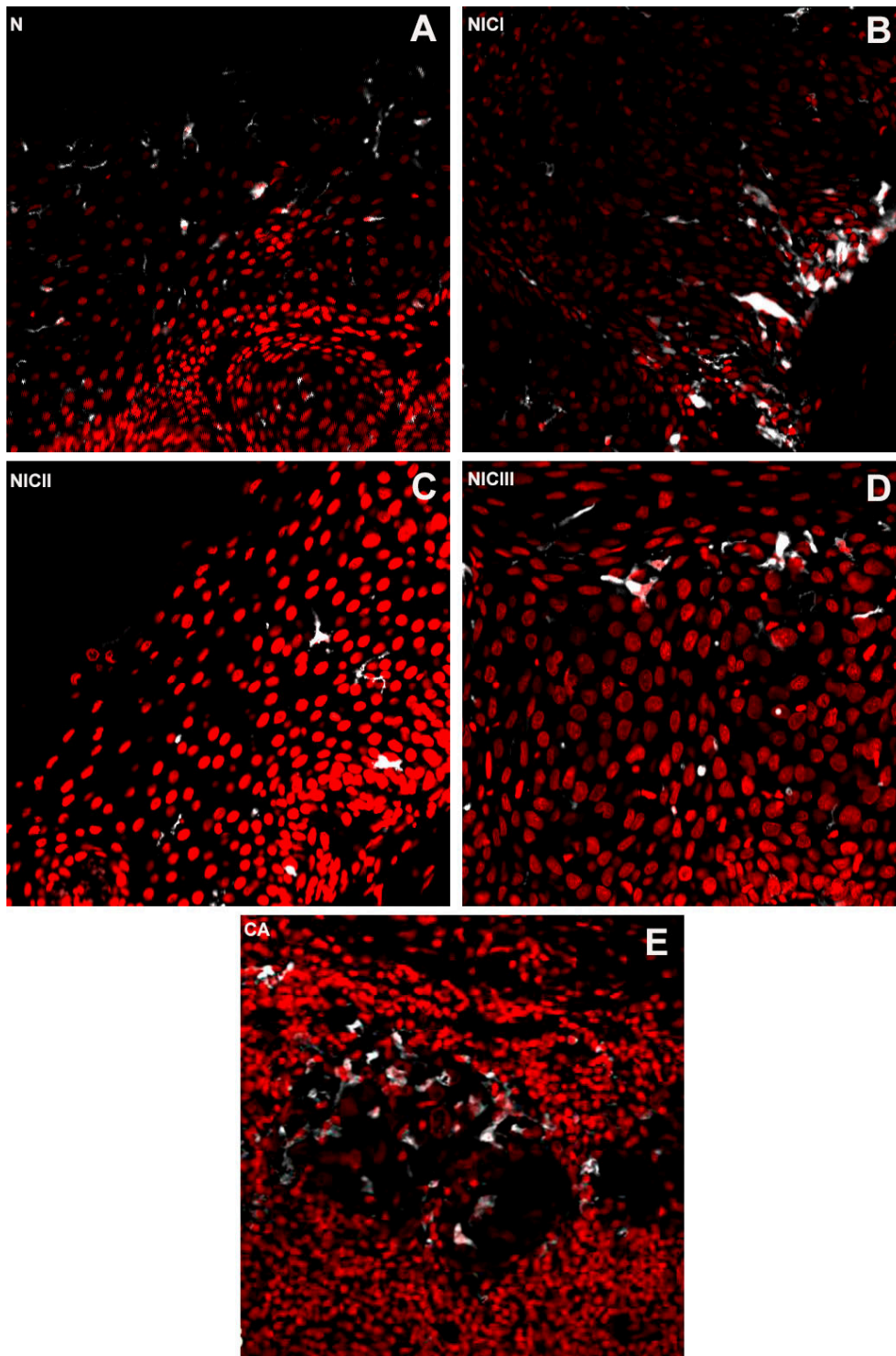


Figura 5: Imagens representativas de células de Langerhans S100+ em Lesões Escamosas Intra-epiteliais e invasoras e em amostra controle. Expressão de S100 (branco) pela técnica de imunofluorescência. Os núcleos estão marcados em vermelho pelo Iodeto de Propídeo. Células de Langerhans S100+ exibem típica morfologia dendrítica e se localizam no estroma das amostras de câncer no interior de massas tumorais. Amostra controle negativo (A); B: NICI; C: NICII; D: NICIII e E: Câncer. Aumento 400x.

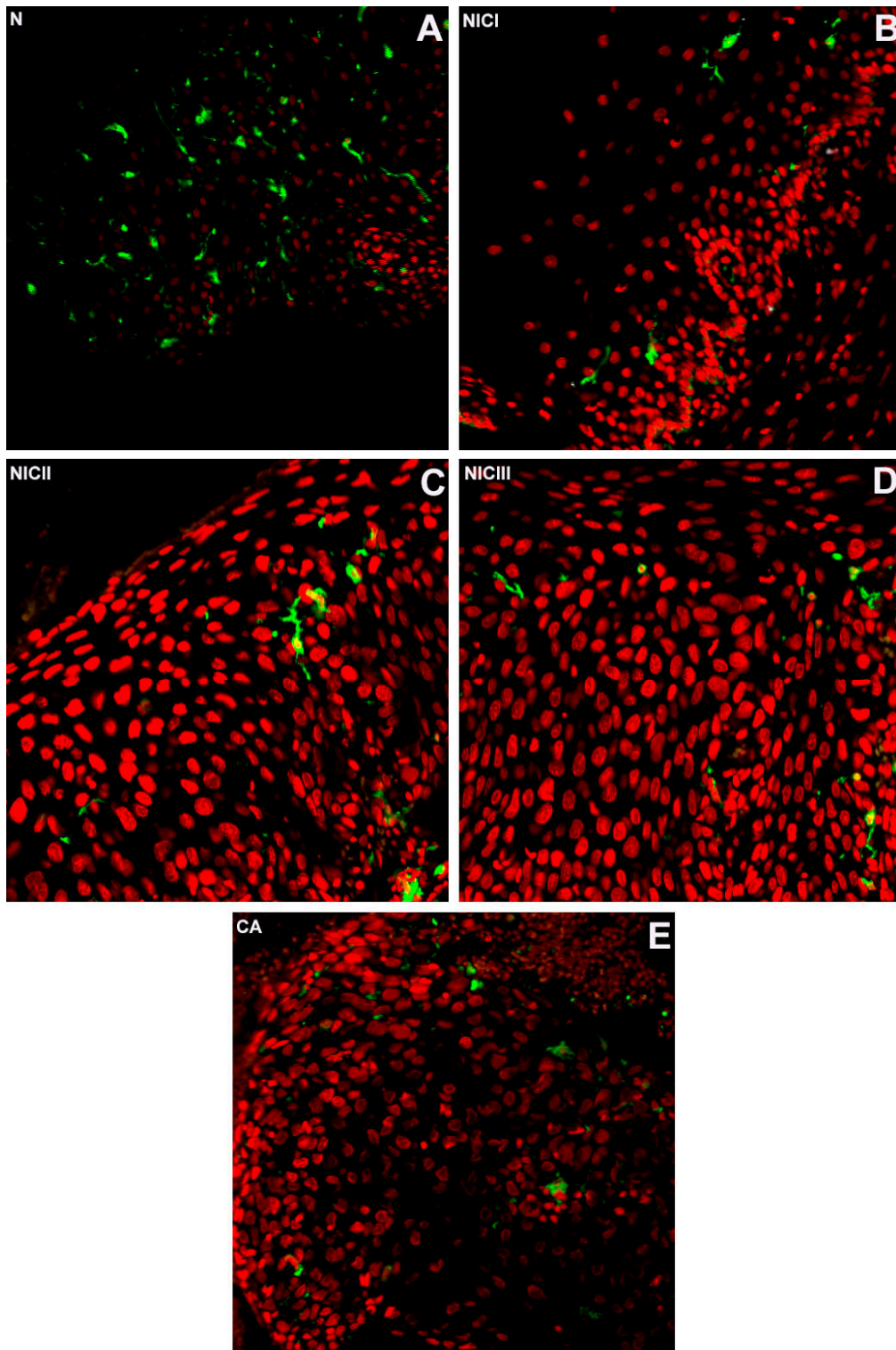


Figura 6: Imagens representativas de células de Langerhans Langerina+ em Lesões Escamosas Intra-epiteliais e invasoras em amostra controle. Expressão de Langerina (verde) pela técnica de imunofluorescência. Controle negativo (A); B: NICI; C: NICII e D: NICIII; E: Câncer. Nas lesões de graus I, II e III, há predomínio de núcleos (vermelho) de células com alterações nos terços basal, médio e superior, respectivamente. Células de Langerhans exibindo morfologia típica são observadas em todas as amostras do epitélio cervical, assim como nas massas tumorais de amostras de câncer Aumento 400x.

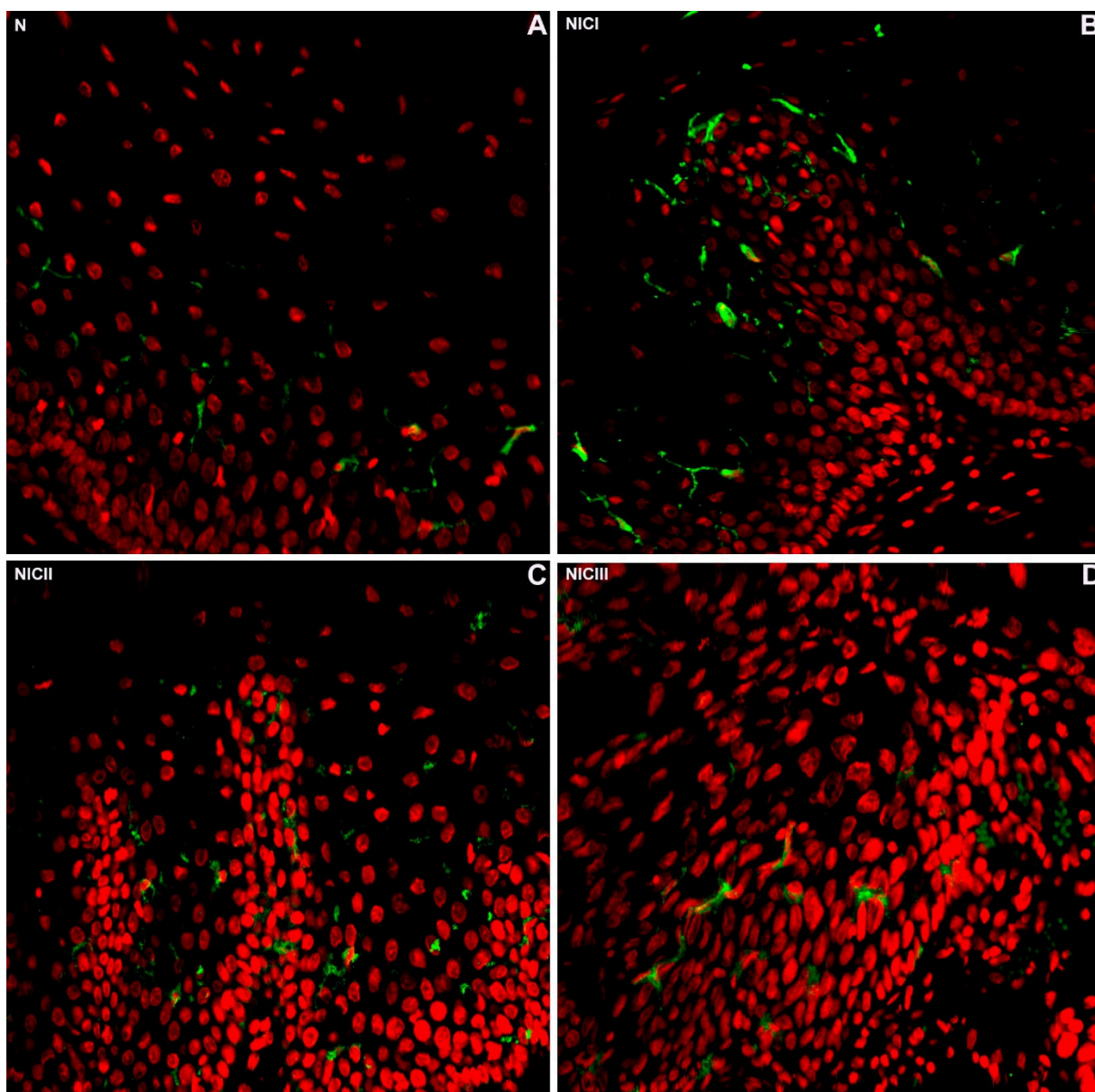


Figura 7: Imagens representativas de células de Langerhans CD1a+ em Lesões Escamosas Intra-epiteliais e amostra controle. Expressão de CD1a (verde) pela técnica de imunofluorescência. Amostra controle negativo (A); B: NICI; C: NICII e D: NICIII. Células de Langerhans com prolongamentos típicos e marcadas por CD1a são observadas no epitélio sem alterações (A) ou apresentando Lesões Intra-epiteliais de graus I (B), II (C) e III (D). Aumento 400x.

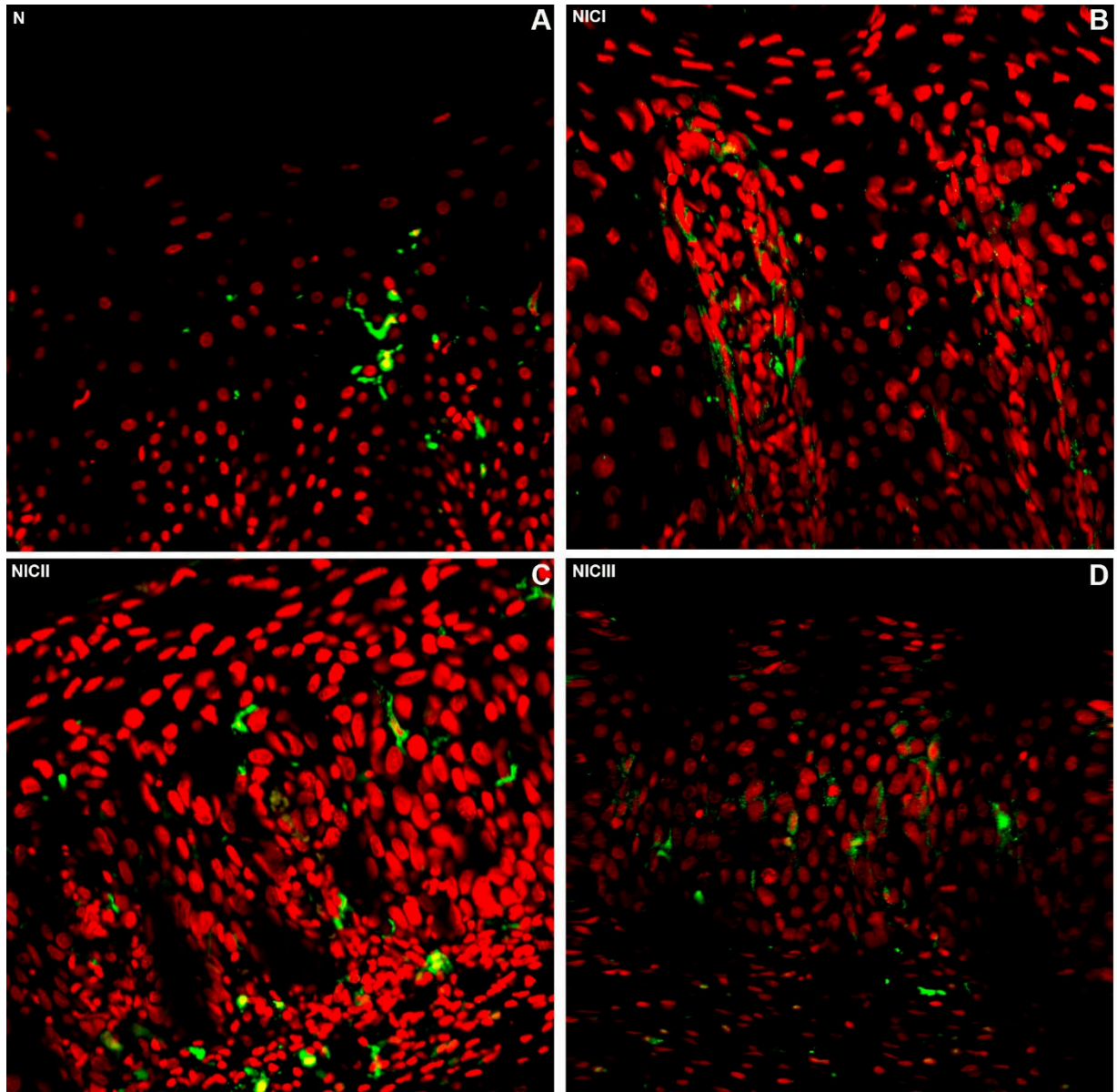


Figura 8: Imagens representativas de células de Langerhans CD83+ em Lesões Escamosas Intra-epiteliais e em amostra controle. Expressão de CD83 (verde) pela técnica de imunofluorescência. Amostra controle negativo (A); B: NICI; C: NICII; D: NICIII. Células de Langerhans maduras marcadas por CD83 e ricas em prolongamentos são observadas na região basal (C) e supra basal (A a D) do epitélio escamoso. Aumento 400x.

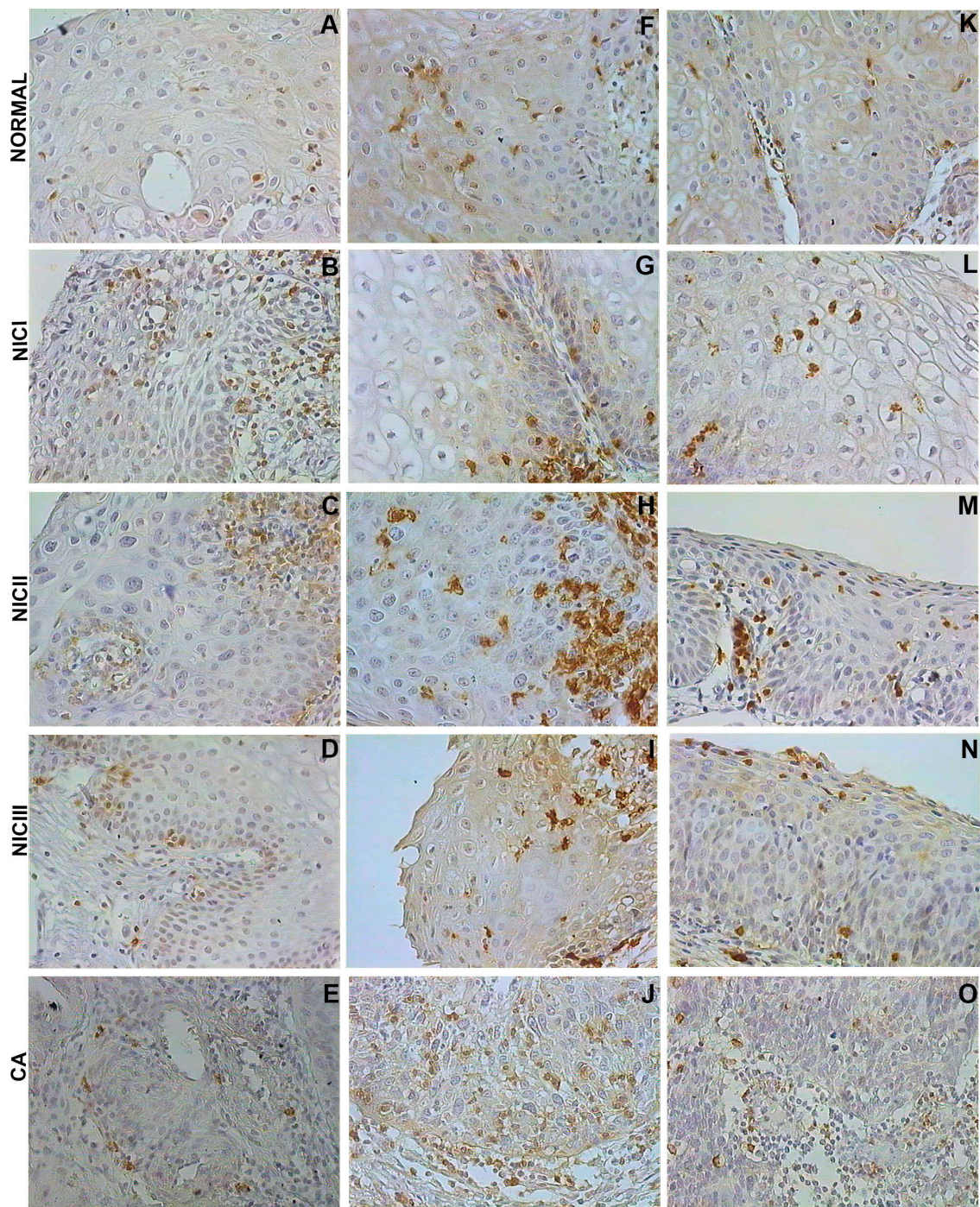


Figura 9: Imagens representativas de células imunocompetentes em Lesões Escamosas Intra-epiteliais e câncer e em amostras controles. CD4+: A-E; CD8+: F-J; Granzima B+: K-O. Células positivas apresentam coloração marrom e estão presentes no epitélio de amostras cervicais sem alterações (A, F, K), ou portadoras de Lesões Escamosas grau I (B, G, L), grau II (C, H, M), grau III (D, I, N) e câncer (E, J, O). Os núcleos foram contra-corados com Hematoxilina de Harris. Aumento de 400X.

Como mencionado na seção de Metodologia, devido à variação existente no tamanho das áreas de tecido presentes nas imagens digitalizadas para análise do número de células marcadas por cada anticorpo específico, um ajuste prévio do número de células totais marcadas em cada amostra foi realizado, tomando-se como referência a menor área do epitélio lesionado em cada amostra individual determinada pelos 7 marcadores utilizados. Em seguida, os valores numéricos corrigidos foram utilizados para o cálculo da mediana do número de células positivas para os marcadores avaliados no grupo controle e em cada grupo de lesão distinto (NICI, NICII, NICIII e CA), sendo esses valores submetidos à análise estatística (Tabelas 4 e 5).

Quando o número de células de Langerhans e linfócitos T encontrado no epitélio das amostras cervicais dos grupos de lesão HPV+ foi comparado com aquele observado nas amostras controles, verificou-se aumento do número das células de Langerhans marcadas por S100, CD1a e CD83 nos grupos de NIC e câncer, com maior aumento dessas células nas amostras de NICI (S100+) e de NICII (células CD1a e CD83+). Entretanto, de maneira oposta, o número de células Langerina positivas foi menor entre os grupos de lesão quando comparado ao controle, com maior redução das células Langerina+ em amostras de NICII (Tabela 4). Observou-se maior número de células CD4+, CD8+ e granzima B+ nos tecidos cervicais com lesão em relação aos controles, com maior aumento de linfócitos T CD4, CD8 e granzima B positivos em amostras de NICII.

Em nosso estudo, ao compararmos o número de células de Langerhans e linfócitos T obtidos para cada marcador em cada categoria de lesão de acordo com a gravidade da lesão, observou-se nas amostras HPV+ redução gradual do número de células de Langerhans de NICI→NICII→NICIII, com maior queda dessas células verificada em amostras de NICII (células Langerina+) e NICIII (células S100+ e CD1a+). Um pequeno aumento no valor da mediana das células Langerina+ e S100+ foi observado no grupo de câncer. De acordo com o grau de severidade das lesões nas amostras do grupo HPV+, verificou-se aumento das células CD4+, CD8+ e granzima B+ de NICI→NICII, seguida de redução significativa para NICIII ($P < 0,05$). No entanto, observou-se uma queda significativa de 62% no número de células granzima B+ de NICIII→CA (Tabela 4).

A análise da razão CD8/CD4 é considerada um parâmetro adequado para avaliar-se as características da resposta imune. A análise da razão CD8/CD4 no epitélio de amostras cervicais do grupo HPV+ com lesão intra-epitelial e câncer revelou um aumento

dessa razão em NICI e NICII quando comparado com valores de CD8/CD4 obtidos em amostras normais e nos demais grupos de lesão (Tabela 5).

Tabela 4- Quantificação das células de Langerhans e subpopulações de linfócitos T no grupo HPV+

	Lang+	S100+	CD1a+	CD83+	Granz	CD4	CD8	CD8/CD4
Normal n=9	8	6	2	0,70	0,30	2	7,50	1,47
	[2,1-9,2]	[2,15- 35,75]	[0,25- 25]	[0-4,35]	[0-3,60]	[0,40- 3,10]	[1,95- 12,10]	[0,5- 3,75]
NICI n=16	5,31	15,75	13,20	1,60	15,63	5,68	28,25	3,20
	[0,47- 12,93]	[2,33- 25,25]	[4,2- 22,23]	[0,02- 5,17]	[2,48- 25,09]	[1,58- 49,20]	[14- ,53,78]	[0,99- 12,2]
NICII n=19	3,10	12	14,60	6,50	25,60	10,60	52	6,67
	[1,43- 16]	[6-20]	[1- 30,20]	[0-17,7]	[8,50- 47,20]	[4,5-30]	[19,8- 146]	[3,66- 11,56]
NICIII n=18	3,65	9,55	7,9	3,25	15,15	4,25	14,6	1,26
	[0,74- 9,65]	[3,62- 22,13]	[3,85- 17,85]	[0,30-5]	[9- 23,40]	[1,82- 11]	[3,98- 46,40]	[0,81- 4,17]
CA n=15	5	13	-	-	5,71	4,17	19,11	2,60
	[2-16]	[6,55- 44]	-	-	[2,82- 13]	[1,09- 20,79]	[9,19- 61,05]	[1,41- 15,04]

*Valores da mediana (25%-75%) do número de células de Langerhans (Langerina +, S100+, CD1a+ e CD83+) e linfócitos T (CD8+, CD4+ e granzima B+), presentes no epitélio de amostras cervicais sem alterações histopatológicas, ou apresentando Lesões Intra-epiteliais do tipo NICI, NICII, NICIII e em câncer.

A análise comparativa da densidade de células de Langerhans e de linfócitos T entre os grupos de amostras com Lesão intra-epitelial e as amostras controles do grupo HPV16/18+ demonstrou que tanto as células de Langerhans (S100+ e CD1a+) quanto os linfócitos T (CD4+, CD8+ e granzima B+) estão presentes em maior proporção nas lesões, do que nas amostras sem alterações citopatológicas. Observou-se maior aumento de células S100+ e granzima B+ em amostras de NICI. No entanto, maior densidade decélulas dendríticas CD1a+ e de linfócitos T CD4+ e CD8+ foi verificada nas lesões de NICII (Tabela 5). Uma queda no número de células de Langerhans marcadas por CD83

foi observada em pacientes portadoras de lesão NICI do grupo HPV16/18+ (Tabela 5, Figura 11D).

Quanto à gravidade da lesão, como observado para as células de Langerhans S100+, houve um aumento no número de CL Langerina+ em amostras de NICI com redução gradual no número de células Langerina+ e S100+ de NICI→NICII→NICIII. No entanto, verificou-se um crescimento na densidade de NICI→NICII seguido de queda em NICIII de células de Langerhans CD1a e CD83 positivas. De forma similar, quando a densidade de linfócitos foi comparada entre os grupos de lesão, verificou-se aumento de células CD4+ e CD8+ de NICI→NICII seguido de queda dessas células em NICIII (Tabela 5).

A análise comparativa das razões de CD8/CD4 observadas no epitélio de tecidos sem alteração ou naqueles apresentando Neoplasias Intra-epiteliais ou câncer revelou um aumento na razão CD8/CD4 em tecidos de NICII e câncer, quando comparadas com valores de CD8/CD4 obtidas em amostras normais e NICI (Tabela 5).

Tabela 5- Quantificação das células de Langerhans e subpopulações de linfócitos T no grupo de amostras positivas para os HPVs 16 e/ ou 18.

	Lang+	S100+	CD1a+	CD83+	Granz	CD4	CD8	CD8/C D4
Normal n=9	8	6	2	0,70	0,,30	2	7,50	1,47
	[2,10- 19,20]	[2,15- 35,75]	[0,25- 25]	[0-4,35]	[0-3,60]	[0,40- 3,10]	[1,95- 12,10]	[0,50- 3,75]
NICI n=5	8,2	22,70	5	0,43	19	19,80	27,70	1,45
	[3,8- 24,7]	[2,74- 55]	[3,23- 21,20]	[0,15- 21,60]	[0,96- 75]	[2,65- 99,85]	[8,58- 211,4]	[0,81- 5,13]
NICII n=8	2,10	14,35	12,85	10,30	13,15	20,95	51,75	4,01
	[1- 14,10]	[6,07- 77,43]	[0,80- 33,80]	[1,25- 17,03]	[7,71- 36,18]	[4,05- 60,80]	[18,6- 218]	[1,6-7,7]
NICIII n=10	1,35	9,80	11,70	4,45	18,40	2,15	10,25	0,87
	[0-8,45]	[2,82- 23,65]	[5,32- 19,93]	[2,25-6]	[10,30- 23-25]	[0,39- 10,13]	[3,98- 48,96]	[0,28- 22,5]
CA n=11	4	13,81	-	-	4,39	3,56	37,90	6,93
	[2-16]	[8-44]	-	-	[2,17-9]	[0,95- 17,67]	[7,29- 96]	[1,81- 15,7]

*Valores da mediana (25%-75%) do número de células de Langerhans (Langerina+, S100+, CD1a+ e CD83+) e linfócitos T (CD8+, CD4+, granzima B+) presentes no epitélio de amostras cervicais sem alterações histopatológicas, ou apresentando Lesões Intra-epiteliais do tipo NICI, NICII, NICIII e câncer.

5.3.3 ANÁLISE GLOBAL DO NÚMERO DE CÉLULAS DE LANGERHANS NO EPITÉLIO DE AMOSTRAS CERVICAIS

Ao compararmos o número de células de Langerhans positivas para os quatro marcadores utilizados, no epitélio das amostras cervicais de pacientes portadoras de NIC e câncer, com o número de CL presentes em tecidos sem alterações citopatológicas, observou-se um aumento do número das células marcadas por S100, CD1a e CD83 no epitélio das amostras portadoras de todos os graus de lesão, em relação às amostras controles (Fig.s 5, 9 e 10). Esse aumento foi observado em amostras provenientes dos dois grupos estudados, grupo HPV+ (Tabela 4) e grupo HPV16/18+ (Tabela 5).

De forma contrária aos resultados acima descritos, verificou-se que o número de células de Langerhans marcadas por Langerina (Fig.6) foi menor na maioria dos grupos de lesão e de câncer quando comparados às amostras controles, nos dois grupos analisados (HPV+ e HPV16/18+) (Tabelas 4 e 5, Figura 10).

Quando o número de células de Langerhans foi analisado de acordo com a gravidade da lesão (NICI→NICII→NICIII), observou-se uma queda gradual das células marcadas por S100 e Langerina nos grupos HPV+ (Tabela 4 e figuras 10A, 10C) e HPV16/18+ (Tabela 5, figuras 10B, 10D) nos grupos de lesão.

Destaca-se que no grupo de amostras HPV16/18+ verificou-se uma queda de células Langerina+ de aproximadamente 74% entre NICI→NICII e de 90% de NICI→NICIII no grupo, embora essa redução não tenha alcançado significância estatística (Tabelas 5, Figura 10D).

Contudo, observou-se um pequeno aumento no número das células S100+ e Lang+ nas amostras de NICIII para câncer nos dois grupos de estudo (Tabelas 5 e 6).

Ao analisar a densidade de CL marcadas por CD83 de acordo com a gravidade da lesão constatou-se maior número dessas células em lesões de grau II para os dois grupos estudados, HPV+ e HPV16/18+ (Tabelas 4 e 5, figura 11C, 11D). Portanto, houve um aumento de células de Langerhans maduras de NICI→NICII associada a uma redução superior a 50% no número dessas células em amostras de NICIII.

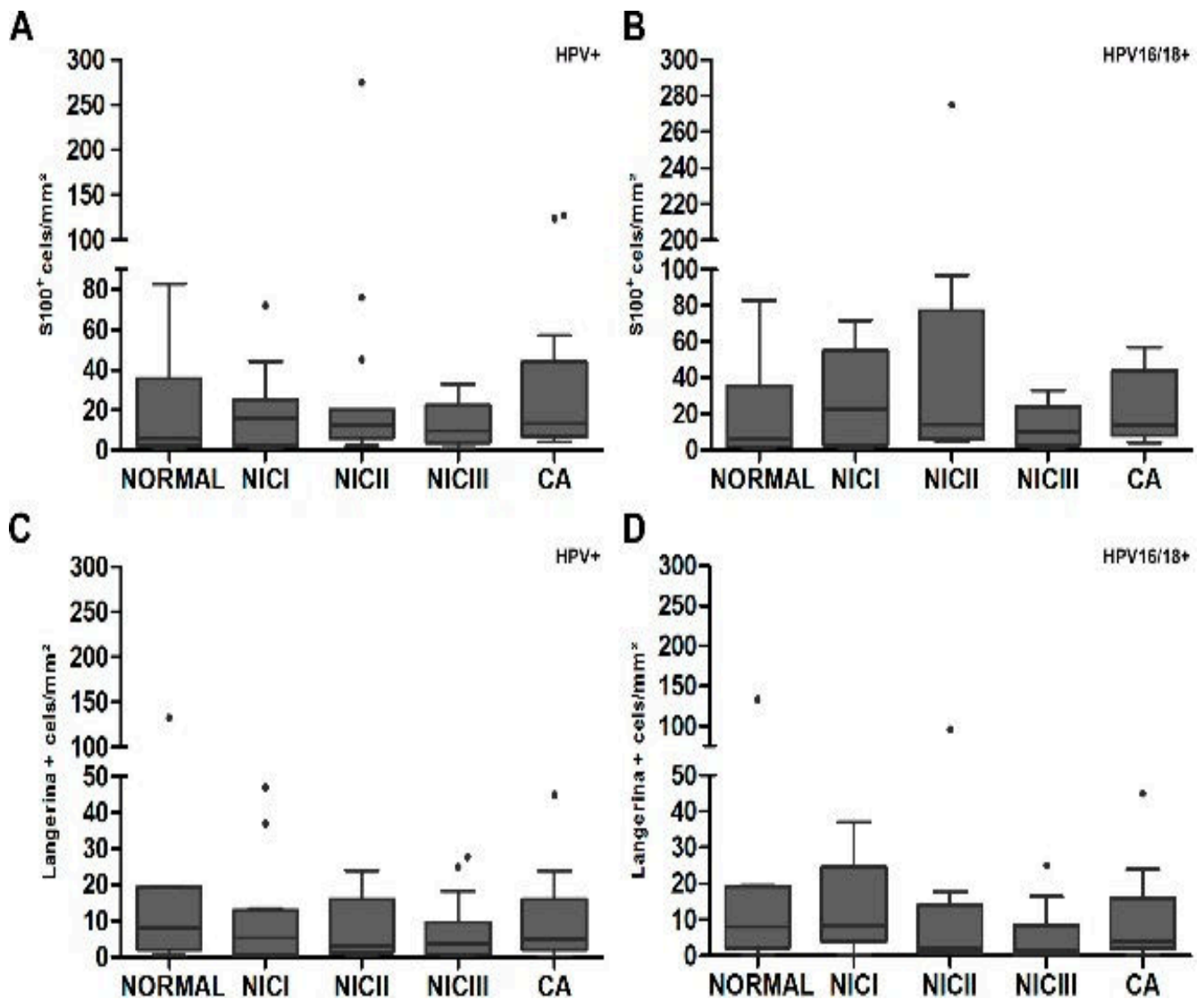


Figura 10: Comparação do número de células de Langerhans em amostras cervicais. Os gráficos expressam os valores das medianas (25%-75%) do número de células de Langerhans positivas para os marcadores S100 (A-B) e Langerina (C-D) no epitélio de amostras cervicais HPV+ (A e C) e HPV16/18+ (B e D). (*) $p < 0,05$. Escala: 0 a 300.

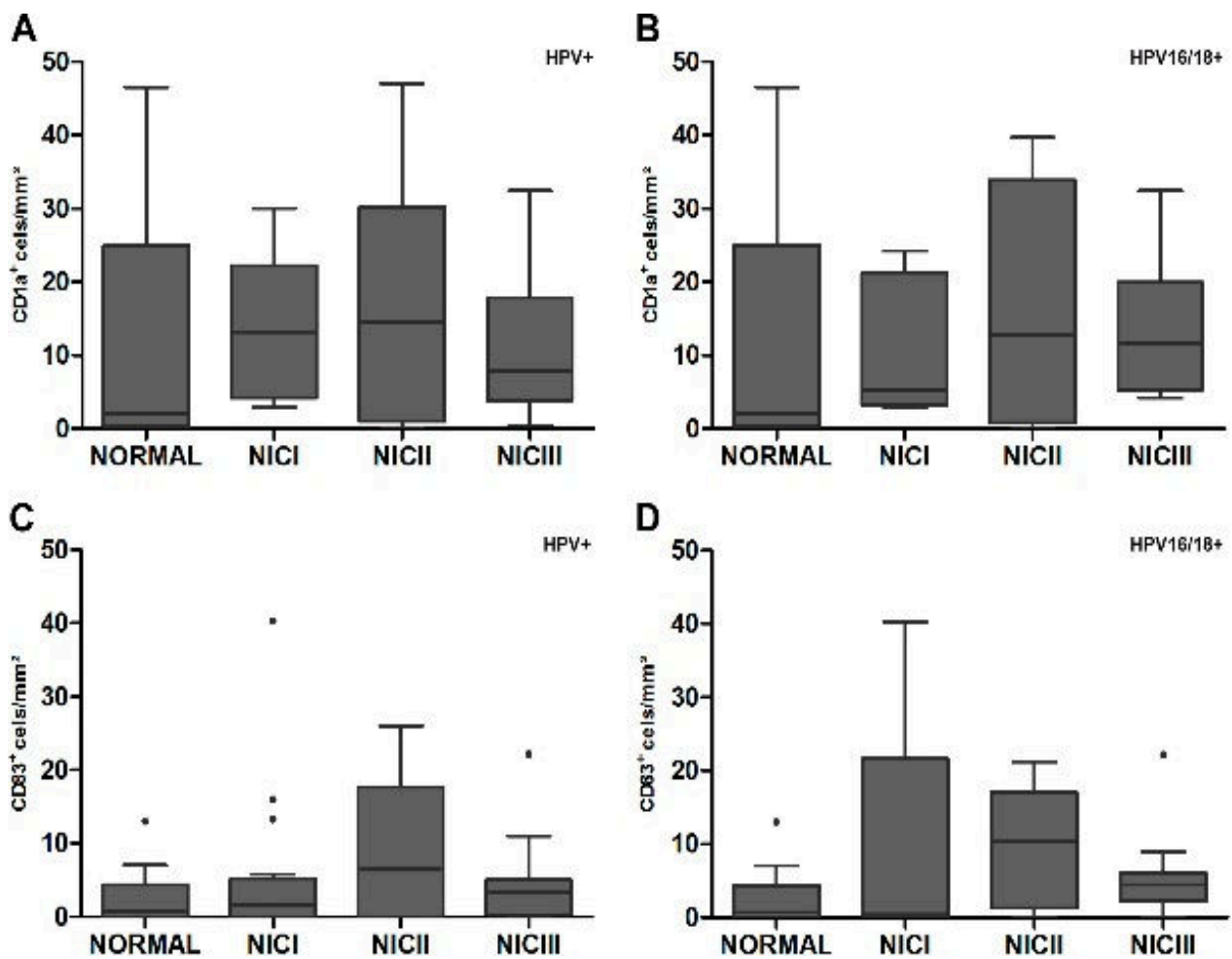


Figura 11: Comparação do número de células de Langerhans em amostras cervicais. Os gráficos expressam os valores das medianas (25%-75%) do número de células de Langerhans positivas para os marcadores CD1a (A-B) e CD83 (C-D) no epitélio de amostras cervicais HPV+ (A e C) e HPV16/18+ (B e D). (*) $P < 0,05$. Escala: 0 a 50.

5.3.4 ANÁLISE GLOBAL DAS SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS NO EPITÉLIO DE AMOSTRAS CERVICAIS

Nesse estudo ao realizar a análise do número de células T CD4+, CD8+ e granzima+ no epitélio de amostras de pacientes portadores de Lesões intra-epiteliais e em amostras com câncer cervical, em comparação com o número dessas células verificado em amostras controle, observou-se que há um aumento na densidade dessas populações em todos os graus de neoplasia cervical e de carcinoma. Este aumento foi observado em amostras de lesão dos dois grupos estudados, HPV+ e HPV16/18+ (Tabelas 4 e 5) e com significância estatística para a maioria dos casos, como verificado nos gráficos da Figura 12. Destaca-se o aumento de 85 vezes no número de células granzima B+ observado em tecidos de NICII em pacientes do grupo HPV+ em relação ao grupo controle (Tabela 5, Figura 12E).

Quando o número de linfócitos T foi analisado de acordo com a gravidade da lesão (NICI→NICII→NICIII) observou-se um aumento na densidade de linfócitos CD4+ de NICI→NICII com posterior queda de linfócitos em NICIII, seguida de um leve aumento nos grupos de câncer em ambos os grupos estudados, HPV+ e HPV16/18+ (Tabelas 4 e 5, Figuras 12A, 12B). Destaca-se a redução de células TCD4+ observada em amostras de NICII→NICIII em pacientes dos grupos HPV+ (queda de 60%) e HPV16/18+ (queda de 89,7%) com $P<0.05$ (Fig.s 12A e 14B).

Ao realizarmos a comparação da densidade de linfócitos TCD8+ em graus distintos de Neoplasia cervical e no carcinoma invasor, constatou-se acúmulo de células T CD8+ nas Neoplasias de grau II, em amostras provenientes tanto do grupo HPV+ quanto HPV16/18+ (Fig. 12C, 12D). Dessa forma, quando o número de linfócitos TCD8+ foi comparado de acordo com o grau da lesão, observou-se um aumento no número dessas células de NICI→NICII e grande redução no número destas células em NICIII, seguido de aumento dessa densidade em câncer. Observou-se uma queda, de aproximadamente, 80% no número de células TCD8+ entre NICII e NICIII, com significância estatística nos grupos HPV+ ($P=0.0023$) e HPV16/18+ ($P=0.0266$) (Tabelas 4 e 5 e Figuras 12C, 12D).

A análise de linfócitos granzima B+ (Fig. 12E-12F) no epitélio de amostras cervicais, revelou que células granzB+ se encontravam predominantemente em lesões do tipo NICII em amostras provenientes de pacientes do grupo HPV+, e em lesões de NICI amostras do grupo HPV16/18+ (Tabelas 4 e 5). De acordo com a gravidade da lesão, no grupo HPV+, ocorreu um aumento de células expressando granzima b de NICI→NICII, seguido de uma queda gradual no número dessas células de NICII→NICIII→CA valores

que alcançaram significância estatística (Fig. 12E). No entanto, no grupo HPV16/18+, observou-se maior densidade de células granzB+ em amostras de NICI, e, neste caso, houve uma queda significativa no número dessas células de NICI→NICII, com níveis similares do número dessas células em NICI e NICIII, seguida de uma queda de 76% no valor da mediana entre NICIII→CA ($P=0,0487$) Tabela 5- Figura12F.

Ao realizar a análise comparativa das razões CD8/CD4 no epitélio de amostras cervicais, verificou-se maior razão CD8/CD4 no grupo de lesão de NICII, tanto no grupo HPV+ como no grupo HPV16/18+, o que poderia estar associado ao elevado número de células CD8+ observado nesse sitio cervical. Observou-se uma diminuição da razão CD8/CD4 em NICIII em comparação às demais amostras nos grupos HPV+ e HPV16/18+, o que poderia indicar a redução de células CD8+ e/ ou CD4+ no epitélio de NICIII.

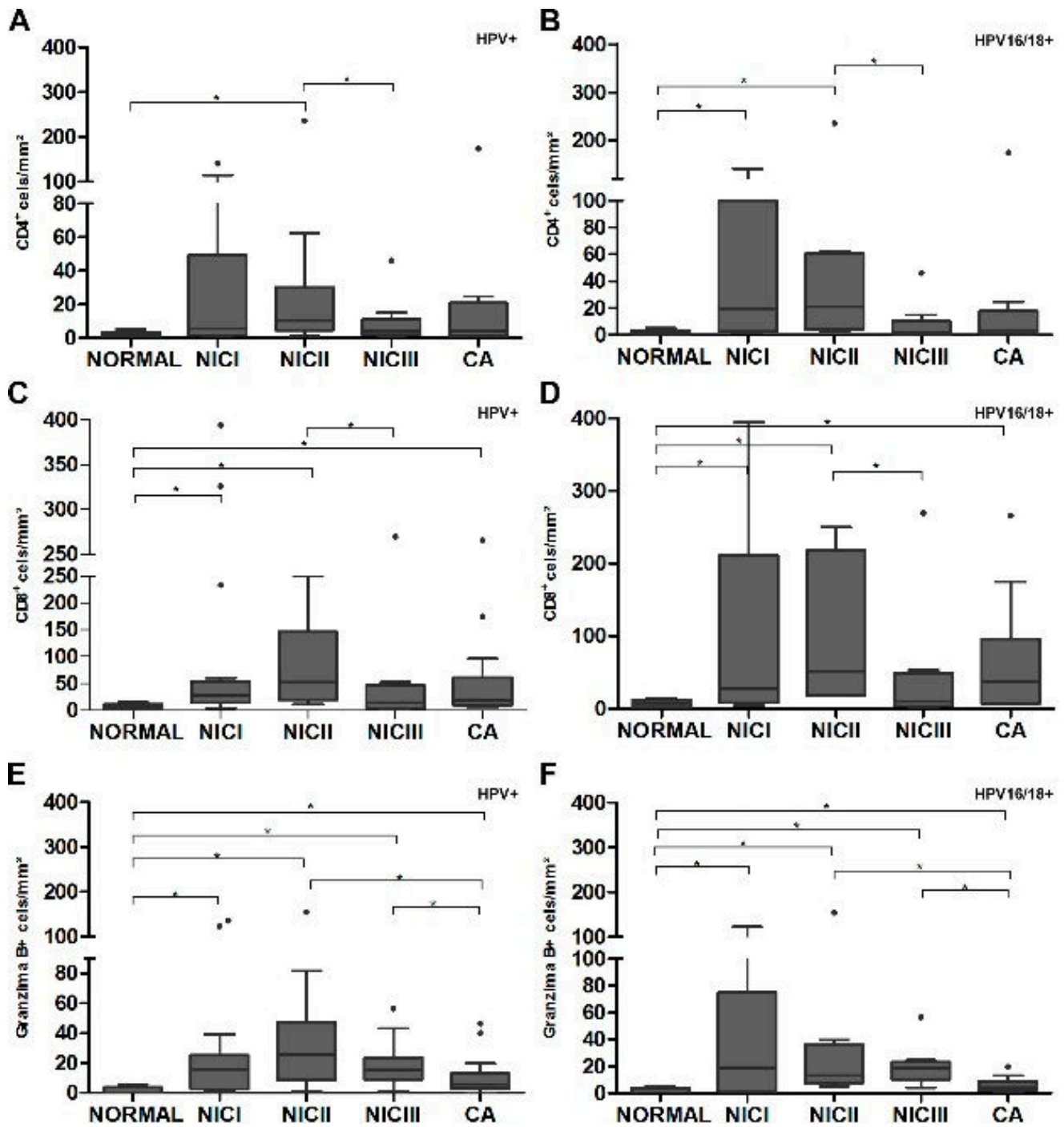


Figura 12: Comparação do número de Linfócitos T CD4+, CD8+ e granzima B+ em amostras cervicais. Os gráficos expressam valores da mediana (25%-75%) do número de linfócitos positivos para os marcadores CD4 (A-B), CD8 (C-D) e granzima B (E-F) no epitélio de amostras cervicais provenientes dos grupos HPV+ (A,C,E,D), HPV16/18+ (B,D,F) (*) $P < 0,05$. Escala: 0 a 400.

5.4 ANÁLISE DAS SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T NO EPITÉLIO E NO ESTROMA DE AMOSTRAS CERVICAIS

Neste estudo, também foi analisado o número de células imunocompetentes nos dois sítios distintos da cérvix uterina, no epitélio e no estroma. Para tal análise, foram utilizadas 66 amostras da mucosa cervical, sendo 16 amostras categorizadas como NICI, 19 como NICII, 16 como NICIII, 15 amostras de câncer e 10 amostras controles obtidas de mulheres hysterectomizadas não apresentando alterações cervicais. De acordo com a presença do DNA viral, as 66 amostras foram divididas em 2 grupos: HPV+, que abrange as amostras positivas para o DNA de qualquer tipo de HPV testado e HPV16/18+, que engloba as amostras positivas para o DNA do HPV16 e/ou HPV18. Destaca-se que o número de amostras classificadas como NICI, II, III e câncer foi variável nos dois referidos grupos (Tabela 7 e 8; Tabela 2, Anexo 3).

5.4.1 DETECÇÃO DE HPV E GENOTIPAGEM

O DNA do HPV foi encontrado em 95% (63/66) das amostras portadoras de alterações cervicais (Tabela 2, Anexo 3).

A detecção por PCR ou *Hemi-nested* PCR de fragmentos de DNA tipo-específicos nas amostras de NICs ou câncer (n=66) revelou que o HPV16 foi o tipo mais prevalente (22/66-42%), seguido pelo HPV35 (17/66-25%), HPV18 (12/66-18,2%) e HPV31 (11/66-16,6%) (Tabela 6 e Tabela 2, Anexo 3). Nas amostras de tecido analisados, o DNA dos HPVs 52 e 58 foi encontrado em proporção similares (8/66-16,6%), bem como o DNA do HPV33 (7/66-10,6%) e do HPV45 (5/66-7,57%).

Nas lesões de NICI o HPV35 (5/16-31%) foi o mais prevalente, com os tipos 31 e 35 (4/16-25%) e 16/18 (3/16-18,7%) exibindo proporções semelhantes. Vinte e cinco por cento das amostras do grupo NICI apresentaram positividade para dois ou mais tipos de HPV. Maior positividade para o DNA do HPV16 (8/19-42%) foi observada entre as amostras de NICII seguido do HPV52 (4/19-21%), o segundo mais frequente. Cinquenta por cento (8/16) das pacientes com NICIII foram positivas para o DNA do HPV16, e apresentaram frequências semelhantes do HPV18 e HPV35 (5/16-31,2%). Taxas de prevalência mais baixas para os outros tipos de HPV de alto risco analisados, foram observadas em amostras desse grupo de lesão. Dez das 16 (62,5%) amostras de NICIII foram infectadas com dois ou mais tipos de HPV, enquanto três (18,7%) pacientes apresentaram positividade para quatro tipos de HPV. Maior proporção das mulheres

(9/15-60%) com câncer invasivo foi positiva para o DNA do HPV16, com prevalência similar dos HPVs 31 e 35 (4/15-26%), seguido do HPV18 (3/15-20 %) o quarto tipo mais prevalente (Tabela 6 e Tabela 2, Anexo 3).

Tabela 6- Porcentagem dos tipos de DNA do HPV encontrados em cada grupo de pacientes com lesão pré-neoplásicas e neoplasias do colo do útero: NICI, II, III e CA* Distribuição e Tipagem de DNA dos HPVs*

Grupos (n=66)	HPV16	HPV18	HPV31	HPV33	HPV35	HPV45	HPV52	HPV58
NICI (n=16)	18,75%	18,75%	25%	25%	31,25%	25%	6,25%	6,25%
NICII (n=19)	42%	5,26%	0	5,26%	10,52%	5,26%	21,05%	10,52%
NICIII (n=16)	50%	31,25%	25%	6,25%	31,25%	0	12,5%	12,5%
CA (n=15)	60%	20%	26,6%	6,6%	26,6%	0	6,6%	20%

*NIC= Neoplasia intra-epitelial cervical; CA= Câncer cervical invasor.

5.4.2 SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T EM AMOSTRAS CERVICAIS

A Figura 13 apresenta imagens representativas de linfócitos T positivos para os marcadores CD4, CD8 e granzB.

Células T CD4+ positivas são observadas na cérvix normal (Fig.13A), porém verifica-se maior número dessas células no epitélio e no estroma de tecidos com lesão, particularmente em amostras de NICI e câncer (Fig.13B e 13E).

Um grande número de células CD8 positivas foi observado nos dois sítios cervicais sem alterações. Contudo, aumento expressivo de células T CD8+ foi observado no epitélio de NICI (Fig.13 G) e no estroma de NICII (Fig.13H).

Maior densidade de células granzima B+ são observadas em no estroma de tecidos com lesão e amostras controle quando comparadas ao epitélio (Fig.13K- 13O). Alterações morfológicas são observadas nas células granzima B+ nos infiltrados inflamatórios: células maiores são observadas no estroma de amostras controles (Fig.13K) enquanto células bem menores são observadas no infiltrado inflamatório de amostras de câncer (Fig.13O).

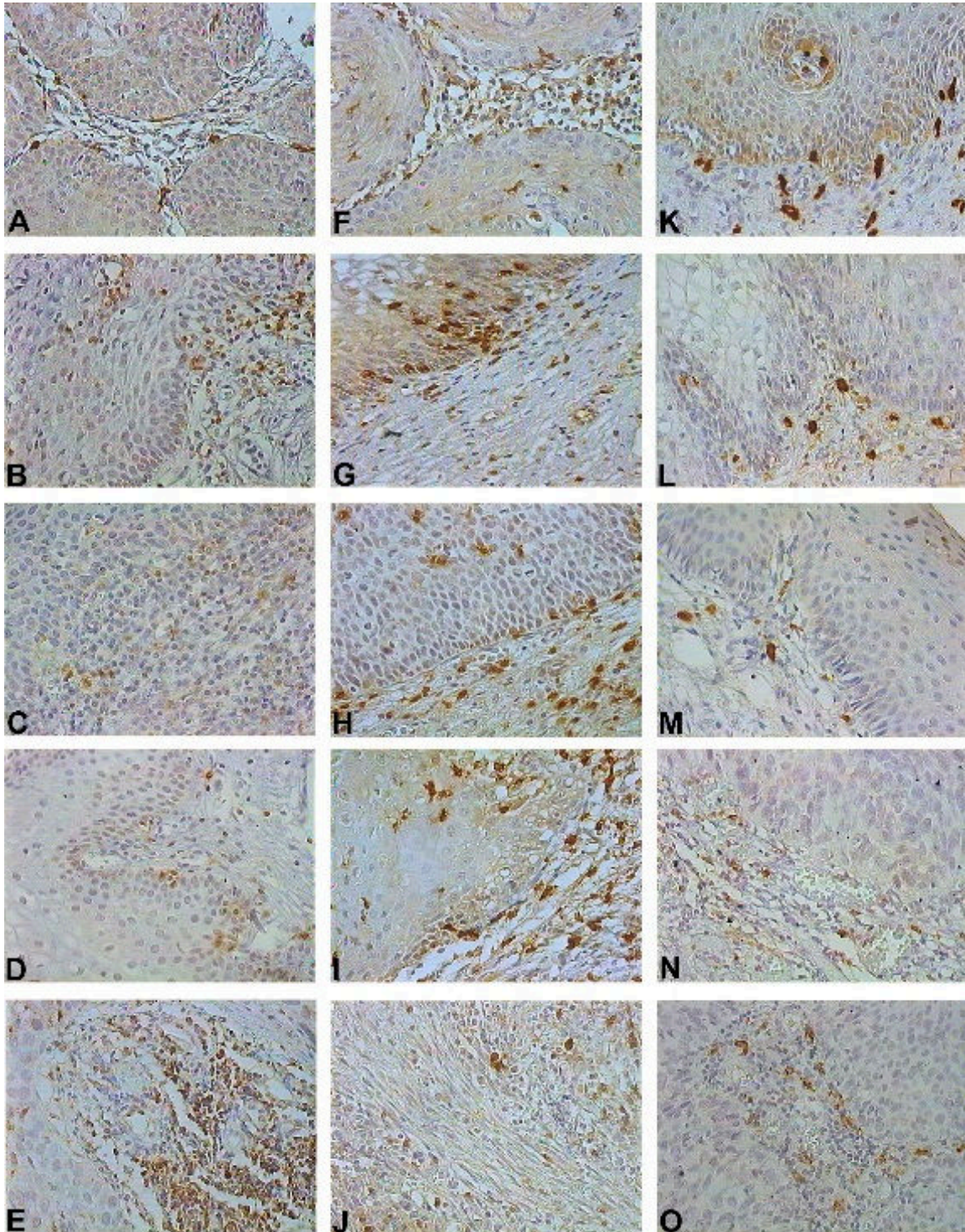


Figura 13: Imagens representativas de células imunocompetentes no epitélio e no estroma de amostras cervicais. Células positivas apresentam coloração marrom, e estão presentes no epitélio e no estroma de amostras cervicais sem alterações (A,F,K) ou naquelas portadoras de lesões escamosas intra-epiteliais de grau I (B,G,L), II (C,H,M), III (D,I,N) e câncer (E,J,O). As imagens correspondentes às células CD4+ (A-E), CD8+ (F-J) e granzima B+ (K-O) são indicadas. Os núcleos foram contra-corados com Hematoxilina de Harris. Aumento de 400X.

5.4.3 SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T NO COLO CERVICAL NORMAL

Todas as densidades numéricas de células CD4+, CD8+ e granzima B+ por mm² que foram expressas como mediana [25% -75 %], assim como os valores da razão de CD8/CD4 e da razão granzB/CD8 são mostrados nas Tabelas 7 e 8 para os grupos HPV+ e HPV16/18+, respectivamente.

A presença de linfócitos T com reatividade para os anticorpos anti-CD4, anti-CD8 e anti-granzima B, foi demonstrada na cérvix de pacientes sem alterações histopatológicas, com maior distribuição das subpopulações de células CD8+ e granzima B+ no estroma de amostras controles (Fig. 13F e 13k). No estroma de amostras normais, a densidade mediana de células CD8+ foi igual a 60 [13-91]/mm², de células granzima B+ foi de 33[19-50]/mm² e da razão granzB+/CD8+ foi 0.73[0.37-1.53] (Tabela 7). A densidade de linfócitos encontrados no epitélio foi menor quando comparado ao estroma, com menor número de células CD8+ (10[3-15]/mm²) e granzima B+ (1.87[0-3]/mm²), e com maior razão de granz/CD8 de (0.17 [0-0.31]) (Tabela 7). No entanto, essa diferença não foi observada na distribuição de células CD4 positivas entre o epitélio e o estroma de amostras controle.

5.4.4 SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS EM TECIDOS CERVICAIS DE PACIENTES DO GRUPO HPV+

Quando realizada a comparação entre o número das subpopulações de linfócitos T presentes nos tecidos cervicais portadores de lesão em relação às amostras controle, observou-se que a densidade de células TCD4+ foi maior no epitélio de tecidos com Lesão Intra-epitelial e com câncer invasor do que no epitélio de amostras controle (Tabela 7; $P < 0.005$ para NICII, NICIII e câncer). Maior densidade de células CD4+ foi observada nas amostras de câncer invasivo (14[3.4-39]), quando comparado às amostras controles ($P < 0.05$) e às demais lesões. Similarmente, no estroma das amostras cervicais do grupo HPV+, o número de células TCD4+ foi maior nos grupos de NIC e câncer quando comparadas às amostras de tecido normal ($P < 0.05$). Verificou-se maior número de células TCD4+ no estroma de amostras de câncer (108[18-297]) quando comparado às amostras sem alterações (3,24[0,93-4,72] – (Tabela 7, Fig.14B; $P < 0.05$). Em relação à gravidade da lesão, uma queda significativa de células CD4+ foi verificada de

NICII→NICIII tanto no epitélio quanto no estroma, com um aumento de cinco vezes no número de linfócitos CD4+células positivas no estroma de amostras de NICIII em relação às amostras de câncer com $P<0.05$ (Fig.14A, 14B).

Observou-se maior número de células TCD8+, no epitélio de todos os tipos de lesão intra-epitelial e câncer invasivo, quando comparado ao epitélio cervical de amostras normais (Tabela 7, Figura 14E, $P<0.05$), com queda significativa na densidade dessas células em lesões de NICIII, acompanhada por um aumento relevante no número de células TCD8+ em câncer ($P<0.05$). No estroma de amostras cervicais do grupo HPV+, foi verificado aumento na densidade de células CD8+ nos tecidos displásicos e neoplásicos, com aumento maior no número dessas células nas lesões de NICII (449[147-695]). Em relação à gravidade da lesão, uma queda significativa de células CD8+ foi observada entre as lesões de NICII→NICIII (168[59-278]/ mm²; $P<0.05$), assim como de NICII para câncer (117[63-396]/ mm²; Figura 14F; $P<0.05$).

A análise da razão de CD8/CD4 têm sido realizada em alguns estudos, e é considerada um parâmetro adequado para avaliar-se as características da resposta imune. A análise da razão CD8/CD4 no epitélio das amostras cervicais do grupo HPV+ com lesão intra-epitelial e câncer, revelou um aumento dessa razão em NICII e câncer quando comparado com valores de CD8/CD4 obtidos em amostras normais e nos demais grupos de lesão. Valores elevados nas razões de CD8/CD4 foram observados no estroma de todos os tipos de NIC, em comparação com tecidos normais e câncer, sendo o último o que apresentou a menor razão (Tabela 7).

Células granzima B positivas também foram encontrados no epitélio normal, mas verificou-se aumento de seu número de acordo com o grau da lesão. Portanto, um aumento notável de células granzima B+ foi observado no epitélio de todas as categorias NIC e câncer em relação às amostras controle ($P<0,05$). Destaca-se que, o número de células granzima B+ foi significativamente maior no epitélio de amostras de NICII do grupo HPV+ (38 [25-69] / mm²; Figura 14I; $P <0,05$).

Como observado no epitélio, em comparação com tecidos normais a densidade de células granzima B+ foi maior no estroma de todos os tipos de NIC e câncer ($P< 0,05$), com maior número de células granzima B positivas no estroma de NICI (106 [44-198]/ mm² ; Fig.14I). Em amostras cervicais do grupo HPV+, observou-se uma diminuição significativa de células granzima B+ no estroma de ambos, NICIII (64[31-92]) e câncer (4[18-80]/ mm²) em relação às amostras de NICI (Fig. 14J; $P< 0,05$).

A razão de granzima B⁺/CD8⁺ é um parâmetro que permite estimar a proporção relativa de células T citotóxicas no total da população de células TCD8⁺. Os valores da razão granzima B/CD8 observado no epitélio de todas as categorias de NIC e câncer foram maiores do que o observado no epitélio normal, com maior razão granzB/CD8 verificada em amostras de NICII (Tabela 7, $P < 0,05$). O aumento no valor dessa razão em amostras de NICII pode refletir o aumento de células granzima B⁺, ainda que na presença de elevado número de células TCD8⁺. Além disso, uma redução na razão granzB/CD8 foi observada em amostras de NICI e câncer do grupo HPV⁺, o que possivelmente poderia ser devido à diminuição de células granzima B⁺ (Figura14I) e / ou ao aumento de células T CD8⁺ (Figura14E).

A análise da razão de granzima B/CD8 no estroma das amostras cervicais normais e alteradas indicou redução dessa razão em amostras de NICI e NICII no grupo HPV⁺ (Tabela 7). Esses achados poderiam estar associados com o aumento das células CD8⁺, observado em ambas lesões displásicas (Fig.14F), apesar do alto número de células granzB⁺ observado no estroma de NICI e NICII (Fig. 14J).

Tabela 7: Quantificação das subpopulações de linfócitos T no grupo de amostras positivas para HPV*

Amostras		Densidade Celular (cels/mm ²)			CD8/CD4 razão	Granz/CD8 razão
		CD4+	CD8+	Granz B+		
Normal (n=10)	Estroma	3,24 [0,93-4,72]	60,55 [13,13-91,73]	33,3 [19,7-50,28]	11,60 [5,80-28,9]	0,73 [0,37-1,53]
	Epitélio	3,03 [1,9-5,2]	10,50 [3-15,6]	1,87 [0-3,93]	1,66 [0,29-3,68]	0,17 [0-0,31]
NICI (n=16)	Estroma	59,75 [6,25-208,5]	212,2 [84,5-485,3]	106,6 [44,4-198,4]	2,89 [1,13-4,34]	0,57 [0,27-0,99]
	Epitélio	13,35 [3,4-69,5]	61,35 [28,5-108,6]	17,40 [6,7-34,73]	1,59 [0,58-5,58]	0,27 [0,08-1,83]
NICII (n=19)	Estroma	85,3 [22-266]	449 [147,9-695,4]	97,50 [60,8-165,7]	3,51 [1,7-13,21]	0,43 [0,10-0,68]
	Epitélio	13 [4,5-29,9]	52 [21,7-207,7]	38,80 [25-69]	6,7 [3,11-11,61]	0,74 [0,16-3,93]
NICIII (n=16)	Estroma	21 [7,4-84,6]	168,8 [59,75-278,9]	64,4 [31,18-92,75]	5,35 [0,89-18,80]	0,33 [0,16-1,47]
	Epitélio	8,54 [2,9-14,9]	28,5 [11,2-50,25]	21,20 [13,7-44,15]	2,10 [0,85-4,52]	0,59 [0,13-1,83]
CA (n=15)	Estroma	108,7 [18,53-297]	117,9 [63-396,5]	52,42 [18-82,25]	1,37 [1-3,28]	0,36 [0,13-0,67]
	Epitélio	14,56 [3,4-39]	60 [37,9-120,6]	13,28 [5-34,86]	6,82 [1,81-15,77]	0,31 [0,04-0,74]

* Valores da mediana (25% - 75%) do número de linfócitos T (CD8+, CD4+, Granzima B+) presentes no epitélio e no estroma de amostras cervicais sem alterações histopatológicas, ou portadoras de lesões intra-epiteliais do tipo NICI, NICII, NICIII e câncer.

5.4.5 SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS EM TECIDOS CERVICAIS DE PACIENTES DO GRUPO HPV16/18+

O resultado da análise do número de células CD4+, CD8+ e granzB+ no epitélio e no estroma de tecidos com NIC e câncer de pacientes portadores do DNA do HPV16, HPV18 ou ambos os tipos são mostradas na Tabela 8 e Figura 14 (CD4: 14C,D; CD8: 14G,H; granzB: 14K,L).

Um aumento na densidade de células TCD4+ foi observado no epitélio de todos os tipos de tecidos com lesões pré-invasivas e câncer. A densidade dessas células foi maior no epitélio de NICI nas amostras do grupo HPV16/18+ (58[10-232]/mm²) em relação ao número de células CD4+ encontrados no epitélio da cérvix normal (3,03[1,9-5,2]/mm²) e de outros tecidos com NIC (Tabela 8, Fig.14C). Além disso, verificou-se

uma diminuição de 88% na frequência de células CD4+ em NICIII, quando comparado com NICI (Fig.14C; $P < 0,05$).

Em concordância com os resultados obtidos no epitélio, observou-se que a densidade dessas células foi radicalmente aumentada dentro do estroma de NICI, no grupo HPV16/18 (219[48-371]/mm²), quando comparada com a densidade de células CD4+ presentes no estroma normal (3,24[0,93-4,72] / mm² - $P < 0,05$) e em NICII, NICIII e câncer (Fig.14D). Como observado no epitélio, foi verificada uma redução semelhante de células CD4+ no estroma quando comparadas à amostras com NICI e NICIII, embora essa redução não tenha alcançado significância estatística. No entanto, houve um aumento significativo de células CD4+ de NICIII→CA nas amostras do grupo HPV16/18+ (Fig.14D; $P < 0,05$).

A análise comparativa do número de células TCD8+ presentes no epitélio de tecidos normais, com aqueles encontrados em tecidos displásicos e em amostras de câncer cervical, revelou números elevados de células TCD8+ em todos os tecidos de pacientes com alterações cervicais. Este aumento de células CD8+, foi particularmente notado no epitélio de NICII do grupo HPV16/18+ (148[23-340]/mm²), quando comparado com amostras da cérvix normal (10[3-15]/mm²) e com outros tecidos com NIC (Fig.14G; $P < 0,05$).

No entanto, nas amostras do grupo HPV16/18+ houve um declínio no número de células CD8+ no epitélio de NICIII em relação ao epitélio de NICII, com uma redução de aproximadamente 90% na densidade dessas células (14[10-34] mm²) (Tabela 8, Figura14G; $P < 0,05$). Observou-se, também, um aumento no número de células CD8+ no estroma de NICII (418[129-1035]/mm²) quando comparado com o número de TCD8 observado no estroma das amostras normais (60[13-91]/ mm²) e de outras lesões com NIC (Fig.14H; $P < 0,005$).

A análise comparativa das razões de CD8/CD4 observadas no epitélio de tecidos sem alteração ou naqueles apresentando lesões displásica ou neoplásica revelou um aumento na razão CD8/CD4 em tecidos de NICII e câncer. O aumento observado em tecidos de NICII pode estar associado tanto com a redução das células CD4+ quanto com um aumento de células T CD8+ (Figs. 14C e 14G). Uma diminuição notável da razão CD8/CD4 foi observada em NICIII em relação a todos os grupos analisados, o que poderia indicar a redução de células CD8+ e/ ou CD4+ no epitélio de NICIII (Tabela 8, Figs.14C e 14G).

Verificou-se um aumento significativo na razão CD8/CD4 no estroma de NICII das amostras pertencentes ao grupo HPV16/18+, que poderia estar associado ao elevado número de células CD8+ observado neste sítio cervical (Tabela 8; Figura14H). Curiosamente, uma redução significativa da razão CD8/CD4 em comparação com o estroma normal foi observada nas amostras de câncer (Fig.14D e 14H)

Ao realizar a comparação do número de células granzima B+ em amostras do grupo HPV16/18+ observou-se um aumento significativo no número dessas células no epitélio das lesões de NIC e de câncer invasor, em comparação com amostras normais ($P<0,05$). Como observado no epitélio das amostras do grupo HPV+, este aumento foi maior em NICII (48,8[9.37108.8]/mm²) e acompanhado da diminuição das células granzima B+ em NICIII (Tabela 10, Figura14K). Uma redução de células granzima B+ foi observada no estroma das amostras de câncer no grupo HPV16/18+, quando comparadas com aquelas presentes em tecidos de NICIII (91[38,5-107]; Figura14L).

A razão de granzB+/CD8+ mostrou-se maior no epitélio das lesões de NICIII no grupo HPV16/18+ (1,21[0,09-1,88]); ($P<0,05$), o que provavelmente reflete um aumento de células granzima B+, associado a um declínio no número de células T CD8+ (Figs. 14G e 14K). Além disso, a razão granzB/CD8 no epitélio mostrou-se reduzida em amostras de NICI e câncer, o que provavelmente poderia ser devido à diminuição de células granzima B+ (Fig.14K) e / ou a um aumento de células T CD8+ (Fig. 14G).

A análise comparativa das razões granzB+/CD8+ no estroma de tecidos sem alteração ou apresentando lesões intra-epiteliais ou neoplásicas revelou uma redução nessa razão em amostras de tecidos com NICI e NICII no grupo HPV16/18+ (Tabela 8). Essa redução pode estar associada com o aumento das células CD8+ observado nas lesões displásicas (Fig.14H), apesar do elevado número de células granzB+ no estroma de tecidos com NICI e com NICII (Fig. 14L).

Tabela 8: Quantificação das Subpopulações de Linfócitos T no Grupo de amostras positivas para HPV16 e ou HPV18

Amostras		Densidade Celular (cels/mm ²)			CD8/CD4 razão	Granz/CD8 razão
		CD4+	CD8+	Granz B+		
Normal (n=10)	Estroma	3,24 [0,93-4,72]	60,55 [13,13-1,73]	33,3 [19,7-50,28]	11,60 [5,8-28,96]	0,73 [0,37-1,53]
	Epitélio	3,03 [1,9-5,2]	10,50 [3-15,6]	1,87 [0-3,93]	1,66 [0,29-3,68]	0,17 [0-0,31]
NICI (n=5)	Estroma	219 [48,8-371,5]	343 [174-1310]	175,7 [71,4-41,50]	3,58 [2,11-27,50]	0,38 [0,17-0,65]
	Epitélio	58 [10,77-32,9]	73,60 [20,7-273,6]	19 [2,2-79,20]	1,43 [0,87-5,13]	0,10 [0,03-2,40]
NICII (n=8)	Estroma	192 [34,75-38,2]	418,5 [129,2-1035]	69,60 [42,50-6,18]	3,25 [1,35-11,33]	0,11 [0,07-0,34]
	Epitélio	28 [3-69,20]	148 [23,3-340,5]	48,85 [9,37-108,8]	4,9 [1,6-13,61]	0,51 [0,06-3,59]
NICIII (n=7)	Estroma	13 [4,3-85,40]	138 [53-258]	91 [38,50-107]	5,58 [1,67-40,97]	0,66 [0,16-1,66]
	Epitélio	6,96 [0,36-14,9]	14 [10-34,6]	22,60 [17-59]	0,98 [0-4,97]	1,21 [0,09-1,88]
CA (n=11)	Estroma	163 [16,49-297]	206 [67,59-396,5]	44 [18-80]	1,44 [1,11-5,49]	0,36 [0,04-0,45]
	Epitélio	9,77 [3,44-29,3]	60 [44-174,7]	9 [5-16,75]	6,9 [2,04-17,88]	0,23 [0,02-0,34]

*Valores da mediana (25% - 75%) do número de linfócitos T (CD8+, CD4+, granzima B+) presentes no epitélio e no estroma de amostras cervicais sem alterações histopatológicas, ou portadoras de lesões intra-epiteliais tipo NICI, NICII, NICIII e de câncer.

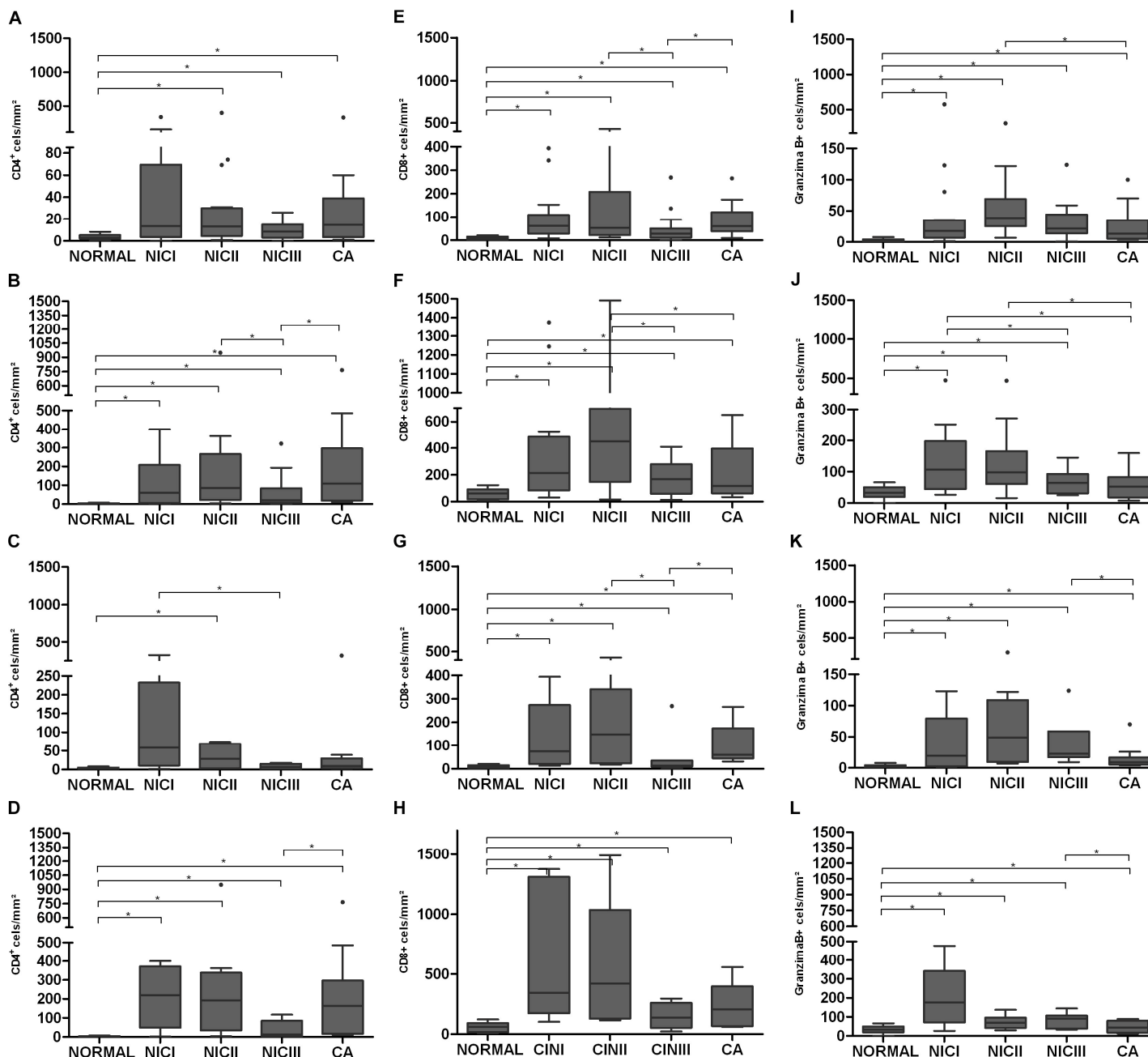


Figura 14: Comparação do número de linfócitos T CD4+, TCD8+ e granzima B+ em amostras cervicais. Os gráficos expressam valores da mediana (25% - 75%) do número de linfócitos TC4+ no epitélio (A, C) e no estroma (B, D); de linfócitos TCD8+ no epitélio (E, G) e no estroma (F, H); de linfócitos granzima B+ no epitélio (I, K) e no estroma (J, L) de amostras provenientes dos grupos HPV+ (1ª e 2ª linha) e HPV16/18+ (3ª e 4ª linha). (*) $P < 0,05$. Escala: 0 a 1500.

6. DISCUSSÃO

O papilomavírus humano (HPV) é o principal agente causador do câncer cervical e de suas lesões precursoras, sendo que na maioria dos casos, a infecção por esse patógeno é eliminada após a ativação da resposta imune. Contudo, ocasionalmente, as lesões cervicais não regridem e a progressão maligna da doença pode avançar, seguir sob condições apropriadas. Assim, a infecção viral persistente é necessária para a progressão neoplásica e a falha da eliminação viral é atribuída a uma deficiência na resposta imune. As células de Langerhans têm-se mostrado as células dendríticas responsáveis pelas funções de reconhecimento, processamento e apresentação de antígeno em mucosas, incluindo a cervical. Tais células constituem requerimento absoluto para que os Linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ possam eficientemente desempenhar as suas funções efetoras.

Escassos estudos foram direcionados a análise da densidade de CL em amostras cervicais considerando-se a presença da infecção pelo HPV ou de seus tipos de alto-risco, especialmente utilizando-se técnicas moleculares mais sensíveis para realização da tipagem viral. No presente estudo observou-se queda no número de CL Langerina⁺ e aumento de CL marcadas por S100, CD1a e CD83 em lesões cervicais apresentando os HPVs 16 e 18, assim como naquelas portadoras de sete tipos virais oncogênicos em comparação as amostras sem alterações histopatológicas.

A grande maioria dos estudos verificou redução da densidade de CL em amostras cervicais de graus distintos de NIC ou de carcinoma que foram positivas a infecção pelo HPV, detectada por critérios morfológicos (presença de coilócitos) ou moleculares (detecção de antígenos ou do DNA do HPV). Algumas hipóteses foram consideradas para a queda no número dessas células, como: (i) efeito citopático do HPV sobre as CL, argumento esse baseado na verificação de profundas alterações morfológicas em CL presentes em lesões positivas ao HPV e na presença de coilócitos que seriam resultantes da replicação viral; (ii) efeito na maturação de queratinócitos que resultaria na alteração da expressão de moléculas de superfície (como ICAMs, CD40, E-caderina, vimentina e filarina,). Foi proposto que alterações na expressão de antígenos de células epiteliais poderia acarretar em bloqueio ou redução da passagem de CL pelo epitélio ou de seus precursores originados de fontes próximas; (iii) efeito na produção por queratinócitos de citocinas e quimiocinas envolvidas na diferenciação, na ativação e na migração de CL, ou ainda no recrutamento de seus precursores mielóides. Essa hipótese foi baseada na

reconhecida redução na expressão tanto *in vivo* (mRNA) quanto *in vitro* de citocinas e quimiocinas (como GM-CSF, TNF alfa, interleucinas, MIP3 α , MCP1, entre inúmeras outras), verificadas em queratinócitos transfectados com oncoproteínas virais (E6 e E7 de HPVs de alto-risco) e linhagens celulares de carcinoma cervical (Hela, Siha, CasKi).

Poucos trabalhos avaliaram a densidade de células de Langerhans em amostras cervicais considerando-se a presença nessas lesões de tipos específicos do HPV ou mesmo o número de cópias do genoma viral presente (HAWTHORN *et al.*, 1988; VIAC *et al.*, 1990; MORELLI *et al.*, 1993a, b; AH-SALEH *et al.*, 1995; FLORES *et al.*, 2006). Em um desses estudos, observou-se redução do número de CL em amostras portadoras dos HPVs 16 e 18, com maior redução verificada em amostras apresentando elevado número de cópias do HPV16 (HAWTHORN *et al.*, 1988). Os autores sugeriram que a presença da infecção ativa pelo vírus, alteraria a expressão de moléculas da superfície de queratinócitos, que resultaria na redução da passagem ou aumento de velocidade de evasão das CL através do epitélio. A redução na produção de GM-CSF por queratinócitos, citocina indutora da diferenciação de CL, também foi considerada, sendo proposta pelos autores alteração na maturação e na migração de células de Langerhans.

Como anteriormente mencionado, resultados conflitantes foram observados em estudos dedicados a análise da densidade de CL em neoplasias intra-epiteliais cervicais e no câncer em comparação as amostras controle, sendo verificada redução dessas células em trabalhos baseados na marcação dessas células por **S100** (TAY *et al.*, 1987a; AL-SALEH *et al.*, 1995; CONNOR *et al.*, 1999; UCHIMURA *et al.*, 2004; NADAIS *et al.*, 2007), **anti-CD1a** (TAY *et al.*, 1987a; HAWTHORN *et al.*, 1988; HUGHES *et al.*, 1988; VIAC *et al.*, 1990; MORELLI *et al.*, 1992 e 1993; CONNOR *et al.*, 1999; MOTTA *et al.*, 1999; FLORES *et al.*, 2006; HAYATI & ZULLKARNAEN *et al.*, 2007) e **anti-Langerina** (FLORES *et al.*, 2006).

Contudo, em comparação a amostras de tecido sem alterações, um aumento no número de células de Langerhans foi observado em amostras de tecidos cervicais provenientes de pacientes portadoras de graus variados de NIC e carcinoma (MORRIS *et al.*, 1983; CAORSI *et al.*, 1986; McARDLE *et al.*, 1986; HACHISUGA *et al.*, 1989 e 2001; XIE *et al.*, 1990; TAKEHARA *et al.*, 1996; ABDU *et al.*, 1999; GIANNINI *et al.*, 2002; CAMPANER *et al.*, 2007; HAYATTI *et al.*, 2007). Esses autores consideraram que o aumento observado poderia ser ocasionado por: (i) desenvolvimento de uma resposta imune direcionada as células alteradas visando conter a progressão do processo neoplásico; (ii) elevação da taxa de migração de precursores de CL da medula óssea; (iii)

aumento de proliferação de CL já existentes; (iv) aumento do tempo de retenção de CL por períodos mais longos do que os observados em CL em migração no tecido normal (MORRIS *et al.*, 1983; CAORSI *et al.*, 1986; McARDLE *et al.*, 1986; HACHISUGA *et al.*, 1989 e 2001; XIE *et al.*, 1990; TAKEHARA *et al.*, 1996; ABDYOU *et al.*, 1999; GIANNINI *et al.*, 2002; CAMPANER *et al.*, 2007; HAYATI *et al.*, 2007).

Em nosso estudo verificou-se elevação na densidade de CL marcadas por S100 e Langerina em lesões portadoras de HPVs de alto-risco com maior aumento observado em NICI, enquanto que marcante aumento no número de CL marcadas por CD1a e CD83 foi observado em amostras de NICII.

Associação significativa entre o número de células imunocompetentes e o grau da NIC tem sido demonstrada em alguns estudos, indicando que a resposta imune no epitélio e no estroma cervicais consiste em um fator chave para a regressão ou progressão das lesões (TAKEHARA *et al.*, 1996; MONNIER-BENOIT *et al.*, 2006; MALUF *et al.*, 2008).

A progressão da neoplasia intra-epitelial cervical está diretamente relacionada ao curso ou a persistência da infecção pelo HPV, que depende de um equilíbrio entre os fatores virais (como os genótipos de HPV e a carga viral) e determinantes humanos, tais como aspectos genéticos e imunológicos (KASAP *et al.*, 2011; HIBMA *et al.*, 2014). Após a captura e processamento eficientes de antígenos de HPV, as células de Langerhans, células dendríticas epiteliais responsáveis pelo recrutamento e ativação de linfócitos T CD4/CD8 (TINDLE *et al.*, 2002; SCHUUHUIS *et al.*, 2006), desencadeiam o início da fase efetora da resposta imune (RI) para controlar de forma eficaz a progressão da lesão e da infecção por HPV (MERAD *et al.*, 2008). Nos últimos 30 anos, estudos sobre o esclarecimento dos mecanismos imunológicos envolvidos no controle desses eventos cervicais foram principalmente direcionados a resposta imune inata (revisão em TINDLE *et al.*, 2002; SCHUUHUIS *et al.*, 2006; MERAD *et al.*, 2008).

Nosso estudo teve como um dos objetivos caracterizar o número e a proporção de células T presentes em ambos sítios cervicais de amostras de tecidos pré-invasores e invasores, obtidos de pacientes portadoras do DNA de HPVs de alto risco, em comparação à distribuição das subpopulações de linfócitos T em tecidos cervicais saudáveis. Além disso, foi realizada uma análise morfométrica das células CD4, CD8 e granzima B em toda a área lesionada do epitélio, além dos linfócitos presentes nos infiltrados inflamatórios do estroma adjacente às lesões epiteliais e às áreas de invasão. Segundo o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a avaliar toda a extensão da área

lesionada de tecidos de NIC, em comparação a estudos anteriores que analisaram um número fixo de áreas intra-epiteliais. Além disso, a abordagem metodológica aqui utilizada tem vantagens sobre outros métodos menos quantitativos pela sua relevância universal, tornando possível realizar comparações com resultados obtidos de estudos que avaliaram amostras de tecidos de outras populações (KOBAYASHI *et al.*, 2004; MONNIER-BENOIT *et al.*, 2006; WOO *et al.*, 2008).

Os dados obtidos nesse estudo mostraram que os linfócitos T (especialmente células CD8+ e granzima B+) foram localizados principalmente no estroma e, em menor escala, no interior do epitélio de amostras normais. Estes dados são consistentes com um estudo imunohistoquímico que avaliou a distribuição de linfócitos T em um grande número de amostras de tecido do colo uterino sem anormalidades citológicas (POPPE *et al.*, 1998). A presença abundante de células T CD8+, no epitélio cervical normal sugere que o colo do útero, assim como a mucosa do intestino, é protegido por um grupo específico de linfócitos intra-epiteliais residentes (POPPE *et al.*, 1998; HAYDAY *et al.*, 2001; SHALE *et al.*, 2013).

Observou-se em nosso estudo um aumento do número de células CD4+ em amostras de NICI no grupo HPV+, mas especialmente no grupo HPV16/18+, tanto no epitélio como no estroma. Portanto, sugere-se que o surgimento das células T CD4+ nos estágios iniciais da infecção por HPV, na presença de alterações celulares de baixo grau, poderia assegurar a presença precoce de células efetoras para a eliminação do vírus (revisão em STANLEY *et al.*, 2012). Estudos *in vitro*, que avaliaram a presença de linfócitos T específicos para HPV em sangue periférico (PBL) também sugerem que as células T *Helper* desempenham um papel central no controle da infecção por HPV, tanto na regressão da doença quanto na eliminação do vírus (KADISH *et al.*, 2002; HONG *et al.*, 2004; SERESINI *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2012). Em alguns estudos, foi observado um número elevado de células CD4+ tanto no epitélio quanto no estroma de verrugas (COLLEMAN *et al.*, 1994) e lesões displásicas (EDWARDS *et al.*, 1995; TAKEHARA *et al.*, 1996; MONNIER-BENOIT *et al.*, 2006; ORIGONI *et al.*, 2013) com capacidade de regressão.

Em nosso estudo foi observado um aumento de células T CD4+ tanto no epitélio quanto no estroma de amostras câncer invasivo no grupo HPV+ ($P < 0,05$). Alguns

estudos foram baseados na análise quantitativa de células TCD4+ de sangue periférico, naturalmente isoladas (SPIVACK *et al.*, 1999; DAS *et al.*, 2001) ou estimuladas *in vitro* (KADISH *et al.*, 2002; JONG *et al.*, 2004), de pacientes com NIC e câncer cervical. Uma diminuição significativa de células TCD4+ de sangue periférico foi verificada em pacientes com NICs associadas ao HPV (Spivack *et al.*, 1999), e em lesões de NIC e câncer invasor (KADISH *et al.*, 2002; JONG *et al.*, 2004, DAS *et al.*, 2007). Em pacientes imunossuprimidos (MAIRMAN *et al.*, 1993), esta grave redução de células TCD4+ periféricos apoia o conceito de deficiência na imunidade mediada por células. Em consequência, taxas elevadas de prevalência de lesões persistentes associadas com vários tipos de HPV, e apresentando maior potencial de progressão para lesões mais severas têm sido observadas em pacientes com imunodeficiência de células CD4+ (revisão em FERENCZY *et al.*, 2003; PALEFSKY *et al.*, 2003; DENNY *et al.*, 2012). Porém, a diminuição de células T CD4+ circulantes, verificada em vários estudos em mulheres imunocompetentes com lesões pré-invasivas ou invasivas, pode estar possivelmente, relacionada com o recrutamento de células T auxiliares a partir do sangue aos sítios cervicais afetados (HAYDAY *et al.*, 2001; TINDLE *et al.*, 2002).

Um elevado número de linfócitos CD8+ foi observado em todos os tipos de lesões de NIC, como descrito em estudo recente (BEDOYA *et al.*, 2013), mas um número elevado de células CD8+ infiltradas foi especialmente observado no estroma de NICII, nos grupos HPV+ e HPV16/18+. Nós consideramos, esse achado um dos relevantes do nosso estudo, uma vez que esse dado sugere, fortemente, que o recrutamento de células T CD8+ ocorre no estroma de pacientes com NIC, possivelmente, para controlar os eventos celulares que promovem alterações celulares no epitélio lesionado, interrompendo deste modo a progressão de NICII para lesões mais graves (ZURHAUSEN, 2002).

Estes dados são particularmente, importantes no contexto da implementação de estratégias de vacina contra o HPV. Duas vacinas profiláticas, seguras e altamente eficazes, são disponíveis atualmente contra o HPV, uma bivalente (Cervarix™) e uma quadrivalente (Gardasil®), sendo consideradas a intervenção mais eficaz para controlar a infecção pelo HPV e o câncer cervical, particularmente nos países em desenvolvimento (DE VICENZO *et al.*, 2014). Acima de 100 países já detiveram a licença destas vacinas, e alguns já as incluíram nos seus Programas Nacionais de Imunização (VILLA *et al.*, 2006). Após obtido licença para utilização de ambas vacinas desde Junho de 2011, o

Brasil introduziu em seu programa de vacinação, a vacina tetravalente com o objetivo de alcançar o lançamento nacional da vacinação pelo HPV até 2014 (SERRANO *et al.*, 2014). Essas vacinas devem oferecer proteção a longo prazo, às mulheres que permanecem, por longos períodos, sob risco de infecção pelo HPV (VILLA *et al.*, 2006; HARPER *et al.*, 2009). Além disso, para proporcionar proteção contra novas infecções por HPV, o parâmetro mais importante para a avaliação da eficácia da vacina a longo prazo em programas de vacinação implementados em todo o mundo, é a eficiência da vacina em evitar ou minimizar o ocorrência de lesões do tipo NICII, que é considerada a fase pré-neoplásica limite para ser monitorada em participantes de programas de vacinação acompanhadas por estudos longitudinais (*follow-up*) de longo prazo (HARPER *et al.*, 2009; NAUD *et al.*, 2014; SERRANO *et al.*, 2014). Neste contexto e com base em nossos resultados, a lesão de NICII pode ser considerada como uma etapa importante e limite de progressão neoplásica, para a qual a RI cervical está provavelmente dirigida durante as etapas intra-epiteliais de transformação maligna que ocorrem no colo do útero. Para reforçar a nossa hipótese, observou-se nesse estudo um aumento significativo de células CD8+ em tecidos com NICII, enquanto uma grave redução de células T CD8+, simultaneamente à depleção de células T CD4+, foi verificado a partir de lesões de NICIII. Além disso, uma elevada densidade de células T CD8+ foi observada em ambos os sítios (epitélio e estroma) do colo do útero em amostras de câncer, em ambos os grupos de HPV.

O primeiro estudo *in vitro*, desenvolvido para caracterizar fenotipicamente linfócitos infiltrantes de tumor (TILs- *Tumor infiltrating lymphocytes*), isolados a partir de biópsias de carcinoma de células escamosas (CCE) demonstrou que a população de TILs predominantes nesses estudos eram de células T CD8+ exibindo capacidade citotóxica contra linhagens celulares transformadas (i.e. células CaSki) (GOSH *et al.*, 1992). Experimentos de caracterização fenotípica das subpopulações de TILs originados de pacientes com NIC (BELL, *et al.*, 1995), ou de TILs de pacientes com adenocarcinoma (Shew *et al.*, 1999) e CCE (SHEW *et al.*, 1999; SANTIN *et al.*, 2001), demonstraram uma redução de células T CD4+, acompanhados por um aumento intenso no número total de células T e de linfócitos TCD8+. Além disso, alterações nos parâmetros imunológicos de subpopulações de TILs foram mais drasticamente observadas em tumores volumosos e metastáticos, sendo esses parâmetros considerados associados com a progressão do CCE (SHEW *et al.*, 1999).

Outros estudos *in vitro* demonstraram que células TCD4+ e TCD8+ isoladas de pacientes portadores de NIC e CCE eram capazes de reagir contra peptídeos E6 e E7 do HPV16 (EVANS *et al.*, 1997; NAKAGAWA *et al.*, 2000 e 2012; KADISH *et al.*, 2002; KIM *et al.*, 2012) e E6 do HPV18 (SERISINI *et al.*, 2007). Além disso, *tILs* CD4+ e CD8+ foram isoladas com sucesso de lesões de NIC (BELL *et al.*, 1995; EVANS *et al.*, 1997; TRIMBLE *et al.*, 2010) de biópsias de CCE (GOSH *et al.*, 1992; EVANS *et al.*, 1997; SHEW *et al.*, 1997). Análises fenotípicas de linfócitos T antígeno-específicos para o peptídeo E7 do HPV16 que foram isolados de sangue periférico (PBL), de linfonodos adjacentes de tumores cervicais (LNL, *Lymph-node Lymphocytes*) e de tecidos cervicais de 35 pacientes com estágios IB a IIA de CCE, revelaram que uma maior proporção de *TILs* CD4+ e CD8+ expressavam IL2 e IFN- γ sob estímulo com os péptidos E7 do HPV16, em comparação com a expressão verificada em LNDs e PBLs. Baixas porcentagens de células T IL4+ foram detectadas apenas em PBLs de pacientes com CCE (SANTIN *et al.*, 2001). Em outro estudo observou-se que subpopulações de células TCD4+ de PBL isolados de pacientes com lesão de alto grau produziram a mistura de citocinas Th1 e Th2, quando estimulados *in vitro* com peptídeos E6 do HPV18. Além disso, a quantidade de IFN- γ produzido pelas células T CD4+ isoladas de PBL poderia proteger contra a persistência da infecção e/ou a recidiva da doença após cirurgia (SERESINI *et al.*, 2007).

Poucos estudos se dedicaram a explorar a resposta imune mediada por células no contexto da infecção pelo HPV (BONTKES *ET AL.*, 1997; MONNIER-BENOIT *et al.*, 2006; ALVES *et al.*, 2010). Portanto, nosso estudo teve como um dos objetivos caracterizar o número de células T CD4+, CD8+ e granzima B+, assim como as razões entre essas populações em amostras de NIC e câncer positivas para (i) o DNA dos HPVs 16 e 18, que são considerados responsáveis pela ocorrência de quase 70% das lesões de NIC e 95% de câncer invasivo (ZUR-HAUSEN 2009; GARCIA-SPINOZA *et al.*, 2012), e para os quais as vacinas monovalente e bivalente são direcionadas (HARPER *et al.*, 2009), e para (ii) os sete tipos mais prevalentes de HPVs de alto risco, que são os alvos da nova vacina nonavalente de novos ensaios clínicos que já se encontram em fase de testes clínicos (DROLET *et al.*, 2014).

Dados regionais sobre a distribuição e prevalência dos tipos de HPV são essenciais para se estimar o impacto das vacinas sobre o câncer cervical e em programas de rastreamento. Um estudo recente investigou a prevalência de 9 tipos de HPV para os quais

a nova vacina nonavalente é direcionada, em 540 mulheres brasileiras que apresentaram lesões de baixo e alto grau HPV-positivas (SERRANO *et al.*, 2014). Os resultados globais dos tipos de DNA de HPV encontrados nesta *coorte* foram semelhantes às proporções observadas em nosso estudo. Além dos tipos HPV16 e18, os sete demais tipos incluídos na nova vacina 9-valente apresentaram uma notável ocorrência em lesões pré-neoplásicas de mulheres procedentes dos quatro países analisados, incluindo o Brasil. Assim, a utilização da nova vacina resultaria em redução de lesões neoplásicas acarretadas por um dos nove tipos incluídos, assim como na redução dos valores gastos em programas de tratamento público (SERRANO *et al.*, 2014, DROLET *et al.*, 2014).

Nesse estudo foi verificada uma predominância de células T CD4+ no epitélio e no estroma de tecidos de NICI positivos para os HPV16/18, e em lesões de NICII positivos para um ou mais dos tipos de HPV testados. No entanto, houve uma maior prevalência de células T CD8+ no estroma NICII de amostras HPV+, assim como em ambos os sítios cervicais de amostras NICII do grupo HPV 16/18+. Assim, além de estar envolvida no controle da progressão de NICII para lesões mais severas, como discutido anteriormente, uma densidade mais elevada de células T CD4+ e células T CD8+ observada em lesões NICII pode ser devido a um recrutamento mais eficiente das células T na presença dos HPVs 16 e/ou 18, em comparação à infecções resultantes da presença de outros tipos de HPV de alto risco. Trabalhos adicionais seriam necessários para se definir com mais precisamente, o fenótipo e a função das populações de linfócitos que se infiltram em lesões causadas por diferentes genótipos de HPV.

A granzima (granz) B é uma proteína que existe no interior de grânulos citoplasmáticos de células T citotóxicas e só é expressa após ativação. Essa proteína também ajuda a induzir a apoptose em células infectadas por vírus, destruindo assim essas células (LORD *et al.*, 2003). Uma maior porcentagem de linfócitos T citotóxicos (CTL) ativados foi observado em ambos, epitélio e estroma de amostras cervicais alteradas citologicamente. De forma interessante, tecidos de NICII exibiram densidades mais elevadas de células granz B+ entre todas as categorias de lesões analisadas. No que diz respeito à progressão de NIC, foi observado um aumento das células granzima B positivas de NICI para NICII, associado a diminuição de células granzima B+ de NICII para NICIII no epitélio dos pacientes todos os grupos de HPV analisados. No entanto, no estroma cervical foi observada uma maior densidade destas células em NICI, com uma redução gradual de células granzima B+ de acordo com a severidade das lesões em ambos os

grupos de HPV analisados. Surpreendentemente, foi observada uma diminuição acentuada de células granzima B no epitélio e no estroma de tecidos de câncer invasivo de ambos os grupos, HPV+ e HPV16/18+.

A análise comparativa do número de células TCD8+, TIA+ e granzima B+ em 24 amostras de NIC e 14 amostras de CCE revelou que as lesões de NIC estariam infiltradas por um número maior de células TCD8+, 50% TIA+ e 0-10% células granzima B+, enquanto numerosas células granzima B+ (15-100%) estavam presentes em infiltrados de células T CD8+ de tecidos com CCE (WOO et al, 2008). Além do presente trabalho, outros dois estudos avaliaram a densidade de células granzima B+ em tecidos cervicais obtidas de mulheres brasileiras (KONDO *et al.*, 2005; BELFORT-MATTOS *et al.*, 2010). Um aumento no número médio de linfócitos granzima B+ de acordo com a severidade da lesão foi verificado em tecidos de 45 pacientes com doença cervical (negativos = 7,11cels/mm²; NIC = 33,4 cels/mm²; SCC = 139,7 cels/mm²); (KONDO *et al.*, 2005). Outro estudo observou em amostras cervicais obtidas de 107 pacientes com NIC (NICI= 43, II= 33 e III= 31) um aumento no número de células granzima B+ e na porcentagem de amostras positivas de acordo com a severidade da neoplasia intra-epitelial (BELFORT-MATTOS *et al.*, 2010). Além disso, verificou-se um maior número de células TCD8+ e granzima B+ em lesões de alto e baixo grau que regrediram, em comparação com lesões displásicas persistentes e progressivas (WOO *et al.*, 2008; BELFORT-MATTOS *et al.*, 2010).

A persistência da infecção por HPV pode ocorrer quando o HPV escapa eficientemente do sistema imune inato e impede a ativação da resposta imune adaptativa. No entanto, uma resposta imune eficaz contra as infecções pelo HPV é estabelecida em alguns casos, sendo caracterizada pela imunidade mediada por células que resulta em regressão da lesão. Apesar do papel óbvio da mucosa cervical na transmissão sexual dos HPVs de alto risco, a maioria dos trabalhos desenvolvidos sobre o alcance e a eficácia das vacinas contra o HPV publicados não incluíram a avaliação da resposta imune em mucosas. Neste contexto, os resultados obtidos em nosso estudo são potencialmente interessantes e clinicamente relevantes. Eles demonstram que subpopulações de células T são recrutados para a mucosa cervical para estabelecer e manter uma resposta efetiva na qual os linfócitos infiltrados estejam comprometidos com o controle da progressão da NIC. Portanto, a estimulação adequada da resposta imune local, utilizando estratégias como a utilização de vacinas profiláticas, ou tratamentos que estimulem a imunidade local

no início da infecção, pode contribuir de forma ímpar para o controle da progressão neoplásica na cérvix uterina.

- No presente estudo, observou-se nas amostras estudadas, prevalência crescente dos HPVs tipos 16, 35 e 18. Nas amostras de câncer o HPV16 esteve presente em 60% das pacientes o que confirma sua já estabelecida associação com a patogênese do câncer.
- Verificou-se maior densidade de células de Langerhans (S-100+, CD1a+, CD83+), das populações linfocitárias (CD4+, CD8+ e células granzima B+) presentes no epitélio de amostras de lesões positivas para o HPV em comparação com as amostras controles, o que sugere recrutamento de células imunocompetentes em resposta à infecção por HPVs de alto risco.
- Observou-se, nas amostras de lesões cervicais estudadas, menor número de células Langerina+ quando comparado aquele das amostras controles, especialmente nas lesões do tipo II.
- Verificou-se predominância de células CD1a+ (células imaturas) e CD83+ (células maduras) nas lesões do tipo NICII e queda nas lesões NICIII.
- Nas amostras de lesões cervicais estudadas, observou-se maior número de linfócitos T positivos no estroma, preferencialmente localizados adjacentes às lesões displásicas.
- A análise das subpopulações linfocitárias nos dois sítios da cérvix uterina (epitélio e estroma) em lesões cervicais em comparação às amostras controles, demonstrou um aumento significativo no número das células marcadas por CD4, CD8 e granzima B, em todos os grupos analisados.
- A análise de linfócitos TCD4 (epitélio/estroma) quanto à severidade da lesão, mostrou um acúmulo dessas células em Câncer no grupo HPV+. No entanto, no grupo HPV16/18+ observou-se maior densidade de células CD4+ em NICI.
- Observou-se maciça presença de células T CD8+ e granzima B+ no epitélio de lesões neoplásicas do tipo NICII. No entanto, observou-se que nos dois grupos HPVs positivos estudados, queda brusca no número de células imunocompetentes (CD4+, CD8+ e granzima B+) em NICIII.

- Foi verificado um aumento de células TCD4+, TCD8+ nas amostras de carcinoma (epitélio e no estroma). No entanto, houve queda no número de células granzima B+ o que poderia ser indício de tolerância antigênica.

- No presente estudo foi observado grande número de CL e linfócitos em NICII seguido de grande queda na densidade destas células em NICIII. Sendo assim, as lesões de NICII poderiam ser consideradas como uma fase importante e limitante da progressão neoplásica, e para as quais a Resposta imune cervical estaria provavelmente direcionada durante a transformação maligna do epitélio cervical.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOU LA, EL-GAZAYERLY IM, EL-SHAZLEY LY, ZOHEIR MA, KHOLEIF AE, EL-SEDFY AS. Immunohistochemical and ultrastructural study of Langerhans's cells in squamous cell carcinoma of the cervix. *J Obstet Gynaecol Res* 25:15-21. 1999.

AHMED SM, AL H, REID WM, JOHNSON MA, POULTER LW. The cellular response associated with cervical intraepithelial neoplasia in HIV+ and HIV- subjects. *Scand J Immunol* 56(2):204-11. 2002.

AKTAS E, ERTEN G, KUCUKSEZER UC, DENIZ G. Natural killer cells: versatile roles in autoimmune and infectious diseases. *Expert Rev Clin Immunol* 5:405-20. 2009.

AL-SALEH W, DELVENNE P, ARRESE JE, NIKKLES AF, PIERARD GE, BONIVER J. Inverse modulation of intraepithelial Langerhans' cells and stromal macrophage-dendrocyte populations in human papillomavirus-associated squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Virchows Arch* 427: 441-48. 1995.

ALVES DB, TOZETTI IA, GATTO FA, CASSANDRI F, FERREIRA AM, CARLOS EURICO DOS SANTOS F, FALCÃO GR, SCAPULATEMPO ID, PADOVANI CT, ABDO MA. CD4 and CD8 T lymphocytes and NK cells in the stroma of the uterine cervix of women infected with human papillomavirus. *Rev Soc Bras Med Trop.* 43(4):425-9. 2010.

ANDERSSON S, WANGSA D, FLORES-STAINO C, SAFARI H, MINTS M, HJERPE A, HAGMAR B, JOHANSSON B. Expression of p16INK4a in relation to histopathology and viral load of 'highrisk HPV types in cervical neoplastic lesions. *Eur J Cancer.* 42(16):2815-2820. 2006.

ANJUÈRE F, MARTINEZ DEL HOYO G, MARTÍN P, ARDAVÍN C. Langerhans cells acquire a CD8+ dendritic cell phenotype on maturation by CD40 ligation. *J Leukoc Biol* 67: 206-9. 2000.

ANJUÈRE F1, DEL HOYO GM, MARTÍN P, ARDAVÍN C. Langerhans cells develop from a lymphoid-committed precursor. *Blood.*96(5):1633-7. 2000.

ARANY I, EVANS T, TYRING S. Tissue specific HPV expression and downregulation of local immune responses in condylomas from HIV seropositive individuals. *Sex Transm Inf* 74:349-353. 1998.

ARIAS-PULIDO H, PEYTON CL, JOSTE NE, VARGAS H, WHEELER CM. Human papillomavirus type 16 integration in cervical carcinoma in situ and in invasive cervical cancer. *J Clin Microbiol.* 44(5):1755-62. 2006.

BANCHEREAU J, STEINMAN RM. Dendritic cells and the control of immunity *Nature* 392,245-252. 1998.

BANCHEREAU J, BRIERE F, CAUX C, DAVOUST J, LEBECQUE S, LIU YJ, PULENDRAN B, PALUCKA K. *Immunobiology of dendritic cells Annu. Rev. Immunol* 18,767-811. 2000.

BARKER JN, MITRA RS, GRIFFITHS CE, DIXIT VM, NICKOLOFF BJ Keratinocytes as initiators of inflammation. *Lancet* 337:211–214. 1991.

BELFORT-MATTOS PN, FOCCHI GR, SPECK NM, TAHA NS, CARVALHO CR, RIBALTA JC. Immunohistochemical expression of granzyme B and vascular endothelial growth factor (VEGF) in normal uterine cervixes and low and high grade squamous intraepithelial lesions. *Eur J Gynaecol Oncol*. 31(4):459-61. 2010.

BELL, M. C., R. P. EDWARDS, E. E. PARTRIDGE, K. KUYKENDALL, W. CONNER, H. GORE, E. TURBAT-HERRERA AND P. A. CROWLEY-NOWICK. CD8+ T lymphocytes are recruited to neoplastic cervix. *J Clin Immunol* 15(3): 130-136. 1995.

BELL D, CHROMARAT P, BROYLES D, NETTO G, HARB GM, LEBECQUE S, VALLADEAU J, DAVOUST J, PALUCKA KA, BANCHEREAU J. In breast carcinoma tissue, immature dendritic cells reside within the tumor, whereas mature dendritic cells are located in peritumoral areas. *J Exp Med* 190:1417-1426. 1999.

BELL MC, SCHMIDT-GRIMMINGER D, TURBAT-HERRERA E, TUCKER A, HARKINS L, PRENTICE N, CROWLEY-NOWICK PA. HIV+ patients have increased lymphocyte infiltrates in CIN lesions. *Gynecol Oncol*. 76(3):315-9. 2000.

BERKHOUT RJ, BOUWES BAVINCK JN, TER SCHEGGET J. Persistence of human papillomavirus DNA in benign and (pre) malignant skin lesions from renal transplant recipients. *J Clin Microbiology* 38: 2087-96. 2000.

BERNARD HU, BURK RD, CHEN Z, VAN DOORSLAER K, HAUSEN HZ, DE VILLIERS EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 401(1):70-79. 2010.

BIRNBERG T, BAR-ON L, SAPOZNIKOV A, CATON M L, CERVANTES-BARRAGAN L, MAKIA D, KRAUTHGAMER R, BRENNER O, LUDEWIG B, BROCKSCHNIEDER D, RIETHMACHER D, REIZIS B, JUNG S. Lack of conventional dendritic cells is compatible with normal development and T cell homeostasis, but causes myeloid proliferative syndrome. *Immunity* 29,986–997. 2008.

BIRBECK MS, BREATHNACH AS, EVERALL JD. An electron microscopic study of basal melanocytes and high level clear cells (Langerhans cell) in vitiligo. *J Invest Dermatol* 37: 51–64. 1961.

BLANCHON S, DEMRET C. The Regulatory E2 Proteins of Human Genital Papillomavirus are pro-apoptotic. *Biochimie*. 85: 813-819. 2003.

BLINK EJ, TRAPANI JA, JANS DA. Perforin-dependent nuclear targeting of granzymes: a central in the nuclear events of granule exocytosis-mediated apoptosis? *Immunol Cell Biol* 77(3):206-215. 1999.

BONTKES HJ, GRUIJL TD, WALBOOMER JMM, VAN DEN MUYSENBERG AJC, GUNTHER AW, SCHEPER RJ. Assesment of cytotoxic T lymphocyte phenotype using the specific markers granzyme B and TIA-1 in cervical neoplastic lesions. *Br J Cancer* 76(10): 1353-1360. 1997.

BOSCH FX, MANOS MM, MUÑOZ N, SHERMAN M, JANSEN AM, PETO J, SCHIFFMAN MH, MORENO V, KURMAN R, SHAH KV. The IBSCC Study Group. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worlwide perspective. *J. Natl. Cancer* 78:796-802. 1995.

BOSCH FX, MUÑOZ N. The viral etiology of cervical cancer. *Virus Res* 89:183-90. 2002.

BOSCH FX, DE SANJOSÉ S. Human papillomavirus in cervical cancer. *Curr Oncol Rep.*4(2):175-83. 2002.

BOSCH FX, BURCHELL AN, SCHIFFMAN M. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine* 26: 1–16. 2008.

BOSCH FX, BROKER TR, FORMAN D, MOSCICKI AB, GILLISON ML, DOORBAR J, STERN PL, STANLEY M, ARBYN M, POLJAK M, CUZICK J, CASTLE PE, SCHILLER JT, MARKOWITZ LE, FISHER WA, CANFELL K, DENNY LA, FRANCO EL, STEBEN M, KANE MA, SCHIFFMAN M, MEIJER CJ, SANKARANARAYANAN R, CASTELLSAGUÉ X, KIM JJ, BROTONS M, ALEMANY L, ALBERO G, DIAZ M, DE SANJOSÉ S. Comprehensive control of human papillomavirus infections and related diseases. *Vaccine*. 31;31(7) 1-31. 2013.

BORKOWSKI TA, LETTERIO JJ, FARR AG, UDEY MC. A role for endogenous transforming growth factor β 1 in Langerhans cell biology: the skin of transforming growth factor β 1 null mice is devoid of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* 184: 2417–22. 1996.

BORKOWSKI TA, LETTERIO JJ, MACKALL CL, SAITOH A, WANG XJ, ROOP DR, GRESS RE, UDEY MC. A role for TGF β 1 in Langerhans cell biology. Further characterization of the epidermal Langerhans cell defect in TGF β 1 null mice. *J Clin Invest* 100: 575–81. 1997.

BOUSARGHIN L., TOUZE A., SIZARET PY, COURSAGET P. Human papillomavirus types 16, 31, and 58 use different endocytosis pathways to enter cells. *J. Virol* 77, 3846–3850. 2003.

BRASILEIRO FILHO G. Bogliolo Patologia. Editora Guanabara Koogan; 7ª Edição, 2006.

BROERE F, APASOV SG, SITKOVSKY MV, VAN EDEN W. T. cell subsets and T cell-mediated immunity. In: Nijkamp FP, ParnhamMJ, editors. Principles of Immunopharmacology. 3rd Revised and Extended Ed. Basel: Springer. 15–27. 2011.

BURD EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev* 16: 1-17. 2003.

CAMARGO M, SOTO-DE LEON SC, MUNOZ M, SANCHEZ R, PEÑA-HERRERA D, PINEDA-PEÑA AC, SUSSMANN O, PAEZ C, PEREZ-PRADOS A, PATARROYO ME, PATARROYO MA. Human papillomavirus detection in women with and without human immunodeficiency virus infection in Colombia. *BMC Cancer* 18;14:451. 2014.

CAMPANER AB, NADAIS RF, GALVÃO MA, SANTOS RE, AOKI T. Evaluation of density of Langerhans cells in human cervical intraepithelial neoplasia. *Acta Obstetrica et Gynecologica* 86: 361-366. 2007.

CAORSI I AND FIGUEROA CD. Langerhans' cell density in the normal exocervical epithelium and in the cervical intraepithelial neoplasia. *Br. J. Obstet. Gynecol* 93,993-998. 1986.

CASTELLSAGUÉ X, BOSCH FX, MUÑOZ N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res* 89: 191-9. 2002.

CAUX C, VANBERVLIET B, MASSACRIER C, DEZUTTER-DAMBUYANT C, SAINT-VIS B, JACQUET C, YONEDA K, IMAMURA S, SCHMITT D, BANCHEREAU J CD34⁺ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF α . *J. Exp. Med* 184,695-706. 1996.

CAUX C, MASSACRIER C, VANBERVLIET B, DUBOIS B, DURAND I, CELLA M, LANZAVECCHIA A, BANCHEREAU J. CD34⁺ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus tumor necrosis factor α . *Functional analysis Blood* 90: 1458-70. 1997.

CAVALCANTI SM, ZARDO LG, PASSOS MR, OLIVEIRA LH. Epidemiological aspects of human papillomavirus infection and cervical cancer in Brazil. *J Infect* 40:80-7. 2000.

CECCATO JUNIOR BP, LOPES AP, NASCIMENTO LF, NOVAES LM, MELO VH. Prevalence of cervical infection by human papillomavirus and cervical intraepithelial neoplasia in HIV-positive and negative women. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 37(4):178-85. 2015.

CELLA M, SCHEIDEGGER D, PALMER-LEHMANN K, LANE P, LANZAVECCHIA A, ALBER G. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med.* 184:747-52. 1996.

CHARBONNIER AS, KOHRGRUBER N, KRIEHLER E, STINGL G, ROT A, MAURER D Macrophage inflammatory protein 3 α is involved in the constitutive trafficking of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* 190: 1755-67. 1999.

CHATTERJEE A. The next generation of HPV vaccines: nonavalent vaccine V503 on the horizon. *Expert Rev Vaccines.* Nov; 13(11): 1279-90. 2014.

CHEUNG JL, LO KW, CHEUNG TH, TANG JW, CHAN PK. Viral load, E2 gene disruption status, and lineage of human papillomavirus type 16 infection in cervical neoplasia. *J Infect Dis.* 194(12):1706-12. 2006.

CHOPIN M, ALLAN RS, BELZ GT. Transcriptional regulation of dendritic cell diversity. *Frontiers in immunology.* 26 (3), 1-10. 2012.

CLARKE, B. AND R. CHETTY. Postmodern cancer: the role of human immunodeficiency virus in uterine cervical cancer. *Mol Pathol* 55(1): 19-24. 2002.

COCCHIA D, MICHETTI F, DONATO R. Immunochemical and immuno-cytochemical localization of S-100 antigen in normal human skin. *Nature.* 294(5836):85-7. 1981.

COLEMAN N, BIRLEY HD, RENTON AM, HANNA NF, RYAITt BK, BYRNE M, TAYLOR-ROBINSON D, STANLEY MA. Immunological events in regressing genital warts. *Am J Clin Pathol.* 102:768-74. 1994.

CONESA-ZAMORA P. Immune responses against virus and tumor in cervical carcinogenesis: treatment strategies for avoiding the HPV-induced immune escape. *Gynecol Oncol.* 131(2):480-8. 2013.

CONNOR J, FERRER K, JOHN P, KANE B, GOLDBERG JM Evaluation of Langerhans cells in the cervical epithelium of women with cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol* 75:130–5.1999.

CRISH JF, BONE F, BALASUBRAMANIAN S, ZAIM TM, WAGNER T, YUN J, RORKE EA, ECKERT RL. Suprabasal expression of the human papillomavirus type 16 oncoproteins in mouse epidermis alters expression of cell cycle regulatory proteins. *Carcinogenesis* 21: 1031-7. 2000.

CROMME FV, WALBOOMERS JM, VAN OOSTVEEN JW, STUKART MJ, DE GRUIJIL TD, KUMMER JA, LEONHART AM, HELMERHORST TJ, MEIJER CJ. Lack of granzyme expression in T lymphocytes indicates poor cytotoxic T lymphocytes activation in human papillomavirus associated cervical carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* 5(5): 366-373. 1995.

CROOK T, MORGENSTERN J P, CRAWFORD L, BANKS L. Continued expression of HPV-16 E7 protein is required for maintenance of the transformed phenotype of cells co-transformed by HPV-16 plus EJ-ras. *EMBOJ* 8:513–519. 1989.

CUMBERBATCH M, GRIFFITHS CE, TUCKER SC, DEARMAN RJ, KIMBER I. Tumour necrosis factor-alpha induces Langerhans cell migration in humans. *Br J Dermatol* 141:192–200. 1999.

CUMBERBATCH M, BHUSHAN M, DEARMAN RJ, KIMBER I, GRIFFITHS CE IL-1beta-induced Langerhans' cell migration and TNF-alpha production in human skin: regulation by lactoferrin. *Clin Exp Immunol* 132:352–9. 2003.

CZERNIELEWSKI J, VAIGOT P, PRUNIERAS M. Epidermal Langerhans cells – a cycling cell population. *J Invest Dermatol* 86:630-3.1985.

D'ANDRILLI, BOVICELLI A, GIORDANO A. HPV Vaccines: State of the art. *Journal of Cellular Physiology* 601-604. 2010.

DAS S, KARIM S, DATTA RAY C, MAITI AK, GHOSH SK, CHAUDHURY K. Peripheral blood lymphocyte subpopulations in patients with cervical cancer. *Int J Gynaecol Obstet.* 98(2):143-6. 2007.

DE BOER MA, JORDANOVA ES, VAN DER HULST JM. Circulating human papillomavirus type 16 specific T-cells are associated with HLA class I expression on tumor cells, but not related to the amount of viral oncogene transcripts. *Int J Cancer* 121:2711-2715. 2007.

DEGLI-ESPOSTI MA, SMYTH MJ. Close encounters of different kinds: dendritic cells and NK cells take centre stage. *Nat Rev Immunol* 112-24. 2005.

DE GRUIJL TD, SOMBROEK CC, LOUGHEED SM, OOSTERHOFF D, BUTER J, VAN DEN EERTWEGH AJ, SCHEPER RJ, PINEDO HM. A postmigrational switch among skin-derived dendritic cells to a macrophage-like phenotype is predetermined by the intracutaneous cytokine balance. *J. Immunol* 176, 7232-7242. 2006.

DEN HAAN JMM, BEVAN MJ Antigen presentation to CD8⁺ T cells: cross-priming in infectious diseases. *Curr Opin Immunol* 13: 437-41. 2001.

DE JONG, A., M. I. VAN POELGEEST, J. M. VAN DER HULST, J. W. DRIJFHOUT, G. J. FLEUREN, C. J. MELIEF, G. KENTER, R. OFFRINGA AND S. H. VAN DER BURG. Human papillomavirus type 16-positive cervical cancer is associated with impaired CD4⁺ T-cell immunity against early antigens E2 and E6. *Cancer Res* 64(15): 5449-5455. 2004.

DENNY, L. A., S. FRANCESCHI, S. DE SANJOSE, I. HEARD, A. B. MOSCICKI PALEFSKY J. "Human papillomavirus, human immunodeficiency virus and immunosuppression." *Vaccine* 30 Suppl 5: F168-174. 2012.

DROLET, M., J. F. LAPRISE, M. C. BOILY, E. L. FRANCO BRISSON M. Potential cost-effectiveness of the nonavalent human papillomavirus (HPV) vaccine. *Int J Cancer* 134(9): 2264-2268. 2014.

De RODA HUSMAN AM, WALBOOMERS JM, VAN DEN BRULE AJ, MEIJER CJ, SNIJDERS PJ. The use of general iniciadores GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol.* 76:1057-62. 1995.

DE SAINT-VIS B, FUGIER-VIVIER I, MASSACRIER C, GAILLARD C, VANBERVLIET B, AÏT-YAHIA S, BANCHEREAU J, LIU YJ, LEBECQUE S, CAUX C. The cytokine profile expressed by human dendritic cells is dependent on cell subtype and mode of activation. *J Immunol* 160: 1666-76. 1998.

DE VILLIERS EM, FAUQUET C, BROKER TR, BERNARD HU, ZUR HAUSEN H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 324(1):17-27. 2004.

DE WITTE L, NABATOV A, PION M, FLUITSMA D, DE JONG MA, DE GRUIJL T, FIGUET V, VAN KOOYK Y, GEIJTENBEEK TB. Langerin is a natural barrier to HIV-1 transmission by Langerhans cells. *Nat Med* 13:367-371.2007.

DOORBAR J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol*. 32:7-15. 2005.

DOORBAR J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science* 110:525-541. 2006.

DOORBAR J, QUINT W, BANKS L, IGNACIO BG, STOLER M, BROKER TR. The biology and life cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*. 30:55-70. 2012.

DRIJKONINGEN M, DE WOLF-PEETERS C, DEGREEF H, DESMET V. Epidermal Langerhans cells, dermal dendritic cells, and keratinocytes in viral lesions of skin and mucous membranes: an immunohistochemical study. *Arch Dermatol Res* 280:220-227. 1988.

DROLET M, LAPRISE JF, BOILY MC, FRANCO EL, BRISSON M. Potential cost-effectiveness of the nonavalent human papillomavirus (HPV) vaccine. *Int J Cancer*. 134(9): 2264-8. 2014.

DUENSING S, LEE LY, DUENSING A, BASILE J, PIBOONNIYOM S, GONZALEZ S, CRUM CP, MUNGER K. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97(18):10002-7. 2000.

DUENSING S, DUENSING A, CRUM CP, MÜNGER K. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein-induced abnormal centrosome synthesis is an early event in the evolving malignant phenotype. *Cancer Res*. 61(6):2356-60. 2001.

EDWARDS RP, KUYKENDALL K, CROWLEY-NOWICK P, PARTRIDGE EE, SHINGLETON J, MESTECKY J. T lymphocytes infiltrating advanced grades of cervical neoplasia: CD8-positive cells are recruited to invasion. *Cancer*:76:1411-1415. 1995.

EIBEN G, SILVA D, FAUSCH S, POOLE C, NISHIMURA M, KAST WM. Cervical Cancer Vaccines: Recent Advances in HPV Research. *Viral Immunology* 16: 111-121. 2003.

EVANS EM, MAN S, EVANS AS, BORYSIEWICZ LK. Infiltration of cervical cancer tissue with human papillomavirus-specific cytotoxic T-lymphocytes. *Cancer* 57:2943-2950.1997.

FEHRMANN F, KLUMPP DJ, LAIMINS LA. Human papillomavirus type 31 E5 protein supports cell cycle progression and activates late viral functions upon epithelial differentiation. *J Virol*. 77(5):2819-31. 2003.

FERENCZY, A., F. COUTLEE, E. FRANCO AND C. HANKINS. Human papillomavirus and HIV coinfection and the risk of neoplasias of the lower genital tract: a review of recent developments. *CMAJ* 169(5): 431-434. 2003.

FLORES RJ, MENDEZ-CRUZ R. High-risk human papilloma virus infection decreases the frequency of dendritic langerhans cells in the human genital tract. Blackwell Publishing Ltda, *Immunology* 117:220-228. 2005.

FRAZER IH. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nat Rev Immunol* 4:46-54. 2004.

FUESSEL HAWS AL, HE Q, RADY PL, ZHANG L, GRADY J, HUGHES TK, STISSER K, KONIG R, TYRING SK. Nested PCR with the PGMY09/11 and GP5(+)/6(+) primer sets improves detection of HPV DNA in cervical samples. *J Virol Methods* 122:87-93. 2004.

GARCÍA-ESPINOSA B, MORO-RODRÍGUEZ E, ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ E. Genotype distribution of human papillomavirus (HPV) in histological sections of cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical carcinoma in Madrid, Spain. *BMC Cancer*. 12:533. 2012.

GENTHER SM, STERLING S, DUENSING S, MÜNGER K, SATTLER C, LAMBERT PF. Quantitative role of the human papillomavirus type 16 E5 gene during the productive stage of the viral life cycle. *J Virol*. 77(5):2832-42. 2003.

GHOSH, A. K. AND M. MOORE. Tumour-infiltrating lymphocytes in cervical carcinoma. *Eur J Cancer* 28A(11): 1910-1916. 1992.

GIANNINI, S. L., P. HUBERT, J. DOYEN, J. BONIVER AND P. DELVENNE. Influence of the mucosal epithelium microenvironment on Langerhans cells: implications for the development of squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Int J Cancer* 97(5): 654-659. 2002.

GINHOUX, F., F. TACKE, V. ANGELI, M. BOGUNOVIC, M. LOUBEAU, X.M. DAI, E.R. STANLEY, G.J. RANDOLPH, M. MERAD. Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nat. Immunol.* 7:265-273. 2006.

GRAVITT, P. E., C. L. PEYTON, T. Q. ALESSI, C. M. WHEELER, F. COUTLEE, A. HILDESHEIM, M. H. SCHIFFMAN, D. R. SCOTT AND R. J. APPLE (2000). Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol* 38(1): 357-361. 2002.

GRCE, M., K. HUSNJAK, L. MAGDIC, M. ILIJAS, M. ZLACKI, D. LEPUSIC, J. LUKAC, B. HODEK, V. GRIZELJ, A. KURJAK, Z. KUSIC AND K. PAVELIC. Detection and typing of human papillomaviruses by polymerase chain reaction in cervical scrapes of Croatian women with abnormal cytology. *Eur J Epidemiol* 13(6): 645-651. 1997.

GREER CE, PETERSON SL, KIVIAT NB, MANOS MM. PCR amplification from paraffin-embedded tissues. Effects of fixative and fixation time. *Am J Clin Pathol*. 95:117-24. 1991.

GROSS, G. E.; BARRASSO, R. Infecção por papilomavírus humano: atlas clínico de hpv. Porto Alegre: ARTMED, 1999. 432p. Instituto Nacional de Câncer.

GROSS G. HPV-vaccination against cervical carcinoma: will it really work? *Med Microbiol Immunol.* 196:121-125. 2007.

GRCE M, HUSNJAK K, MAGDIĆ L, ILIJAS M, ZLACKI M, LEPUSIĆ D, LUKAC J, HODEK B, GRIZELJ V, KURJAK A, KUSIĆ Z, PAVELIĆ K. Detection and typing of human papillomaviruses by polymerase chain reaction in cervical scrapes of croatian women with abnormal cytology. *European Journal of Epidemiology*, 13(6): 645-651. 1997.

HACHISUGA T, FUKUDA K, HAYASHI Y. Immunohistochemical demonstration of histiocytes in normal ectocervical epithelium and epithelial lesions of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 33:273-278. 1989.

HACHISUGA T, FUKUDA K, KAWARABAYASHI T. Local Immune Response in Squamous Cell Carcinoma of the Uterine Cervix. *Gynecol Obstet Invest* .52:3–8. 2001

HACHISUGA T, FUKUDA K, HAYASHI Y. Immunohistochemical demonstration of histiocytes in normal ectocervical epithelium and epithelial lesions of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 33:273-278. 1989.

HARPER DM. Currently approved prophylactic HPV vaccines. *Expert Rev Vaccines* 8:1663-1679. 2009.

HASHIMOTO K. Langerhans cell granule. An endocytic organelle. *Arch Dermatol* 104:148-60.1971.

HAWLEY-NELSON P, VOUSDEN KH, HUBBERT NL , LOWY DR , SCHILLER JT. HPV 16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J* 8:3905–3910.1989.

HAWTHORN RJ, MUDOCH JB, MACLEAN AB, MACKIE RM. Langerhans' cells and sbtypes of human papillomavirus in cervical intraepithelial neoplasia. *Bmj* 643-646.1988.

HAYATI AR; ZULKARNAEN M. An immunohistochemical study of CD1a and CD83-positive infiltrating dendritic cell density in cervical neoplasia. *Int. J. Gynecel. Pathol* 26: 83-88.2007.

HAYDAY A, THEODORIDIS E, RAMSBURG E, SHIRES J. Intraepithelial lymphocytes: exploring the Third Way in immunology. *Nat Immunol.* 2: 997-1003.2001.

HEUFLER C, KOCH F, SCHULER G. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-1 mediate the maturation of murine epidermal Langerhans cells into potent immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med* 167: 700–5. 1988.

HEUSEL JW, WESSELSCHMIDT SS, RUSSEL JH, LEY TJ. Cytotoxic lymphocytes require Granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogenic target cells. *Cell*. 76: 977-987. 1994.

HEMMI H, YOSHINO M, YAMAZAKI H, NAITO M, IYODA T, OMATSU Y, SHIMOYAMA S, LETTERIO JJ, NAKABAYASHI T, TAGAYA H, YAMANE T, OGAWA M, NISHIKAWA S, RYOKE K, INABA K, HAYASHI S, KUNISADA T. Skin antigens in the steady state are trafficked to regional lymph nodes by transforming growth factor- β 1-dependent cells. *Int Immunol* 13: 695–70.2001.

HIBMA, M. H. The immune response to papillomavirus during infection persistence and regression. *Open Virol J* 6: 241-248.2012.

HONG K, GREER CE, KETTER N, VAN NEST G, PALIARD X. Isolation and characterization of human papillomavirus type 6-specific T cells infiltrating genital warts. *J Virol* 71:6427-6432.1997.

HORVATH CA, BOULET GA, RENOUX VM, DELVENE PO, BOGERS PL. Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. *Virol J* 7: 11. 2010.

HUBERT P, VAN DEN BRULE F, GIANNINI SL, FANZEN-DETROOZ E, BONIVER J, DELVENNE P. Colonization of in vitro-formed cervical human papillomavirus-associated pre neoplastic lesions with dendritic cells. Role of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *Am J Pathol* 154:775-784. 1999.

HUGHES RG, NORVAL M, HOWIE SE. Expression of major histocompatibility class II antigens by Langerhans' cells in cervical intraepithelial neoplasia. *J Clin Pathol* 41:253-9.1988.

IARC. Working Group on the Evaluation of Cancer—Preventive Strategies. Cervix Cancer Screening. Lyon: IARC Press. *IARC Handbooks of Cancer Prevention*, Vol. 10. 2005.

INCA (Instituto Nacional do Câncer). Estimativas de incidência de câncer no Brasil, 2009. Available from URL: < <http://www.inca.gov.br/estimativas/2009>> Accessed in 2015 (Jan 31).

INCA (Instituto Nacional do Câncer). Estimativas de incidência de câncer no Brasil, 2015. Available from URL: < <http://www.inca.gov.br/estimativas/2015>> Accessed in 2015 (Mar 2).

IWAMA A, OSAWA M, HIRASAWA R, UCHIYAMA N, KANEKO S, ONODERA M, SHIBUYA K, SHIBUYA A, VINSON C, TENEN DG, NAKAUCHI H. Reciprocal roles for CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) and PU.1 transcription factors in Langerhans cell commitment. *J Exp Med* 195: 547–58.2002.

IWAMOTO M, SHINOHARA H, MIYAMOTO A, OKUZAWA M, MABUCHI H, NOHARA T, GON G, TOYODA M, TANIGAWA N. Prognostic value of tumor-infiltrating dendritic cells expressing CD83 in human breast carcinomas. *Int J Cancer*. 104: 92-99.2003.

JANEWAY C.A., TRAVERS P., WALPORT M., SHLOMCHIK M. IMMUNOBIOLOGY, 6th ed., Garland Publishing, Edinburgh, UK. (2005).

JASTREBOFF AM, CYMET T. Role of the human papilloma virus in the development of cervical intraepithelial neoplasia and malignancy. *Postgrad Med J*. 78(918):225-8.2002.

JENNE DE, TSCHOPP J. Granzymes, a family of serine proteases released from granules of cytolytic T lymphocytes upon T cell receptor stimulation. *Immunol Rev*. 103:53-1.1988.

JO H, KIM JW. Implications of HPV infection in uterine cervical cancer. *Cancer Therapy*. 3:419-434.2005.

KADAJA, M., ISOK-PAAS H., LAOS T., USTAV E., USTAV M. Mechanism of genomic instability in cells infected with the high-risk human papillomaviruses. *PLoS Pathogens*. 5: 1-16. 2009.

KADISH, A. S., P. TIMMINS, Y. WANG, G. Y. HO, R. D. BURK, J. KETZ, W. HE, S. L. ROMNEY, A. JOHNSON, R. ANGELETTI, M. ABADI AND C. ALBERT EINSTEIN Cervix Dysplasia Clinical Regression of cervical intraepithelial neoplasia and loss of human papillomavirus (HPV) infection is associated with cell-mediated immune responses to an HPV type 16 E7 peptide. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11(5): 483-488.2002.

KAMATH AT, HENRI S, BATTYE F, TOUGH DF, SHORTMAN K. Development kinetics and life-span of dendritic cells in mouse lymphoid organs. *Blood* 100:1734-41.2002.

KASAP B, YETMALAR H, KEKLIK A, YILDIZ A, CUKUROVA K, SOYLU F. Prevalence and risk factors for human papillomavirus DNA in cervical cytology. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 159, (1):168-171, 2011.

KASHIHARA M, UEDA M, HORIGUCHI Y, FURUKAWA F, HANAOKA M, IMAMURA S. A monoclonal antibody specifically reactive to human Langerhans cells. *J Invest Dermatol*. 87:602-7. 1986.

KENNEDY MA. A brief review of the basics of immunology: the innate and adaptive response. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 40:369-79. 2010.

KIM KH, GREENFIELD WW, CANNON MJ, COLEMAN HN, SPENCER HJ, NAKAGAWA M. CD4+ T-cell response against human papillomavirus type 16 E6 protein

is associated with a favorable clinical trend. *Cancer Immunol Immunother* 61(1):63-70.2012.

KOBAYASHI A, WEINBERG V, DARRAGH T, SMITH-MCCUNE K. Evolving immunosuppressive microenvironment during human cervical carcinogenesis. *Mucosal Immunol*.1:412–420.2008.

KONDO MC, RIBALTA JC, DA SILVA ID, ALVES MT, DE AZEVEDO FOCCHI GR, MARTINS NV, FOCCHI J. Granzyme B as a prognostic marker of cervical intraepithelial neoplasia. *Eur J Gynaecol Oncol* 26(1): 87-89. 2005.

LARREGINA AT, FALO LD, JR. Dendritic cells in the context of skin immunity. *Dendritic Cell Biology and Clinical Applications* 301-314. 2001.

LEE MG, BORKOWSKI TA, UDEY MC. Regulation of expression of B7 by murine Langerhans cells: a direct relationship between B7 mRNA levels and the level of surface expression of B7 by Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 101: 883–6.1993.

LEE, B.; FOLLEN, M.; SHEN, D. Depressed type I cytokine synthesis by superantigen-activated CD4+ T cells of women with Human Papillomavirus-related high-grade squamous intraepithelial lesions. *Clin. Diagn. Lab. Immunol* 11:239-244.2004.

LETHINEN M, PAWLITA M, DILLNER MJ. Evaluation of antibody response to human papillomavirus early proteins in women in whom cervical cancer developed 1-20 years later. *Am J Obstet Gynecol* 188:49-55.2003.

LEVI, J. E., S. FERNANDES, A. F. TATENO, E. MOTTA, L. P. LIMA, J. ELUF-NETO AND C. S. PANNUTI. Presence of multiple human papillomavirus types in cervical samples from HIV-infected women. *Gynecol Oncol* 92(1): 225-231.2004.

LEVI G; FELDMAN J; HOLMAN S. Relationship between HIV viral load and Langerhans cells of the cervical epithelium. *J. Obstet. Gynaecol* 31:178-184.2005.

LIN K, DOOLAN K, HUNG C-F, WU T-C. Perspectives for Preventi PV Vaccines. *J Formos Med Assoc* 109:4-24. 2010.

LORD SJ, RAJOTTE RV, KORBUTT GS, BLEACKLEY RC. Granzyme B: a natural born killer. *Immunol Rev* 193(1): 31-38. 2003.

MACIAG PC, VILLA LL. Genetic susceptibility to HPV infection and cervical cancer. *Braz J Med Biol Res* 32:915-22.1999.

MACHADO, F. A., J. P. JANSSENS, M. A. MICHELIN AND E. F. MURTA. Immune response and immunotherapy in intraepithelial and invasive lesions of the uterine cervix. *Clin Exp Obstet Gynecol* 39(1): 27-31.2012.

MALUF PJ, MICHELIN MA, ETCHERBEHERE RM, ADAD SJ, MURTA EFC. T lymphocytes (CD3) may participate in the recurrence of cervical intraepithelial neoplasia grade III. *Arch Gynecol Obstet* 2008; 278:525-530.

MANICKAM A, SIVANANDHAM M, TOURKOVA IL. Immunological role of dendritic cells in cervical cancer. *Adv Exp Med Biol* 601:155-62.2007.

MASUMOTO N, FUJII T, ISHIKAWA M, SAITO M, IWATA T, FUKUCHI T, SUSUMU N, MUKAI M, KUBUSHIRO K, TSUKAZAKI K, NOZAWA S. P16 overexpression and human papillomavirus infection in small cell carcinoma of the uterine cervix. *Hum Pathol*. 34(8):778-83.2003.

MCARDLE, J.P., MULLER, H.K. Quantitative assessment of Langerhans' cells in human cervical intraepithelial neoplasia and wart virus infection. *Am J Obstet Gynecol* 154(3):509-15.1986.

MEDZHITOV R, JANEWAY JR C. Innate immunity. *N Engl J Med* 343:338-44.2000.

MELNIKOW, J., J. NUOVO, A. R. WILLAN, B. K. CHAN AND L. P. HOWELL. Natural history of cervical squamous intraepithelial lesions: a meta-analysis. *Obstet Gynecol* 92(4 Pt 2): 727-735.1998.

MERAD M, MANZ MG, KARSUNKY H, WAGERS A, PETERS W, CHARO I, WEISSMAN IL, CYSTER JG, ENGLEMAN EG. Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nat Immunol* 3: 1135-41.2002.

MERAD M, GINHOUX F, COLLIN M. Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nature reviews Immunology*. 8: 935-947.2008.

MOLIJIN A, KLETER B, QUINT W, VAN DOORN LJ. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *Journal of Clinical Virology*. 32: 43-51.2005.

MONIER-BENOIT S, MAUNY F, RIETH D. Immunohistochemical analysis of CD4+ and CD8+ T-cells subsets in high risk human papillomavirus-associated premalignant and malignant lesions of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 102: 22-31. 2006.

MORELLI AE, RONCHETTI RD, SECCHI AD, CUFRE MA, PAREDES A, FAINBOIM L. Assessment by planimetry of Langerhans' cell density in penile epithelium with human papillomavirus infection: changes observed after topical treatment. *J Urol* 147:1268-73.1992.

MORELLI AE, SANANES C, DI PAOLA G, PAREDES A, FAINBOIM L. Relationship between types of human papillomavirus and Langerhans' cells in cervical condyloma and intraepithelial neoplasia. *Am J Clin Pathol* 99:200-6.1993.

MORRIS HH, GATTER KC, SYKES G, CASEMORE V, MASON DY. Langerhans' cells in human cervical epithelium: effects of wart virus infection and intraepithelial neoplasia. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 90:412-420. 1983.

MOSCICKI, AB, M SCHIFFMAN, S KJAER, VILLA LL. Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. *Vaccine* 24 Suppl 3: S3/42-51.2006.

MOSCICKI AB, SHIBOSKI S, HILLS NK, POWELL KJ, JAY N, HANSON EN, et al. Regression of low-grade squamous intra-epithelial lesions in young women. *Lancet.* Nov 6-12; 364(9446):1678-83. 2004.

MOTA F, RAYMENT N, CHONG S, SINGER A, CHAIN B. The antigen-presenting environment in normal and human papillomavirus (HPV)-related premalignant cervical epithelium. *Clin Exp Immunol.* 116(1):33-40. 1999.

MOTOYAMA S, LADINES-LLAVE CA, LUIS VILLANUEVA S, MARUO T. The role of human papilloma virus in the molecular biology of cervical carcinogenesis. *Kobe J Med Sci.* 50(1-2):9- 19. 2004.

MÜNGER K. The role of human papillomaviruses in human cancers. *Front Biosci.* 7:d641-9. 2002

NAKAGAWA, M., D. P. STITES, S. PATEL, S. FARHAT, M. SCOTT, N. K. HILLS, J. M. PALEFSKY AND A. B. MOSCICKI. Persistence of human papillomavirus type 16 infection is associated with lack of cytotoxic T lymphocyte response to the E6 antigens. *J Infect Dis* 182(2): 595-598.2000.

NAKAGAWA M1, GUPTA SK, COLEMAN HN, SELLERS MA, BANKEN JA, GREENFIELD WW. A favorable clinical trend is associated with CD8 T-cell immune responses to the human papillomavirus type 16 e6 antigens in women being studied for abnormal pap smear results. *Low Genit Tract Dis* 14(2):124-9.2010.

NAPPI, L., C. CARRIERO, S. BETTOCCHI, J. HERRERO, A. VIMERCATI AND G. PUTIGNANO. Cervical squamous intraepithelial lesions of low-grade in HIV-infected women: recurrence, persistence, and progression, in treated and untreated women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 121(2): 226-232.2005.

OHNMACHT C., PULLNER A., KING S. B., DREXLER I., MEIER S., BROCKER T., VOEHRINGER D. Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity. *J. Exp. Med.* 206, 549–559.2009.

ORIGONI M, PARMA M, DELL'ANTONIO G, GELARDI C, STEFANI C, SALVATORE S, CANDIANI M. Prognostic significance of immunohistochemical phenotypes in patients treated for high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Biomed Res Int* 831907.2013.

PALEFSKY JM, MINKOFF H, KALISH LA, LEVINE A, SACKS HS, GARCIA P, YOUNG M, MELNICK S, MIOTTI P, BURK R. Cervicovaginal human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus-1 (HIV)-positive and high-risk HIV-negative women. *J. Natl. Cancer Inst* 91:226–236.1999.

PALEFSKY, J. M. Cervical human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia in women positive for human immunodeficiency virus in the era of highly active antiretroviral therapy. *Curr Opin Oncol* 15(5): 382-388.2003.

PATEL S, CHIPLUNKAR S. Host immune responses to cervical cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol* 21(1):54-9.2009.

PARRY D, BATES S, MANN DJ, PETERS G. Lack of cyclin D-Cdk complexes in Rb-negative cells correlates with high levels of p16INK4/MTS1 tumour suppressor gene product. *Embo J.* 14(3):503-11.1995.

PASSMORE, J. A., M. MILNER, L. DENNY, C. SAMPSON, D. J. MARAIS, B. ALLAN, P. P. GUMBI, HITZEROTH, II, E. P. RYBICKI AND A. L. WILLIAMSON. Comparison of cervical and blood T-cell responses to human papillomavirus-16 in women with human papillomavirus-associated cervical intraepithelial neoplasia. *Immunology* 119(4): 507-514.2006.

PEREYRA E. A. G, GUERRA D. M. M., VILLA, L. L. Papilomaviruses humanas. In: Tratado de Infectologia. Editora Atheneu, São Paulo, 457-463, 1996.

PETO J, GILHAM C, DEACON J, TAYLOR C, EVANS C, BINNS W, HAYWOOD M, ELANKO N, COLEMAN D, YULE R, DESAI M. Cervical HPV infection and neoplasia in a large population-based prospective study: the Manchester cohort. *Br J Cancer* 91:942-53. 2004.

PETRY KU, SCHEFFEL D, BODE U, GABRYSIK T, KOCHER H, KUPSEH F. Cellular immunodeficiency enhances the progression of human papillomavirus-associated cervical lesion. *Int J Cancer.* 57:836-840.1994.

PIERSMA SJ1, JORDANOVA ES, VAN POELGEEST MI, KWAPPENBERG KM, VAN DER HULST JM, DRIJFHOUT JW, MELIEF CJ, KENTER GG, FLEUREN GJ, OFFRINGA R, VAN DER BURG SH. High number of intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes is associated with the absence of lymph node metastases in patients with large early-stage cervical cancer. *Cancer Research.*67(1):354-361.2007.

PIERRE P, TURLEY SJ, GATTI E, HULL M, MELTZER J, MIRZA A, INABA K, STEINMAN RM, MELLMAN I. Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. *Nature* 388: 787-92. 1997.

POPE M, BETJES MG, ROMANI N, HIRMAND H, CAMERON PU, HOFFMAN L, GEZELTER S, SCHULER G, STEINMAN RM. Conjugates of dendritic cells and memory T lymphocytes from skin facilitate productive infection with HIV-1. *Cell* 78:389-398. 1994.

POPPE, W. A., M. DRIJKONINGEN, P. S. IDE, J. M. LAUWERYNS AND F. A. VAN ASSCHE. Lymphocytes and dendritic cells in the normal uterine cervix. An immunohistochemical study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 81(2): 277-282.1998.

RANDOLPH GJ, OCHANDO J, PARTIDA-SANCHEZ S. Migration of dendritic cell subsets and their precursors. *Annu. Rev.Immunol.* 26, 293-316.2008.

REIS E SOUSA C, STAHL PD, AUSTYN JM. Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro. *J Exp Med* 178: 509–19. 1993.

RIETHMULLER D, JACQUARD AC, LACAU ST GUILY J, AUBIN F, CARCOPINO X, PRADAT P, DAHLAB A, PRETET JL. Potential impact of a nonavalent HPV vaccine on the occurrence of HPV-related diseases in France. *BMC Public Health.* May; 15:453. 2015.

ROAKE JA, RAO AS, MORRIS PJ, LARSEN CP, HANKINS DF, AUSTYN JM. Dendritic cell loss from nonlymphoid tissues after systemic administration of lipopolysaccharide, tumor necrosis factor, and interleukin 1. *J Exp Med* 181:2237–47.1995.

ROMANI N, SCHULER G, FRITSCH PO. The ontogeny of Ia-positive and Thy-1 positive leukocytes of murine epidermis. *J Invest Dermatol* 86: 129–33. 1986.

ROMANI N, LENZ A, GLASSEL H, STÖSSEL H, STANZL U, MAJDIC O, FRITSCH P, SCHULER G. Cultured human Langerhans cells resemble lymphoid dendritic cells in phenotype and function. *J Invest Dermatol* 93: 600–9. 1989.

ROMANI N, KOIDE S, CROWLEY M, WITMER-PACK M, LIVINGSTONE AM, FATHMAN CG, INABA K, STEINMAN RM. Presentation of exogenous protein antigens by dendritic cells to T cell clones: intact protein is presented best by immature epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* 169: 1169–78. 1989.

ROMANI N, HOLZMANN S, TRIPP CH, KOCH F, STOITZNER P. Langerhans cells-dendritic cell of epidermis. *APMIS* 111:725-40.2003.

ROMANI N, BRUNNER PM, STINGL G. Changing views of the role of Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 132:872-81.2012.

RONCALLI M, SIDERI M, GIE P, SERVIDA E. Immunophenotypic analysis of the transformation zone of human cervix. *Lab Invest.*58(2):141 – 9.1988.

SAIKI RK, SCHARF S, FALOONA F, MULLS KB, HORN GT, ERLICH HA, ARNHEIN N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230:1350–1354.1985.

SAKAGUCHI M, FUJII Y, HIRABAYASHI H, YOON HE, KOMOTO Y, OUE T, KUSAFUKA T, OKADA A, MATSUDA H. Inversely correlated expression of p16 and Rb protein in non-small cell lung cancers: an immunohistochemical study. *Int J Cancer.* 65(4):442-5.1996.

SAMAMA B, LIPSKER D, BOEHM N. p16 expression in relation to human papillomavirus in anogenital lesions. *Hum Pathol.* 37(5):513-9.2006.

SANGUINETTI CJ, DIAS NETO E, SIMPSON AJ. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques.* 17:914-21.1994.

SANKARANARAYANAN R, NENE BM, DINSHAW K, RAJKUMAR R, SHASTRI S, WESLEY R, BASU P, SHARMA R, THARA S, BUDUKH A, PARKIN DM. Early detection of cervical cancer with visual inspection methods: a summary of completed and on-going studies in India. *Salud Publica Mex* 45 : 399-407.2003.

SANTIN, A. D., A. RAVAGGI, S. BELLONE, S. PECORELLI, M. CANNON, G. P. PARHAM AND P. L. HERMONAT. Tumor-infiltrating lymphocytes contain higher numbers of type 1 cytokine expressors and DR+ T cells compared with lymphocytes from tumor draining lymph nodes and peripheral blood in patients with cancer of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 81(3): 424-432.2001.

SANTEGOETS SJM, GIBBS S. Transcriptional profiling of human skin-resident Langerhans cells and CD1a dermal dendritic cells: differential activation states suggest distinct functions. *Journal of Leukocyte Biology* 84: 143-150. 2008.

SASAGAWA, T., H. TAKAGI AND S. MAKINODA. Immune responses against human papillomavirus (HPV) infection and evasion of host defense in cervical cancer. *J Infect Chemother* 18(6): 807-815. 2012.

SCHILLER JT, MULLER M. Next generation of prophylactic human papillomavirus vaccines. *Lancet Oncol* 16(5): 217-225. 2015.

SCHUURHUIS DH, FU N, OSSENDORP F, MELIEF CJ. Ins and outs of dendritic cells. *Int Arch Allergy Immunol* 140(1):53-72.2006.

SCHULER G, STEINMAN RM. Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *J Exp Med* 161: 526-46. 1985.

SCOTT M, NAKAGAWA M, MOSCIKI AB. Cell-mediated immune response to human papillomavirus infection. *Clin. Diagn. Lab. Immunol* 8:209-220.2001.

SELLORS JW, SANKARANARAYANAN R. Colposcopy and Treatment of Cervical Intraepithelial Neoplasia: A Beginners' Manual *OPAS*. 2004.

SERESINI, S., M. ORIGONI, F. LILLO, L. CAPUTO, A. M. PAGANONI, S. VANTINI, R. LONGHI, G. TACCAGNI, A. FERRARI, C. DOGLIONI, P. SECCHI AND M. P. PROTTI. IFN-gamma produced by human papilloma virus-18 E6-specific CD4+ T cells predicts the clinical outcome after surgery in patients with high-grade cervical lesions. *J Immunol* 179(10): 7176-7183.2007.

SHALE, M., C. SCHIERING AND F. POWRIE. CD4(+) T-cell subsets in intestinal inflammation. *Immunol Rev* 252(1): 164-182.2013.

SHEU, B. C., R. H. LIN, H. N. HO AND S. C. HUANG. Down-regulation of CD25 expression on the surface of activated tumor-infiltrating lymphocytes in human cervical carcinoma. *Hum Immunol* 56(1-2): 39-48.1997.

SHIMIZU H, BURNS J C. Extraction of Nucleic Acids: Sample Preparation from Paraffin-Embedded Tissues. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J. PCR Estrategies. San Diego, CA, Academic Press, Inc., 1995, p 32-38.

SILVA AMTC, AMARAL MVT, CRUZ AD. HPV e Câncer: o papel do papiloma vírus humano na carcinogênese. *Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento* 29: 48-54.2002.

SOLBACH W, SABINE B, ROLLINGHOFF M, WAGNER H. Interactions of human T cell subsets during the induction of cytotoxic T lymphocytes: the role of interleukins. *Clin Exp Immunol*. 49:167-75.1982.

SOTLAR, K., D. DIEMER, A. DETHLEFFS, Y. HACK, A. STUBNER, N. VOLLMER, S. MENTON, M. MENTON, K. DIETZ, D. WALLWIENER, R. KANDOLF AND B. BULTMANN. Detection and typing of human papillomavirus by e6 nested multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 42(7): 3176-3184.2004.

SOUSA CR, SHER A, KAYE P. The role of dendritic cells in the induction and regulation of immunity to microbial infection. *Imperial Cancer Research* 11:392-399.1999.

SPINILLO A, TENTI P, ZAPPATORE R, SETA F, SILINI E, GUASCHINO S. Langerhans Cell Counts and Cervical Intraepithelial Neoplasia in Women with immunodeficiency virus infection. *Gynecologic oncology* 48: 210-213.1993.

SPIVAK, M., V. P. LAKATOSH, L. M. LAZARENKO, L. M. LYANENKO, M. V. AZARSKOVA, O. M. MIKHAILENKO, L. TKACIKOVA AND A. M. BORODA. Interrelation of lymphocyte subpopulations in peripheral blood under cervical papillomavirus infection. *Folia Microbiol (Praha)* 44(6): 721-725.1999.

STANLEY MA. Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus. *Clin Microbiol Rev* 25(2): 215-222. 2012.

STEINMAN RM, WITMER MD. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 5132–5136.1978.

STEINMAN R. Dendritic cells: versatile controllers of the immune system. *Nature Medicine* 13:1155-1159. 2007.

STOSSEL H, KOCH F, KAMPGEN E, STOGER P, LENZ A, HEUFLER C, ROMANI N, SHULER G. Disappearance of certain acidic organelles (endosomes and Langerhans cell granules) accompanies loss of antigen processing capacity upon culture of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* 172:1471-82.1990.

STRICKLER HD, BURK RD, FAZZARI M, ANASTOS K, MINKOFF H, MASSAD LS, HALL C, BACON M, LEVINE AM, WATTS DH, SILVERBERG MJ, XUE X, SCHLECHT NF, MELNICK S, PALEFSKY JM. Natural history and possible reactivation of human papillomavirus in human immunodeficiency virus-positive women. *J Natl Cancer Inst* 14:577–586.2005.

STUBENRAUCH F, LAIMINS L.A. Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Semin Cancer Biol* 9: 379-86.1999.

SUGAYA M, LORÉ K, KOUP RA, DOUEK DC, BLAUVELT A. HIV- infected Langerhans cells preferentially transmit virus to proliferating autologous CD4+ memory T cells located within Langerhans cell-T cell clusters. *J Immunol* 172:2219-24.2004.

TABRIZI SN, FAIRLEY CK, CHEN S, BORG AJ, BAGHURST P, QUINN MA, GARLAND SM. Epidemiological characteristics of women with high grade CIN who do and do not have human papillomavirus. *Br J Obstet Gynaecol*.106(3) 252-7.1999.

TAKAHARA K, OMATSU Y, YASHIMA Y, MAEDA Y, TANAKA S, IYODA T, CLUSEN B, MATSUBARA K, LETTERIO J, STEINMAN RM, MATSUDA Y, INABA K. Identification and expression of mouse Langerin (CD207) in dendritic cells. *Int Immunol* 14: 433–44. 2002

TAKAHASHI S, HASHIMOTO K. Derivation of Langerhans cell granules from cytomembrane. *J Invest Dermatol* 84:469-71.1985.

TAKEHARA, K Local immune responses in uterine cervical carcinogenesis. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi*.48:1063-70. 1996.

TANG A, AMAGAI M, GRANGER LG, STANLEY JR, UDEY MC. Adhesion of epidermal Langerhans cells to keratinocytes mediated by E-cadherin. *Nature* 361,82-85.1993.

TAY SK, JENKINS D, MADDOX P, CAMPION M, SINGER A. Subpopulations of Langerhans' cells in cervical neoplasia. *Br J Obstet Gynaecol* 94:10-5.1987a.

TAY SK, JENKINS D, MADDOX P, SINGER A. Lymphocyte phenotypes in cervical intraepithelial neoplasia and human papillomavirus infection. *Br J Obstet Gynaecol*. 94(1): 16-21.1987b.

TEIXEIRA NC, ARAUJO AC, CORREA CM, LODI CT, LIMA MI, CARVALHO NDE O, CASTILLO DM, MELO VH. Prevalence and risk factors for cervical intraepithelial neoplasia among HIV-infected women. *Braz J Infect Dis*. 2012;14:164–169.2012.

TINDLE, R.W. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Nat Rev Cancer* 2:59-65.2002.

THOMAS Y, SOSMAN J, ROGOZINSKI L, IRIGOYEN O, KUNG PC, GOLDSTEIN G, CHESS L. Functional analyses of human T cell subsets by monoclonal antibodies.III. Regulation of helper factor production by T cell subsets. *J Immunol*. 126:1948-51.1981.

TRIMBLE, C. L., R. A. CLARK, C. THOBURN, N. C. HANSON, J. TASSELLO, D. FROSINA, F. KOS, J. TEAGUE, Y. JIANG, N. C. BARAT AND A. A. JUNGBLUTH. Human papillomavirus 16-associated cervical intraepithelial neoplasia in humans excludes CD8 T cells from dysplastic epithelium. *J Immunol* 185(11): 7107-7114.2010.

TYRING SK. Human papillomavirus infections: epidemiology,pathogenesis,and host immune response. *Journal Am Academic Dermatology. J Am Acad Dermatol* 43: S18-26. 2000.

UCHIMURA NS, RIBALTA JC, FOCCI J, SIMOES MJ, UCHIMURA TT, SILVA ES. Evaluation of Langerhans' cells in human papillomavirus-associated squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix. *Clin Exp Obstet Gynaecol* 31:260-2. 2004.

VALLADEAU J, DUVERT-FRANCES V, PIN J, DEZUTTER-DAMBUYANT C, VICENT C, MASSACRIER C, VINCENT J, YONEDA , BANCHEREAU J, CAUX C, DAVOUST J, SAELAND S. The monoclonal antibody DCGM4 recognizes Langerin, a protein specific of Langerhans cells, and is rapidly internalized from the cell surface. *Eur. J. Immunol.* 29:2695-2704. 1999.

VALLADEAU J, RAVEL O, DEZUTTER-DAMBUYANT C, MOORE K, KLEIJMEER M, LIU Y, DUVERT-FRANCES V, VINCENT C, SCHMITT D, DAVOUST J, CAUX C, LEBECQUE S, SAELAND S. Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity* 12: 71–81.2000.

VALLADEAU J E SAELAND S. Cutaneous dendritic cells. *Seminars in Immunology* 17: 273-283. 2005.

VAN DER VLIST M, DE WITTE L, DE VRIES RD, LITJENS M, DE JONG MA, FLUITSMA D, DE SWART RL, GEIJTENBEEK TB. Human Langerhans cells capture measles virus through Langerin and present viral antigens to CD4(+) T cells but are incapable of cross-presentation. *Eur J Immunol* 41:2619-2631.2011.

VÄYRYNEN M, SYRJÄNEN K, MÄNTYJÄRVI R, CASTRÉN O, SAARIKOSKI S. Langerhans cells in human papillomavirus (HPV) lesions of the uterine cervix identified by the monoclonal antibody OKT-6. *Int J Gynaecol Obstet* 22:375-83.1984.

VIAC J, GUÉRIN-REVERCHON I, CHARDONNET Y, BRÉMOND A. Langerhans cells and epithelial cell modifications in cervical intraepithelial neoplasia: correlation with human papillomavirus infection. *Immunobiology*180:328-38.1990.

VILLA LL. Human papillomaviruses and cervical cancer. *Adv Cancer Res* 71:321-41.1997.

WANG B, AMERIO P, SAUDER DN. Role of cytokines in epidermal Langerhans cell migration. *J Leukoc Biol* 66(1):33-9.1999.

WITMER-PACK MD, OLIVIER W, VALINSKY J, SCHULER G, STEINMAN RM. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor is essential for the viability and function of cultured murine epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* 166: 1484–98. 1987.

WOO YL, STERLING J, I DAMAY I, COLEMAN N, CRAWFORDR, VAN DER BURG SH, STANLEY M. Characterising the local immune responses in cervical intraepithelial neoplasia: a cross-sectional and longitudinal analysis. *BJOG*. 115(13):1616-21.2008.

WRIGHT DK, MANOS MM. Sample Preparation from Paraffin-Embedded Tissues. In: INNIS et al. (eds.). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. San Diego, CA, Academic Press, Inc. 153-158.1990.

XIE X. Assay of S-100+ Langerhans cells in cervical carcinoma. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 12:406-9.1990.

YAMAGUCHI A, HASHIMOTO N, TSUTAE W, SEINO K, EBINA Y, TOKINO T, SATO N, KIKUCHI K. Detection of human papillomavirus DNA by PCR/microfluorometry for screening of cervical cancer. *Clin Chim Acta*. 318(1-2):41-9.2002.

ZHANG SY, JOUANGUY E, SANCHO-SHIMIZU V. Human Toll-like receptor-dependent induction of interferons in protective immunity to viruses. *Immunol Rev*; 220:225–36.2007.

ZUMBACH K, KISSELJOV F, SACHAROVA O, SHAICHAEV G, SEMJONOVA L, PAVLOVA L, PAWLITA M. Antibodies against oncoproteins E6 and E7 of human papillomavirus types 16 and 18 in cervical-carcinoma patients from Russia. *Int J Cancer* 85: 313-8.2000.

ZUR HAUSEN H. Papillomaviruses Causing Cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst*. 92(9):690-8. 2000.



ZUR HAUSEN H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2:342-50.2002.

ZUR HAUSEN H. Papillomaviruses in Human Cancer. *Proc Assoc Am Physicians*. 111 (6): 581-587. 2003.

ZUR HAUSEN H. Papillomaviruses in the causation of human cancers — a brief historical account. *Virology*. 20; 384(2):260-5.2009

9. SEÇÃO DE ANEXOS

Anexo 1- Cartas Enviadas ao Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG.

	<p>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS Fone: (031)499-2774/ Fax:499-2810 Instituto de Ciências Biológicas - Caixa Postal 486 Cep 31270-901 - Belo Horizonte - Minas Gerais e-mail: pg-mor@mono.icb.ufmg.br</p>	
---	--	---

Belo Horizonte, 05 de Agosto de 2009.

À Profª Maria Teresa Marques Amaral

Coordenadora do COEP – Comitê de Ética em Pesquisa – UFMG

Ao Prof. Antônio Lúcio Teixeira Júnior

Sub-coordenador do COEP – Comitê de Ética em Pesquisa - UFMG

Prezados Professores,

Venho através dessa, informar que faço parte da Equipe Executora do Projeto de Pesquisa intitulado “AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE LOCAL À INFECÇÃO PELO HPV EM LESÕES ESCAMOSAS INTRA-EPITELIAIS E INVASORAS DO COLO UTERINO”, a ser desenvolvido sob a Coordenação da Profª Annamaria Ravara Vago, do Laboratório de Patogênese Molecular, do Departamento de Morfologia, ICB – UFMG.

Dessa forma, emito ANUÊNCIA para que o referido Projeto utilize amostras de tecidos incluídas em parafina (blocos de parafina), provenientes de biópsias ou de Cirurgia de Alta Frequência (CAF), que foram enviadas ao Laboratório de Anatomia Patológica Tafuri, sob minha Coordenação para realização de Exame Histopatológico de rotina. Após a realização do Exame Histopatológico, tais amostras se encontram sob a responsabilidade e guarda do referido Laboratório, que será responsável pela seleção e empréstimo provisório dos blocos para realização da referida pesquisa. Informo que o empréstimo das amostras de tecidos é concedido mediante o preenchimento do Termo de Responsabilidade em Anexo.

Respeitosamente,

Dr. Alexandre Tafuri

Laboratório de Anatomia Patológica Tafuri

Rua São Paulo, 893 - CJ, 1009,

Belo Horizonte – MG.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Caixa Postal 486 CEP 31270-901 - Belo Horizonte – Minas
Gerais
e-mail: pg-mor@mono.icb.ufmg.br



Belo Horizonte, 25 de Novembro de 2009.

À Prof^a Maria Teresa Marques Amaral

Coordenadora do COEP – Comitê de Ética em Pesquisa – UFMG

Ao Prof. Antônio Lúcio Teixeira Júnior

Sub - coordenador do COEP – Comitê de Ética em Pesquisa - UFMG

Prezados Professores,

Vimos apresentar ao COEP – Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG, o Projeto de Pesquisa intitulado “AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE LOCAL À INFECÇÃO PELO HPV EM LESÕES ESCAMOSAS INTRA-EPITELIAIS E INVASORAS DO COLO UTERINO”, a ser desenvolvido a ser desenvolvido sob a Coordenação da Prof^a Annamaria Ravara Vago no Departamento de Morfologia, ICB, UFMG. Constitui o objetivo central do presente Projeto, avaliar em Lesões Escamosas Intra-epiteliais e Invasoras do Colo uterino a Resposta Imune Local à infecção pelo HPV, por meio da contagem de Células de Langerhans nessas lesões, em comparação à presença de células infectadas pelo Papilomavírus Humano.

Para o desenvolvimento do presente Projeto serão analisadas biópsias incluídas em parafina obtidas durante exame histopatológico de rotina, de pacientes atendidas pela Unidade de Referência Secundária Sagrada Família da Prefeitura de Belo Horizonte. É importante ressaltar, que tal exame corresponde a procedimento realizado na rotina do atendimento, não sendo, portanto necessário realizar qualquer exame adicional para o desenvolvimento da presente Pesquisa. Destaca-se ainda que tais amostras encontram-se sob a guarda do Dr. Alexandre Tafuri, do Laboratório de Patologia Tafuri, que corresponde a um dos Laboratórios que atende ao Serviço acima citado para realização do exame histopatológico.

Na ocasião gostaríamos de informar-lhes que o presente Projeto foi aprovado pela Câmara do Departamento de Morfologia, ICB, UFMG em reunião realizada no dia 03/08/2008. Além disso, o presente Projeto de Pesquisa já foi apreciado pela Coordenação da Atenção à Saúde da Mulher da Secretaria Municipal de Saúde, da Prefeitura de Belo Horizonte, recebendo aprovação, anuência e autorização para sua execução.

Colocando-nos à disposição para os esclarecimentos necessários,
Subscrevemo-nos, respeitosamente,

Prof. Dra. Annamaria Ravara Vago,
Departamento de Morfologia,
Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

Dr. Alexandre Tafuri
Laboratório de Patologia Tafuri,

ANEXO 2- CONDIÇÕES DA PCR E PROGRAMAS DE AMPLIFICAÇÃO

I- CONDIÇÕES DO MIX DA PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DO GENE DA B-GLOBINA HUMANO

REAGENTES	[] TOTAL	[] POR TUBO	VOLUME POR TUBO
Iniciador PC03	16 pm/μl	5 pm	0,31 μl
Iniciador PC04	10 pm/μl	5 pm	0,5 μl
dNTP's (Ludwig)	2,5 mM	200 μM	0,8 μl
Tampão 1B PHT	10x	1x	1,0 μl
DNA Polimerase			
Taq (Phoneutria)	5 UI/μl	1UI	0,2 μl
H ₂ O	-	-	6,19 μl

Volume final de 10 microlitros: 9 μl de Mix e 1 μl de DNA da amostra.

A- Programa de Amplificação do gene de β-globina humano

Passo	Temperatura	Tempo
1	95 °C	4 minutos
2	55 °C	1 minuto
3	72 °C	2 minutos
4	95 °C	1 minuto
5	29 vezes ao passo 2	
6	55 °C	1 minuto
7	72 °C	10 minutos
8	4 °C	infinito
9	Fim	

II- CONDIÇÕES DA PCR PARA A DETECÇÃO DA PRESENÇA DO DNA VIRAL

A- Componentes do MIX de PCR para amplificação do fragmento viral de 450pb do gene L1

REAGENTES	[] TOTAL	[] POR TUBO	VOLUME POR TUBO
MY 09 (Alpha DNA)	10pm/ μ L	5pm	0,5 μ L
MY 11 (Alpha DNA)	10pm/ μ L	5pm	0,5 μ L
dNTP's (Invitrogen)	2,5mM	200 μ M	0,8 μ L
Tampão 1B (PHT, Phoneutria)	10X	1X	1,0 μ L
<i>Taq</i> DNA polimerase (PHT, Phoneutria)	5UI/ μ L	1UI	0,2 μ L
H2O (Milli-Q)	-	-	5,6 μ L
Mg (PHT, Phoneutria)	25mM	1,0 mM	0,4 μ L

Volume final de 10 microlitros : 9 μ L de Mix e 1 μ L de DNA da amostra.

B- Programa de Amplificação do fragmento de DNA viral de 450pb

Passo	Temperatura	Tempo
1	95°C	4 minutos
2	55°C	1 minuto
3	72°C	1 minuto
4	95°C	1 minuto
5	39 vezes ao passo de 2 a 4	
6	55°C	1 minuto
7	72°C	10 minutos
8	4°C	10 minutos
9	Fim	

Volume final de 10 microlitros : 9 μ L de Mix e 1 μ L de DNA da amostra.

C- Componentes do Mix da PCR para amplificação de um fragmento de 150pb do gene L1

REAGENTES	[] TOTAL	[] POR TUBO	VOLUME POR TUBO
GP5 (Alpha DNA)	10pmol/μL	10pmol	1,0μL
GP6+ (Alpha DNA)	10pmol/μL	10pmol	1,0μL
dNTP's (Invitrogen)	2,5mM	200μM	0,8μL
Tampão 1B (PHT, Phoneutria)	10X	1X	1,0μL
<i>Taq</i> DNA polimerase (PHT, Phoneutria)	5UI/μL	1UI	0,2μL
H ₂ O (Milli-Q)	-	-	5,0μL

Volume final de 10 microlitros : 9 μL de Mix e 1 μL de DNA da amostra.

D- Programa de Amplificação do fragmento de DNA viral de 150pb.

Passo	Temperatura	Tempo
1	95°C	4 minutos
2	95°C	1 minuto
3	45°C	1 minuto
4	72°C	1 minuto
5	39 vezes ao passo de 2 a	
6	72°C	1 minuto
7	4°C	10 minutos
8	Fim	

III- CONDIÇÕES DA PCR PARA A DETECÇÃO DO DNA DE TIPOS ESPECÍFICOS DO HPV

1- Tipagem dos HPVs 16 e 18

A- Iniciadores utilizados para Tipagem dos HPVs 16 e 18

INICIADOR	ALVO	SEQÜÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS	HPV	pb
E7CR3 (reverso)	E6/E7	(reverso: 5'- TGA GCT GTC GCT TAA TTG CTC)	Variável	Variável
16SF1(direto)	E6/E7	(5'-TGT ATG TCT TGT TGC AGA TCA TCA)	HPV16	149
18SF2(direto)	E6/E7	(5'- CCA TTC GTC CTG CAA CCG)	HPV18	177

Fonte: Yamaguchi *et al.* (2002)

B- Componentes do Mix da PCR para tipagem dos HPVs 16 e 18

REAGENTES	[] TOTAL	[] POR TUBO	VOLUME POR TUBO
Iniciador E7CR3 (Alpha DNA)	10pmol/ µL	10pmol	1,0µL
Iniciador tipo específico (Alpha DNA)	10pmol/ µL	10 pmol	1,0µL
dNTP's (Invitrogen)	2,5mM	200µM	0,80µL
Tampão 1B (PHT, Phoneutria)	10X	1X	1,0µL
Taq DNA polimerase (PHT, Phoneutria)	5UI/ µL	1UI	0,2µL
ddH ₂ O	-	-	5,0µL

Volume final de 10 microlitros: 9 µl de Mix e 1 µl de DNA da amostra.

C- Programa de Amplificação dos fragmentos de DNA dos HPVs 16 e 18

Passo	Temperatura	Tempo
1	95°C	5 minutos
2	HPV 16: 54 °C, HPV 18: 52 °C	1 minuto
3	72°C	1 minuto
4	95°C	1 minuto
5	39 vezes ao passo de 2 a 4	
6	HPV 16:54 °C , HPV18:52°C	1 minuto
7	72°C	10 minutos
8	4 °C	10 minutos
9	FIM	

III.2 TIPAGEM DOS HPVS 31, 52 E 58

A- Iniciadores utilizados para Tipagem dos HPVs 31, 52 e 58

INICIADOR	ALVO	SEQÜÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS	HPV	pb
E7CR3 (reverso)	E6/E7	(reverso: 5'- TGA GCT GTC GCT TAA TTG CTC)	Variável	Variável
31SF1(direto)	E6/E7	(5'- GTA TGG AAC AAC ATT AGA AAA ATT GAC)	HPV31	249
52SF2(direto)	E6/E7	(5'- CTA TTA GAT GTA TGA TTT GTC AAA CG)	HPV52	300
58SF1(direto)	E6/E7	(5'- ATG TAA AGT GTG CTT ACG ATT GC)	HPV58	375

Fonte: YAMAGUCHI *et al.* (2002)

B- Componentes do Mix de PCR para tipagem dos HPVs 31, 52 e 58

REAGENTES	[] TOTAL	[] POR TUBO	VOLUME POR TUBO
Iniciador E7CR3	10 pmol/µL	10 pmol	1,0µL
Iniciador tipo específico	10 pmol/µL	10 pmol	1,0µL
dNTP's (Invitrogen)	2,5mM	200µM	0,8µL
Tampão 1B (PHT, Phoneutria)	10X	1X	1,0µL
Taq DNA polimerase (PHT, Phoneutria)	5UI/ µL	1UI	0,2µL
H ₂ O	-	-	5,0µL

Volume final de 10 microlitros: 9 µl de Mix e 1 µl de DNA da amostra.

C-Programa de Amplificação dos fragmentos de DNA dos HPVs 31, 52 e 58

Passo	Temperatura	Tempo
1	95°C	5 minutos
2	HPV31: 50°C, HPV52: 48°C, HPV58: 55°C	1 minuto
3	72°C	1 minuto
4	95°C	1 minuto
5	39 X ao passo de 2 a 4	
6	HPV31: 50°C, HPV52: 48°C, HPV58: 55°C	1 minuto
7	72°C	10 minutos
8	4°C	10 minutos
	Fim	

III.3 TIPAGEM DO HPV 33

A- Iniciadores utilizados para Tipagem do HPV33

INICIADOR	ALVO	SEQÜÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS	HPV	pb
33 F 33R	E1/E2	5'- ATG ATA GAT GAT GTA ACG CC- 3' 5'- GCA CAC TCC ATG CGT ATC AG- 3'	HPV33	455

Fonte: GRCE *et al.* (1997)

B- Componentes do Mix da PCR

REAGENTES	[] TOTAL	[] POR TUBO	VOLUME POR TUBO
Iniciador 33 F	10 pmol/µL	5 pmol	0,5µL
Iniciador 33 R	10 pmol/µL	5 pmol	0,5µL
dNTP's (Invitrogen)	2,5mM	200µM	0,8µL
Tampão 1B (PHT, Phoneutria)	10X	1X	1,0µL
Taq DNA polimerase (PHT, Phoneutria)	5UI/ µL	1UI	0,2µL
H ₂ O	-	-	6,0µL

Volume final de 10 microlitros: 9 µl de Mix e 1 µl de DNA da amostra.

C- Programa de Amplificação do fragmento de DNA do HPV 33

Passo	Temperatura	Tempo
1	94°C	5 minutos
2	94°C	30 segundos
3	57°C	30 segundos
4	72°C	1 minuto
5	4 X ao passo 2	
6	94°C	30 segundos
7	55°C	30 segundos
8	72°C	1 minuto
9	34 X ao passo 6	
10	72°C	15 minutos
11	4°C	10 minutos
12	Fim	

III.4 TIPAGEM DO HPV 35

A- Componentes do Mix de PCR para tipagem do HPV 35

REAGENTES	[] TOTAL	[] POR TUBO	VOLUME POR TUBO
Iniciador 35 F	10 pmol/ μ L	10 pmol	1,0 μ L
Iniciador 35 R	10 pmol/ μ L	10 pmol	1,0 μ L
dNTP's (Invitrogen)	2,5mM	200 μ M	0,8 μ L
Tampão 1B (PHT, Phoneutria)	10X	1X	1,0 μ L
<i>Taq</i> DNA polimerase (PHT, Phoneutria)	5UI/ μ L	1UI	0,2 μ L
H ₂ O	-	-	5,0 μ L

Volume final de 10 microlitros: 9 μ l de Mix e 1 μ l de DNA da amostra.

B- Programa de Amplificação do Fragmento de 290pb do HPV35

Passo	Temperatura	Tempo
1	94°C	20 segundos
2	54°C	2 minutos
3	72°C	1 minuto
4	90°C	30 segundos
5	30 vezes ao passo de 2 a 4	
6	54°C	2 minutos
7	72°C	10 minutos
8	4°C	10 minutos
9	Fim	

IV. PROTOCOLO DE COLORAÇÃO PELA PRATA

Após a eletroforese, os géis foram submersos em solução fixadora (contendo 5 ml de ácido acético-VETEC, 100 ml de etanol e ddH₂O até um volume final de 1000 ml), por no mínimo 10 minutos. Em seguida, os géis foram expostos à solução de coloração contendo 0,30g de nitrato de prata (AgNO₃, *Labsynth*), 100 ml de solução fixadora e 200 ml água, por 15 minutos. Os géis foram então lavados com água destilada por 30 segundos e revelados com solução reveladora contendo 30g de hidróxido de sódio (NaOH) (VETEC), 10 ml de formaldeído (*Cromoline*) e ddH₂O para um volume final de 1000 ml, até o aparecimento das bandas de interesse (SANGUINETTI *et al.*, 1994).

ANEXO 3- DETECÇÃO E TIPAGEM DO HPV EM AMOSTRAS CERVICAIS

Tabela 1- Detecção e tipagem do HPV em amostras cervicais de pacientes com alterações histopatológicas*

Amostras	β-globina	L1/HPV	HPV16	HPV18	HPV31	HPV33	HPV35	HPV45	HPV52	HPV58
NICI4	X	X					X			
NICI10	X	X						X		
NICI30	X	X		X	X	X				X
NICI32	X	X								
NICI33	X	X				X				
NICI36	X	X		X	X					
NIVI38	X	X				X		X		
NICI43	X	X		X		X		X		
NICI47	X	X			X					
NICI51	X	X								
NICI52	X	X								
NICI53	X	X								
NICI60	X	0								
NICI62	X	0								
NICI63	X	X					X			
NICI64	X	X	X			X				
NICI65	X	X	X							
NICI66	X	X					X			
NICII1	X	X								
NICII2	X	X								
NICII6	X	X	X							
NICII7	X	X	X							
NICII15	X	X	X							X
NICII17	X	X	X							
NICII18	X	X								
NICII23	X	0								
NICII24	X	X		X		X	X			
NICII25	X	X	X	X						
NICII27	X	X								
NICII29	X	X							X	
NICII30	X	X							X	
NICII31	X	X								
NICII33	X	X	X							
NICII36	X	X	X						X	
NICII42	X	X	X						X	
NICII49	X	X								
NICII50	X	X						X		
NICII51	X	X					X			

Amostras	β -globina	L1/HPV	HPV16	HPV18	HPV31	HPV33	HPV35	HPV45	HPV52	HPV58
NICIII1	X	X	X	X						
NICIII3	X	X	X	X				X		
NICIII5	X	X	X	X						
NICIII11	X	X	X	X						
NICIII12	X	X		X						
NICIII13	X	X	X	X			X			
NICIII16	X	X	X							
NICIII17	X	X					X			X
NICIII18	X	X	X	X						
NICIII28	X	X					X			
NICIII29	X	X	X	X						
NICIII30	X	X			X		X			
NICIII33	X	X					X			X
NICIII39	X	X	X							
NICIII50	X	X			X		X		X	X
NICIII53	X	X			X	X			X	
NICIII54	X	X			X		X			X
NICIII55	X	X					X		X	
NICIII56	X	X			X		X		X	
NICIII59	X	0								
Ca1	X	X	X							
Ca3	X	X	X							
Ca4	X	X	X							
Ca5	X	X					X			
Ca17	X	X	X							
Ca18	X	X			X		X		X	X
Ca21	X	X								X
Ca22	X	X		X						
Ca23	X	X		X			X			
Ca27	X	X			X	X	X			X
Ca30	X	X	X		X					
Ca31	X	X	X		X					
Ca32	X	X	X	X						
Ca 35	X	X	X							
Ca36	X	X	X							

*Resultados assinalados com X indicam a presença de amplificação positiva do fragmento de 110pb do gene de β globina humano, de 150pb do gene *L1* do HPV e de fragmentos tipo-específicos dos genes *E6* e *E7* de 8 HPVs. As indicações em vermelho representam as amostras que não apresentavam amplificação positiva para o fragmento de 150pb do gene *L1* do HPV. As indicações em verde representam as amostras que apresentaram positividade para o DNA de dois ou mais tipos de HPV.

Tabela2- Detecção e Tipagem do HPV em amostras cervicais de pacientes com alterações histopatológicas

Amostras	β-globina	L1/HPV	HPV16	HPV18	HPV31	HPV33	HPV35	HPV45	HPV52	HPV58
NICI4	X	X						X		
NICI10	X	X							X	
NICI30	X	X		X	X	X				X
NICI32	X	X								
NICI36	X	X		X	X					
NIVI38	X	X					X		X	
NICI40	X	X	X					X		X
NICI43	X	X		X			X		X	
NICI47	X	X				X				
NICI52	X	X								
NICI53	X	X								
NICI59	X	X				X				
NICI60	X	0								
NICI61	X	X						X	X	
NICI63	X	X						X		
NICI65	X	X	X							
NICI66	X	X						X		
NICII2	X	X								
NICII6	X	X	X							
NICII7	X	X	X							
NICII15	X	X	X							X
NICII17	X	X	X							
NICII18	X	X								
NICII23	X	0								
NICII25	X	X	X	X						
NICII27	X	X								
NICII29	X	X								X
NICII30	X	X								X
NICII31	X	X								
NICII33	X	X	X							
NICII36	X	X	X							X
NICII42	X	X	X							X
NICII43	X	X								X
NICII47	X	X	X							
NICII49	X	X								
NICII50	X	X							X	
NICII51	X	X						X		

Amostras	β -globina	L1/HPV	HPV16	HPV18	HPV31	HPV33	HPV35	HPV45	HPV52	HPV58
NICIII1	X	X	X	X						
NICIII5	X	X	X	X						
NICIII13	X	X	X	X			X			
NICIII16	X	X	X							
NICIII17	X	X					X			X
NICIII18	X	X	X	X						
NICIII28	X	X					X			
NICIII29	X	X	X	X						
NICIII30	X	X			X		X			
NICIII39	X	X	X							
NICIII50	X	X			X		X		X	X
NICIII51	X	X	X							
NICIII53	X	X			X	X			X	
NICIII56	X	X			X		X		X	
NICIII57	X	X							X	
NICIII58	X	X								
NICIII59	X	0								
Ca1	X	X	X							
Ca3	X	X	X							
Ca4	X	X	X							
Ca5	X	X					X			
Ca17	X	X	X							
Ca18	X	X			X		X		X	X
Ca21	X	X								X
Ca22	X	X		X						
Ca23	X	X		X			X			
Ca27	X	X			X	X	X			X
Ca30	X	X	X		X					
Ca31	X	X	X		X					
Ca32	X	X	X	X						
Ca 35	X	X	X							
Ca36	X	X	X							

*Resultados assinalados com X indicam a presença de amplificação positiva do fragmento de 110pb do gene de β globina humano de 150pb do gene *L1* do HPV e de fragmentos tipo-específicos dos genes *E6* e *E7* de 8 HPVs. As indicações em vermelho representam as amostras que não apresentavam amplificação positiva para o fragmento de 150pb do gene *L1* do HPV. As indicações em verde representam as amostras que apresentaram positividade para o DNA de dois ou mais tipos de HPV.