



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



Programa de Pós-graduação em Biologia Celular

**AVALIAÇÃO DA DENSIDADE DE CÉLULAS DE
LANGERHANS EM COMPARAÇÃO À INFECÇÃO
PELO HPV EM LESÕES ESCAMOSAS
INTRAEPITELIAIS E INVASORAS DO COLO
UTERINO**

Daniele de Souza Camargos

Orientadora: Prof^ª Annamaria Ravara Vago

Belo Horizonte

2010

Daniele de Souza Camargos

**AVALIAÇÃO DA DENSIDADE DE CÉLULAS DE
LANGERHANS EM COMPARAÇÃO À INFECÇÃO
PELO HPV EM LESÕES ESCAMOSAS
INTRAEPITELIAIS E INVASORAS DO COLO
UTERINO**

Dissertação apresentada ao Colegiado do
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 à obtenção do título de
Mestre.

Orientadora

Prof^a Annamaria Ravara Vago

Aluna

Daniele de Souza Camargos

Belo Horizonte

2010

**AVALIAÇÃO DA DENSIDADE DE CÉLULAS DE
LANGERHANS EM COMPARAÇÃO À INFECÇÃO
PELO HPV EM LESÕES ESCAMOSAS
INTRAEPITELIAIS E INVASORAS DO COLO
UTERINO**

Aluna

Daniele de Souza Camargos

Orientadora

Profa. Annamaria Ravara Vago

Agências Financiadoras: CNPq, Capes e 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, pela oportunidade de trabalhar nessa área de Pesquisa fantástica, pela amizade, carinho e apoio;
- Ao querido amigo Alan, pela dedicação, disposição, paciência e grandes ensinamentos;
- À querida Soraya, pela amizade, companheirismo e suporte até altas horas no Microscópio confocal;
- Ao Chico por ser “um amigo para todas as horas”;
- À Keila, pela amizade e pela grandiosa contribuição no desenvolvimento do presente trabalho;
- À Profa Paula Ávila Fernandes do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da UFMG e ao Prof. Marcelo Pascoal do Departamento de Anatomia Patológica, ICEB, UFOP, pela realização da análise histopatológica e valiosa colaboração na realização deste trabalho;
- Ao Dr. Alexandre Tafuri, Coordenador do Laboratório de Anatomia Patológica Tafuri, Belo Horizonte, MG, pela realização da análise histopatológica e pela doação das amostras de tecido utilizadas no presente trabalho, além da sempre disponibilidade em contribuir e enriquecer o estudo realizado;
- Ao Prof. Marcelo Vidigal Caliari, Coordenador do Laboratório de Protozooses do Departamento de Patologia Geral, ICB, UFMG, pela fundamental Orientação na realização da Análise Morfométrica realizada no presente estudo, e ainda pelos grandes ensinamentos recebidos;
- Ao Prof. Marcos Xavier Silva do Departamento de Medicina Veterinária e Preventiva, Escola de Veterinária, UFMG pela realização da análise

estatística dos dados obtidos no presente estudo, além da grande disponibilidade e apoio;

- Ao Rodolfo do Laboratório de Biologia do Sistema Linfóide e da Regeneração, do Departamento de Morfologia, ICB, UFMG pela valiosa contribuição na realização do presente estudo;

- À Michele, do Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução, do Departamento de Morfologia, ICB, UFMG pela amizade durante toda essa trajetória e pela grande ajuda prestada para a finalização desse trabalho;

- Aos alunos do Laboratório de Biologia das Interações Celulares I, do Departamento de Morfologia, ICB, UFMG em especial à Dani, à Fê e ao Germano, pela plena disposição em sempre ajudar;

- Aos Professores do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, ICB, UFMG, em especial à Profa Denise Carmona Cara Machado, Coordenadora do Programa, por todo o apoio recebido, que foi fundamental à finalização dessa Dissertação;

- Aos amigos e companheiros do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular, em especial à Samyra, ao Guilherme e ao Felipe;

- A todos os funcionários do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular, em especial à Sibele por ser essa pessoa maravilhosa e sempre tão solícita;

- 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 paciência, amizade e companhia nos sábados, domingos e feriados que passávamos juntas trabalhando no Laboratório...

Muito Obrigada!

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACO	Anticoncepcionais Orais
AgNO ₃	Nitrato de Prata
AGUS	<i>Atypical glandular cells of undetermined significance</i> (Células glandulares atípicas de significado indeterminado)
APCs	<i>Antigen Presenting Cells</i> (Células Apresentadoras de Antígenos)
ASCUS	<i>Atypical squamous cells of undetermined significance</i> (Células escamosas atípicas de significado indeterminado)
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Albumina Bovina Sérica)
Ca	Carcinoma
Cd	<i>Cluster of differentiation</i> (marcador de diferenciação)
CAF	Cirurgia de Alta Frequência
CC	Câncer Cervical
CCR	<i>Chemokine Receptor</i> (Receptor de Quimiocinas)
CCE	Carcinoma de Células Escamosas
CD	Célula Dendrítica
CDD	Célula Dendrítica Dermal
CIS	Carcinoma <i>in situ</i>
CL	Célula de Langerhans
CLR	<i>Long Control Region</i> (Região Longa de Controle)
dd H ₂ O	Água bidestilada
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido Desóxi-ribonucleico)
dNTP	Desóxi-ribonucleotídeos Trifosfatados
DST	Doença Sexualmente Transmissível
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i> (Fator de Crescimento Epidérmico)
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> (Receptor Fator de Crescimento Epidérmico)
GB	Grânulos de Birbeck
HIS	Hibridização <i>in situ</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Adquirida
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 Pesquisa sobre o Câncer)
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IFN	Interferon
INCA	Instituto Nacional do Câncer
JEC	Junção Escamocolumnar
Kda	<i>Kilodalton</i>
LCR	<i>Long Control Region</i> (Região Longa de Controle)
LEI	Lesão Escamosa Intraepitelial
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
NUPAD	Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORI	Origem de Replicação
PAM	Posto de Atendimento Médico
pb	Pares de Base
PBH	Prefeitura de Belo Horizonte
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Solução Salina Tamponada)
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
pRb	Proteína do Retinoblastoma
PV	Papilomavírus
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ácido Ribonucleico)
rpm	Rotações por Minuto
SCOMGER	Secretaria de Coordenação Municipal e Gestão Regional
SIL	<i>Squamous Intraepithelial Lesion</i> (Lesão Escamosa Intraepitelial)
SND	Sobrenadante
TBE	Solução de Tris-Borato-EDTA
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TSBST	<i>Tris-buffered Saline with Tween 20</i> (Solução Salina Tamponada com Tris)
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
URR	<i>Upstream Regulatory Region</i> (Região Regulatória localizada a 5' do Promotor)

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1:	Secções de lesões precursoras do Carcinoma de Células Escamosas	19
FIGURA 2:	Organização do genoma do HPV	20
FIGURA 3:	Ciclo de vida durante a infecção produtiva por HPV.....	26
FIGURA 4:	Reconhecimento e Resposta do Sistema Imune Adaptativo à presença de células tumorais e ou infectas.....	41
FIGURA 5:	Curva de diluição do anticorpo anti-S100, em secções histológicas de amostras cervicais de NIC II, utilizando-se a técnica de Imunofluorescência Indireta.....	62
FIGURA 6:	Curva do tempo de incubação do anticorpo anti-S100, em secções histológicas de amostras cervicais de NIC II, utilizando-se a técnica de Imunofluorescência Indireta.....	63
FIGURA 7:	Curva de diluição do anticorpo anti-Langerina, em secções histológicas de amostras cervicais de NIC II, utilizando-se a técnica de Imunofluorescência Indireta.....	64
FIGURA 8:	Curva do tempo de incubação do anticorpo anti-Langerina, em amostras cervicais de NIC II, utilizando-se a técnica de Imunofluorescência Indireta.....	66
FIGURA 9:	Teste de possível reação inespecífica estabelecida pelos anticorpos secundários, pela técnica de Imunofluorescência Indireta.....	68
FIGURA 10:	Expressão das proteínas S100 e Langerina em secções histológicas de amostras de tecidos cervicais utilizando as técnicas de Imunohistoquímica (marcação pela Peroxidase) e Imunofluorescência Indireta.....	69
FIGURA 11:	Marcação dos anticorpos anti- S100 e anti-Langerina em secções histológicas de amostras de NIC I, utilizando a técnica de Imunofluorescência Indireta.....	71
FIGURA 12:	Marcação dos anticorpos anti- S100 e anti-Langerina em secções histológicas de amostras de NIC II, utilizando a técnica de Imunofluorescência Indireta.....	72
FIGURA 13:	Marcação dos anticorpos anti- S100 e anti-Langerina em secções histológicas de amostras de NIC III, utilizando a técnica de Imunofluorescência Indireta.....	73

FIGURA 14:	Marcação dos anticorpos anti- S100 e anti-Langerina em secções histológicas de amostras de câncer cervical, utilizando a técnica de Imunofluorescência Indireta.....	74
FIGURA 15:	Gel representativo da amplificação do fragmento de 110 pb do gene de β -globina humano e do fragmento viral de 150 pb.....	79

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1:	Relação entre o tipo de HPV e a patologia associada.....	24
TABELA 1:	Expressão Diferencial entre as Sub-populações de Células dendríticas (CD), as Células dendríticas dermais (CDDs) e as Células de Langerhans (CLs).....	31
TABELA 2:	Componentes do Mix de PCR para o Gene da β -globina humano.....	53
TABELA 3:	Programa de Amplificação do Gene da β -globina humano.....	54
TABELA 4:	Componentes do MIX de PCR para o Fragmento Viral de 450 pb	55
TABELA 5:	Programa de Amplificação do Fragmento de DNA Viral de 450 pb.....	55
TABELA 6:	Componentes do MIX de PCR para amplificação do Fragmento de DNA Viral de 150 pb.....	56
TABELA 7:	Programa de Amplificação do Fragmento de DNA Viral de 150 pb.....	56
TABELA 8:	Especificações dos anticorpos utilizados na técnica de Imunofluorescência Indireta.....	57
TABELA 9:	Expressão de S-100 em Lesões cervicais e controles	75
TABELA10:	Expressão de Langerina em Lesões cervicais e controles.....	76
TABELA 11:	Co-localização da Expressão dos anticorpos anti-Langerina e anti-S100 em Lesões cervicais e controles.....	77
TABELA 12:	Dados Moleculares.....	79
TABELA 13:	Associação entre o número médio de CL marcadas pelos anticorpos anti-S100 e anti-Langerina positivas ou negativas ao DNA de HPV.....	80

O carcinoma de células escamosas da cérvix uterina é precedido por uma série de modificações do epitélio original, que constituem as lesões pré-cancerosas ou lesões intra - epiteliais cervicais, transformações intra-epiteliais progressivas que podem evoluir para uma lesão cancerosa invasora. Estudos demonstram que os Papilomavírus Humano (HPVs) de alto risco estão relacionados ao desenvolvimento de processos celulares malignos além de inibir a potencialidade da resposta imune e os de baixo risco a lesões benignas e auto - limitadas. As células de Langerhans têm-se mostrado as primeiras células responsáveis pelas funções de reconhecimento, processamento e apresentação de antígeno em mucosas sendo que as funções dessas células parecem ser afetadas pela infecção por HPV. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo efetuar a análise da densidade de células de Langerhans em amostras de Lesões Escamosas Intra-epiteliais (LEIs) e invasoras do colo uterino induzidas pela presença do HPV, por meio da técnica de Imunofluorescência indireta. Observou-se uma redução do número médio de células de Langerhans pela utilização de ambos os marcadores S100 e Langerina, em amostras cervicais portadoras de LEIs. Essa redução esteve associada tanto à severidade dos distintos graus de Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC), ou seja, NIC de graus I, II e III, quanto em comparação ao grupo de amostras controles. Além disso, verificou-se a presença do DNA do HPV em 53,3% das amostras de NIC I, em 66,6% das amostras de NIC II, em 60% das amostras de NIC III e em 93,33% das amostras de câncer, com um aumento da detecção do DNA viral de acordo com a severidade da lesão.

SUMÁRIO

1.	REVISÃO DA LITERATURA.....	16
1.1	O Câncer Cervical.....	16
1.2	As Lesões Precursoras do Carcinoma de Células Escamosas.....	17
1.3	Os Papilomavírus Humanos.....	19
1.3.1	Expressão gênica do HPV	21
1.3.2	Classificação do HPV.....	23
1.3.3	O Ciclo de Vida do HPV.....	25
1.4	A Resposta Imune Local à infecção pelo HPV.....	26
1.4.1	A Resposta Imune Inata.....	27
1.4.2	A Resposta Imune Adaptativa.....	29
1.5	As células Dendríticas.....	29
1.5.1	Função e Maturação das células dendríticas.....	32
1.6	As células de Langerhans.....	32
1.6.1	Ontogenia das Células de Langerhans.....	34
1.6.2	Aspectos Morfológicos e Fenotípicos das Células de Langerhans.....	36
1.6.3	Propriedades Funcionais das Células de Langerhans.....	37
1.6.4	Maturação, ativação e migração das Células de Langerhans.....	38
1.6.5	O Papel das Células de Langerhans no controle da Infecção pelo HPV.....	41
1.6.6	Mecanismos de Evasão à Resposta Imune.....	42
1.6.7	O papel das Células de Langerhans na Progressão das Lesões Escamosas Intraepiteliais.....	43
2.	JUSTIFICATIVA.....	48

3.	OBJETIVOS.....	50
3.1	Objetivo Geral.....	50
4.	METODOLOGIA.....	51
4.1	População Estudada.....	51
4.2	Preparação das amostras: Coleta das Amostras, Fixação e Processamento histológico.....	52
4.3	Extração do DNA das Amostras.....	52
4.4	Amplificação de um Fragmento do Gene de β -Globina Humano.....	53
4.5	Deteção da Infecção por HPV.....	54
4.5.1	Prevalência do HPV.....	54
4.6	Imunofluorescência Indireta.....	56
4.7	Padronização da Reação de Imunofluorescência Indireta para Dupla Marcação dos Anticorpos anti-S100 e anti-Langerina.....	58
4.8	Avaliação e Interpretação das Marcações de S100 e Langerina.....	59
4.9	Análise Estatística.....	60
5.	RESULTADOS.....	61
5.1	Padronização da Técnica de Imunofluorescência Indireta para Análise das Proteínas S100 e Langerina.....	61
5.2	Expressão de Proteínas S100 e Langerina em Lesões Intraepiteliais Cervicais.....	71
5.3	Análise Estatística dos Dados.....	75
5.4	Avaliação da Infecção pelo HPV em Lesões Intraepiteliais cervicais.....	77
5.4.1	Análise da Integridade do DNA extraído das amostras cervicais.....	77
5.4.2	Prevalência do HPV nas Amostras Cervicais Analisadas.....	78
6.	DISCUSSÃO.....	81
6.1	O papel das células de Langerhans na Progressão da LEIs e na Resposta Imune Local à infecção pelo HPV.....	81

6.2	Marcadores e Procedimentos utilizados para determinação da densidade de células de Langerhans em Amostras Cervicais.....	84
6.3	A Imunidade Celular.....	87
6.4	Mecanismos de Evasão do HPV à Resposta Imune mediada por célula....	90
7.	CONCLUSÕES.....	96
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97
9.	SEÇÃO DE ANEXOS.....	111

1.1 O Câncer Cervical

O câncer do colo do útero corresponde, aproximadamente, a 15% de todas as categorias de câncer feminino, sendo o segundo tipo de câncer mais comum entre as mulheres no mundo. Com o surgimento de 500 mil casos novos por ano no mundo é responsável pela morte de, aproximadamente, 230 mil mulheres a cada ano. Em países desenvolvidos, a sobrevida média estimada em cinco anos varia de 59 a 69%. Nos países em desenvolvimento, os casos são encontrados em estádios relativamente avançados e, conseqüentemente, a sobrevida média é menor, de aproximadamente 49% após cinco anos. A sobrevida média mundial estimada para essa neoplasia é de 49% (Instituto Nacional do Câncer, 2009).

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). No Brasil, existe uma grande variação nas taxas de incidência, sendo as maiores observadas nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste. Uma maior incidência do câncer do colo do útero evidencia-se na faixa etária de 20 a 29 anos e o risco aumenta rapidamente até atingir seu pico, geralmente na faixa etária de 45 a 49 anos (INCA, 2009; Ministério da Saúde, 2002). Segundo estimativas do INCA, no ano de 2010 ocorrerão no Brasil 18.430 novos casos de câncer de colo uterino, com um risco estimado de 18 casos a cada 100 mil mulheres. No estado de Minas Gerais deverão ocorrer 1330 novos casos dessa neoplasia (INCA, 2009).

Os resultados procedentes da realização de trabalhos epidemiológicos, acerca da correlação existente entre a infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) e o câncer cervical, indicam que a presença dessa infecção é condição necessária para o surgimento dessa neoplasia. De fato, 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 (BOSCH *et al.*, 2002). Embora a infecção persistente por HPV seja a causa necessária para o desenvolvimento do câncer cervical, a presença de fatores de riscos imunológicos (imunossupressão), virais (carga e tipos virais) e comportamentais (múltiplos parceiros, tabagismo, multiparidade e uso do

anticoncepcional oral) aumentam a probabilidade de progressão das lesões em direção ao carcinoma invasor (SPINILLO *et al.*, 1993; INCA, 2009).

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 ou Lesões Escamosas Intra-epiteliais (LEIs). O sistema de classificação dessas lesões já sofreu várias alterações, recebendo diversas denominações, ao longo dos anos. Em 1953, Reagan e colaboradores introduziram o termo displasia categorizada em três grupos – leve, moderada e grave – dependendo do grau de comprometimento da espessura epitelial por células atípicas. Assim, as lesões pré-neoplásicas cervicais passaram a ser indicadas segundo as categorias de displasia e Carcinoma *in situ* (CIS) (HALBE *et al.*, 1998; SANKARANARAYANAN *et al.*, 2003; SELLORS *et al.*, 2004).

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 (Figura 1). Realizando-se uma comparação entre a classificação introduzida por Richart àquela proposta por Reagan, a NIC I correspondia à displasia leve, a NIC II à displasia moderada e a NIC III à displasia grave e CIS. O aumento da frequência de 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, que compreendia as anomalias compatíveis com atipia coilocitótica e lesões NIC I, e NIC de alto grau, que abrangia as NICs de grau II e III (HALBE, 1998; 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. Este sistema propunha a criação do termo Lesão Escamosa Intra-epitelial ou LEI (do inglês “*Squamous Intraepithelial Lesions*” ou SIL) e um esquema de categorização das lesões em dois graus. Assim, as lesões foram divididas em lesões de baixo grau (do inglês “*Low-grade Squamous Intraepithelial Lesions*” ou LSIL) e alto grau (do inglês “*High-grade Squamous Intraepithelial Lesions*” ou HSIL). A classificação de Bethesda considera como LSIL as alterações compatíveis com o efeito citopático do HPV e a NIC de baixo grau (NIC I), enquanto que as HSIL compreendem as NICs mais avançadas,

graus II e III. Embora elaborado para a emissão de laudos citopatológicos, o Sistema Bethesda é também utilizado para a descrição de achados histopatológicos (BOGLIOLO, 2000; MINISTÉRIO DA SAÚDE a, 2002; MINISTÉRIO DA SAÚDE b, 2002). No presente estudo utilizou-se a terminologia Neoplasia Intraepitelial Cervical, que é normalmente utilizada para a categorização histopatológica das lesões cervicais, porque o mesmo foi baseado na análise da correlação do número de células de Langerhans em diferentes tipos de lesões que foram classificadas de acordo com o critério das NICs.

A maior parte das displasias leve a moderada, lesões intra-epiteliais de baixo grau (NIC I) e NIC II evolui geralmente para a regressão, progredindo apenas em 10 a 15% dos casos (HAUSEN, 2000).

Muitos estudos epidemiológicos têm se dedicado à elucidação dos fatores de risco que possam estar relacionados ao desenvolvimento das neoplasias intra-epiteliais cervicais e do próprio câncer do colo uterino. Vários desses estudos têm relatado que a infecção persistente por certos tipos oncogênicos de HPV constitui o principal fator de risco para a patogênese do câncer cervical, sendo considerada uma causa necessária para o desenvolvimento da neoplasia do colo uterino (BOSCH *et al.*, 1995; IARC, 1995; SCHIFFMAN *et al.*, 1996; FRANCO *et al.*, 1999; WALBOOMERS *et al.*, 1999; FERENCZY *et al.*, 2002; FRANCO, 2002; COGLIANO *et al.*, 2005; IARC, 2005). Assim, a história natural da biologia do câncer cervical depende, entre outros aspectos, da presença da infecção persistente pelo HPV e das condições fisiopatológicas concomitantes relacionadas com o colo uterino (HAUSEN, 2000).

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 associada 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, podendo chegar ao carcinoma invasor - Figura 1 (HAUSEN, 2002).

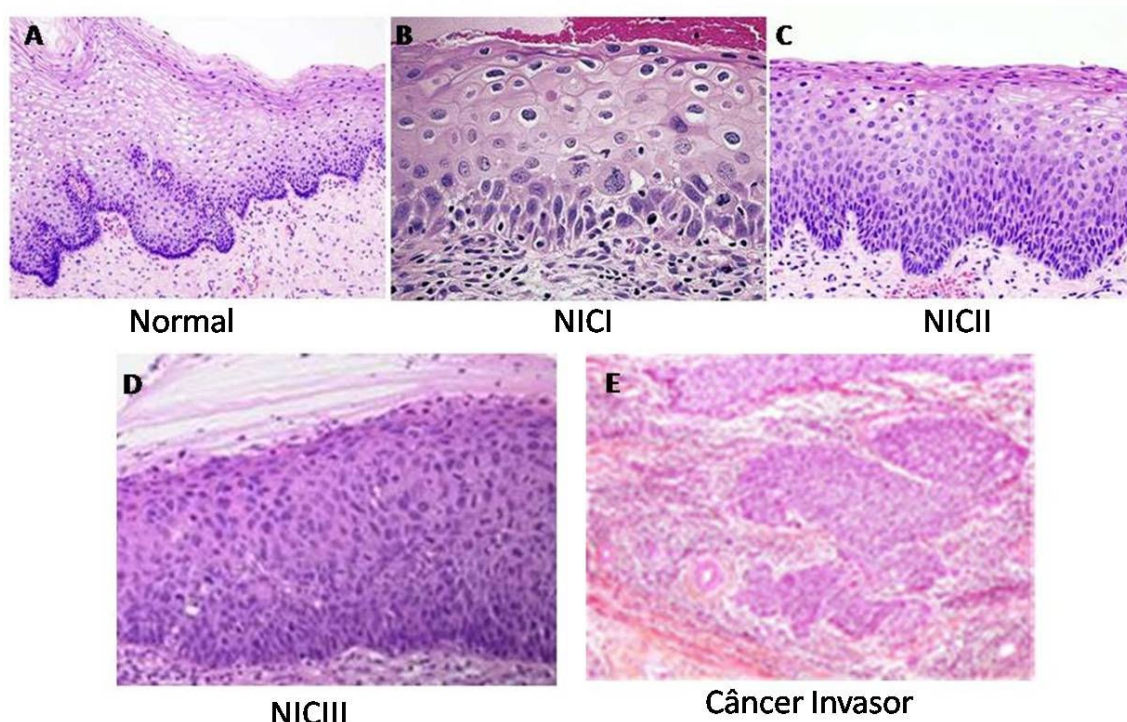


FIGURA 1: Secções de lesões precursoras do Carcinoma de Células Escamosas (Fonte: <http://en.wikipedia.org> e <http://screening.iarc.fr>). A letra A representa o epitélio escamoso normal com uma única camada de células basais, camadas intermediárias e superficiais ricas em glicogênio, apresentando núcleos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

1.3 O Papilomavírus Humano

O Papilomavírus, antes incluído na família *Papovaviridae* é agora classificado como uma nova família, *Papillomaviridae* (VILLIERS *et al.*, 2004). Consiste em um vírion de 55 nm, 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).

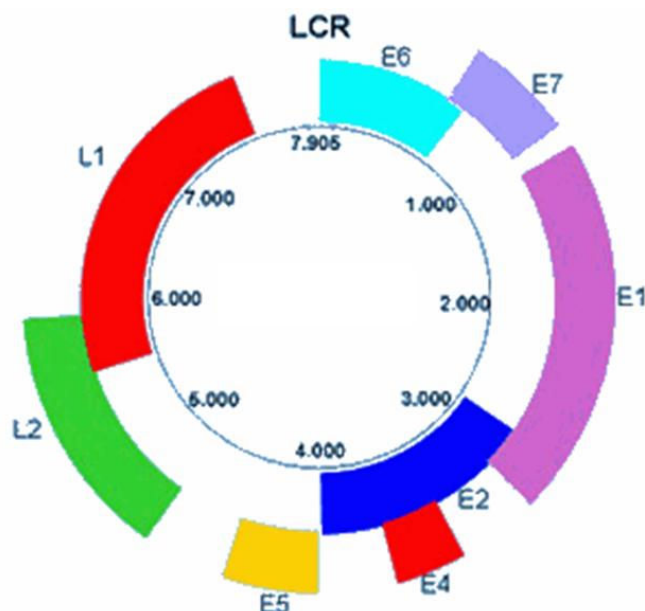


FIGURA 2: Organização do genoma do HPV (Fonte: www.ipoportomina-saude.pt). O genoma do vírus do papiloma humano contém aproximadamente 8000 pares de bases, divididas em três regiões: E (*early* ou precocemente transcrita); L (*late* ou tardiamente transcrita); LCR (*long-control-region* ou região de controle longa - RCL).

O genoma do HPV consiste em um DNA circular de dupla fita, contendo aproximadamente 8.000 pares de base (deleções de até 25% têm sido observadas), divididas em três segmentos: região precoce, ou “*early-region*” (E), constituída por seis genes; 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 1000 pares de bases 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; revisado por TYRING, 2000 e DOORBAR, 2005). A atividade da LCR é controlada pela proteína E2. Os genes *E1* e *E2* codificam proteínas envolvidas na replicação do DNA viral e no controle transcricional. Os produtos desses genes são essenciais nos processos de imortalização e transformações celulares induzidas pelo papilomavírus, como descrito a seguir (DOORBAR, 2005).

1.3.1 - EXPRESSÃO GÊNICA DO HPV

Os genes precoces incluem *E1*, *E2*, *E3*, *E4*, *E5*, *E6* e *E7*. Os genes *E1* e *E2* codificam importantes proteínas regulatórias do HPV. A função dessas duas proteínas é essencial para a replicação do DNA e a capacidade de infecção viral. A proteína E1, uma fosfoproteína de 70 a 80 Kd - ATP dependente, possui atividade de helicase; E1 apresenta um domínio de ligação ao DNA, um domínio de ligação à proteína E2 e um domínio catalítico.

A proteína E2 é uma fosfoproteína com três domínios funcionais: (i) o domínio N-terminal, que contém aproximadamente 220 aminoácidos e atua como um transativador; (ii) o domínio C-terminal, que contém cerca de 90 aminoácidos e, com sua forma dimérica, pode se ligar ao DNA; (iii) um terceiro domínio que consiste na região de união (“*hinge*”) localizada entre os outros dois domínios. A origem de replicação do DNA viral, localizada dentro da RCL ou URR, é composta por uma sequência rica em AT, sítio de ligação de E2. A proteína E2 inibe a transcrição dos genes *E6* e *E7* através da ligação em sítio específico da região URR, enquanto que a proteína codificada por *E1* facilita a ligação de E2 na região promotora (MCBRIDE *et al.*, 1991). A ligação da proteína E2 na região URR, causa um obstáculo para a ligação do fator de transcrição HD ou da RNA polimerase II na região de TATA box, ocorrendo assim, a inibição da transcrição dos genes e síntese das proteínas E6 e E7 (HUDSON *et al.*, 1990).

A integração do genoma viral no cromossoma das células do hospedeiro, fenômeno observado em situação de malignidade, promove a inativação do gene E2 e a concomitante super - expressão dos genes *E6* e *E7* (TYRING, 2000).

O gene *E4* codifica uma proteína possivelmente associada à maturação viral e à alteração da matriz intracelular. Estudos mostraram que a proteína de fusão E1^{E4} se

colocaliza com a citoqueratina celular, causando uma destruição do citoesqueleto o que promoveria a liberação das partículas virais (ROBERTS *et al.*, 1997; TYRING, 2000; SILVA *et al.*, 2002).

A região de *E5* parece codificar uma proteína, que se localiza no complexo de Golgi, retículo endoplasmático e na membrana nuclear das células infectadas. A presença de *E5* parece estimular o receptor do fator de crescimento epitelial (EGFR) na presença de seu ligante. Age conjuntamente com a proteína *E7*, possuindo função sinérgica ao fator de crescimento epitelial (EGF), estimulando a realização de mitoses (MÜNGUER, HOWLEY, 2002; BLACHON, GENTHER *et al.*, 2003; DEMERET, 2003; FEHRMANN, KLUMPP, LAIMINS, 2003).

A região de *E6* codifica uma proteína, de aproximadamente 150 aminoácidos, ligada ao zinco via domínio *zinc-finger* (dedo de zinco), localizada no interior do núcleo e membranas nucleares, que tem função inibitória das proteínas supressoras de tumor, como a p53. É capaz conjuntamente com uma proteína celular E6AP, de formar um complexo ubiquitina-ligase, que se liga à p53 levando à sua degradação, diminuindo assim a estabilidade genômica celular. A proteína *E6* não age sozinha, sendo suas atividades transformadoras e imortalizadoras dependentes da proteína oncogênica *E7*. A atividade oncogênica de *E6* é mais elevada em HPVs de alto risco (DUENSING *et al.*, 2001; MÜNGUER, HOWLEY, 2002; SILVA, AMARAL, CRUZ, 2002).

Por fim, a região de *E7* codifica uma fosfoproteína de aproximadamente 100 aminoácidos ligada ao zinco. Sua principal função é se ligar à proteína do retinoblastoma (pRb), proteína que controla a proliferação celular. A pRb tem a função de se ligar ao fator de transcrição E2F, causando sua inibição e conseqüente parada no ciclo celular. Assim, mediada por *E7*, a inativação de pRb resulta na liberação de E2F desencadeando uma proliferação celular descontrolada. A proteína *E7* induz também a formação de um número anormal de centrôssomos, sendo esse processo potencializado pela proteína *E6*. A atividade oncogênica de *E7* também está aumentada em HPVs de alto risco (DUENSING *et al.*, 2001; MÜNGUER, HOWLEY, 2002; SILVA, AMARAL, CRUZ, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2003).

Os dois genes tardios, *L1* e *L2*, codificam, respectivamente, as proteínas principal e secundária do capsídeo viral, que são as proteínas estruturais do vírion. *E4* é provavelmente um gene tardio porque é expresso tardiamente no núcleo sob replicação viral (TYRING, 2000).

1.3.2 – VACINAS CONTRA O HPV

Nos últimos anos, duas novas vacinas contra dois/quatro tipos de HPV começaram a ser comercializadas. A vacina bivalente contra os HPV 16 e 18 (Cervarix, Glaxo Smith Kline) e a vacina quadrivalente contra os HPVs 6, 11, 16 e 18 (Gardasil, Merck & Co) estão sendo amplamente usadas em alguns países. Cervarix é uma vacina profilática desenvolvida contra os HPVs 16, 18, 31, 33, e 45, os tipos que mais comumente estão relacionados à causa do câncer cervical, incluindo os adenocarcinomas. Cervarix provou ter eficácia durante 6.4 anos (HARPER, 2009). Gardasil é uma vacina profilática efetiva contra os HPVs -16, -18, -31, três tipos comumente relacionados a causa do câncer cervical. No entanto, Gardasil é também efetiva contra os HPVs 6 e 11, que causam verrugas genitais e papilomatosis respiratorias. Gardasil mostrou-se eficaz durante 5 anos (HARPER, 2009).

O objetivo da vacinação contra o HPV é estimular nas pacientes submetidas à imunização a produção de anticorpos capazes de prevenir a infecção, através de uma forte ligação com a superfície do vírus e impedindo fisicamente dessa forma o vírus de infectar a célula hospedeira. Proteínas estruturais do capsídeo do Papilomavírus Humano consistem no alvo lógico para a produção de tais anticorpos. O marco da descoberta da proteína do capsídeo L1 é reconhecido como o que levou ao desenvolvimento da vacina contra o HPV. Quando expressas em leveduras ou outras células L1 agrega-se para formar capsídeos vazios, conhecidos como VLP (*virus-like particles* ou partículas tipo-virais). As VLPs não contêm material genético infeccioso e, por consistirem de proteínas recombinantes, não são oncogênicas ou causam doenças, sendo, portanto, ideais para o uso em vacinas (EIBEN *et al* 2003; GROSS, 2007; LIN *et al*, 2010).

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 extensamente disponíveis. O sucesso da administração das vacinas contra o HPV para a população alvo requer atenciosa avaliação da expectativa econômica, clínica e da infraestrutura do Sistema de Saúde do país em questão. São muitas as questões que envolvem a implementação da vacina contra o HPV. Discute-se, por exemplo, o fato de (i) a mulher considerar a vacina uma substituição ao exame de rotina Papanicolau, de (ii) que mesmo as mulheres vacinadas poderiam estar vulneráveis a outros tipos de HPVs, que correspondem a 30% de todos os outros casos de câncer cervical. O desafio permanece nos países em

desenvolvimento, onde 80% dos cânceres cervicais ocorrem (EIBEN *et al* 2003; GROSS, 2007; LIN *et al*, 2010).

As vacinas de HPV não são terapêuticas e nem poderão inibir uma infecção por HPV nas células epiteliais basais, as quais continuariam a se transformar e se diferenciar em displasias cervicais. Há uma esperança clínica de que essas vacinas seriam capazes de neutralizar os virions do HPV - tanto nos tecidos infectados por auto-inoculação quanto por outros órgãos infectados além da cérvix - o que tornaria possível a prevenção pelas vacinas em tipos câncer menos comumente associados ao HPV, como câncer de pênis, vagina, vulva, anus, cavidade oral e orofaringe. No entanto, o potencial para uma vacina que proteja contra o câncer cervical relacionado ao HPV, é considerado um tremendo avanço na Saúde Pública e representa um poderoso impacto no futuro da prevenção ao câncer (D'ANDRILLI *et al*, 2010).

1.3.3 - CLASSIFICAÇÃO DO HPV

A análise da seqüência de DNA do genoma dos HPVs permitiu a identificação de acima de 100 distintos tipos virais. 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%, então, 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, 2003).

A diferença entre os tipos de HPV encontrados em tumores benignos e malignos permite classificá-los como HPVs de baixo risco e alto risco oncogênico (CAVALCANTI *et al.*, 2000) (Quadro1). Os HPVs de alto risco são representados pelos tipos: 16, 18, 26, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82. O HPV 16 é o mais prevalente HPV de alto risco sendo responsável por aproximadamente 50% de todos os cânceres cervicais (DOORBAR, 2006).

Os HPVs infectam tanto as mucosas quanto os tecidos cutâneos. Assim, podem ser classificados segundo seu tropismo como cutaneotrópicos e mucosotrópicos - (Quadro 1) (CRISH *et al.*, 2000; ZUMBACH 2000; SILVA *et al.*, 2003). As diferenças em se tratando de tropismo ainda carecem de estudos, porém, nos últimos anos, tem-se estudado intensamente sobre as variações discretas em certas porções do genoma que 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, 20,21,22,23,24,25,36,37,38,
	Papilomatose respiratória recorrente	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)	
	• Não específico	30,34,39,40,53,57,59,61,62,64, 66,67,68,69
	• Baixo risco (NIC I)	6,11,16,18,31,33,35,42,43,44,45,51, 52,74
	• Alto risco (NIC II)	16,18,6,11,31,34,33,35,39,42,44, 45,51,52,56,58,66
	Carcinoma cervical	16,18,31,45,33,35,39,51,52,56, 58,66,68,70

*A ordem indica a frequência relativa; os HPVs de baixo risco estão destacados em verde, enquanto que os de alto risco estão assinalados em vermelho. [Fonte: DOORBAR, 2005 (modificado)].

1.3.4 - O CICLO DE VIDA DO HPV

O ciclo do vírus inicia-se pela infecção das células basais e parabasais do epitélio cervical, acarretando geralmente áreas de metaplasia 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), que facilita a penetração das partículas virais. Ao se dividir, as células tronco basais infectadas produzem células que vão posteriormente se diferenciar carregando em seu interior os HPVs, além de células contendo os vírus que se conservarão na camada basal do epitélio determinando assim a cronificação da infecção (HAUSEN, 2000; DOORBAR, 2005).

A internalização do vírus é um processo lento e complexo que pode durar horas e que ocorre, no caso do HPV16, via endocitose mediada por clatrina. Porém essa forma de entrada parece não ser conservada por todos os tipos de HPVs, e alguns autores (BOUSARGHIM *et al.*, 2003) sugerem que a entrada do HPV31 seja estabelecida pela formação de cavéolas. O desnudamento viral intracelular permite que o DNA viral seja transportado para o núcleo celular. Após a infecção e o desnudamento, o genoma do HPV é mantido no núcleo das células hospedeiras sob a forma de DNA episomal cujo número é elevado para aproximadamente 50 a 100 cópias do HPV por célula, por meio da replicação viral (HAUSEN, 2000; DOORBAR, 2005).

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

Para que ocorra a produção de partículas virais, nas camadas médias ou superficiais do epitélio, os papilomavírus codificam duas proteínas estruturais importantes expressas nas camadas referidas do tecido infectado, assim que a replicação do genoma viral é finalizada. L2, a proteína secundária do capsídeo, assim como L1, a proteína principal do capsídeo, são produzidas 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 (DOORBAR, 2005).

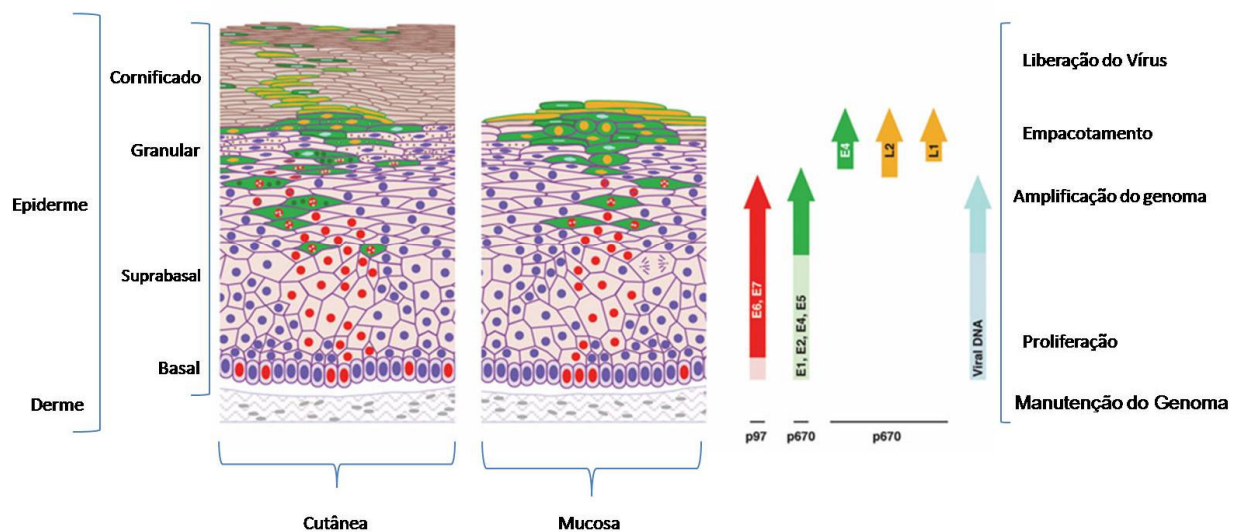


FIGURA 3: Ciclo de vida durante a infecção produtiva por HPV. Representação da mucosa escamosa e expressão gênica do HPV 16. Durante a diferenciação epitelial, p97 promove a expressão dos oncogenes virais *E6* e *E7* (vermelho). Nas camadas superiores do epitélio, p670 induz proteínas de replicação viral (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 evidência da importância da imunidade mediada por células no controle da infecção pelo HPV é baseada na existência de extenso número de artigos que documentam o aumento da prevalência do HPV e doenças associadas, em populações imunodeprimidas, como pacientes imunossuprimidos, receptores de transplantes e 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).

O risco para o desenvolvimento de câncer cervical em pacientes HIV positivas parece ser ainda maior em mulheres com baixa contagem de linfócitos TCD4⁺ (CASTELLSAGUÉ *et al.*, 2002). Porém, a tentativa 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 inconsistente. Alguns estudos sugerem que a doença avançada e o alto grau de deficiência imunológica, estão 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 independentemente da contagem de linfócitos TCD4⁺. 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 (SCOTT *et al.*, 2001).

Como mencionado, muitos estudos sugerem que a associação entre a infecção pelo HIV e o aumento da prevalência da infecção pelo HPV e patologias associadas, esteja relacionada com a imunossupressão observada na infecção pelo HIV, principalmente causada pela alteração da imunidade mediada por células (PALEFSKY *et al.*, 1999; SCOTT *et al.*, 2001).

1.4.1 – A RESPOSTA IMUNE INATA

O sistema inato consiste na primeira linha de defesa contra organismos invasores enquanto que o sistema imune adaptativo desenvolve uma resposta diante de uma re-exposição ao mesmo patógeno. Ambos os sistemas apresentam tanto componentes celulares como humorais, através dos quais executam suas funções de proteção. O sistema imune inato apresenta aspectos anatômicos que funcionam como barreiras à infecção. (AKTAS *et al.*, 2009; KENNEDY, 2010). Embora os sistemas imunes, inato e adaptativo funcionem na proteção de organismos invasores, eles diferem de várias maneiras. O sistema imune inato inclui sistemas de defesa que, em sua maior parte, estão constitutivamente presentes e prontos para serem mobilizados em uma infecção, enquanto que o adaptativo requer algum tempo para reagir contra um organismo invasor. Segundo, o sistema imune inato não é específico para um dado antígeno e reage da mesma maneira para uma variedade de organismos. Em contraposição, o sistema imune adaptativo é específico para um antígeno e reage somente contra o organismo

que induziu a resposta. E, finalmente, o sistema adaptativo possui memória imunológica, não observada na resposta imune inata (revisão em KENNEDY, 2010).

As células epiteliais, que foram inicialmente vistas apenas como uma barreira mecânica são hoje consideradas como apresentando muitas funções complexas na imunidade celular. Os queratinócitos, incluindo os cervicais, constitutivamente secretam baixos níveis de uma variedade de citocinas, fatores de crescimento e quimiocinas, e podem ser induzidos por vários estímulos a produzir quantidades mais significativas (BARKER *et al.*, 1991). Dentre essas citocinas incluem o fator de crescimento β (TGF- β), o fator de necrose tumoral (TNF- α) e interferons tipo I (IFN- α e IFN- β), que são produzidos, entre outros tipos celulares, pelas células epiteliais.

Alguns estudos investigaram a capacidade das citocinas, em particular TGF- β , TNF- α e 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. As expressões das proteínas E6 e E7 são consideradas críticas para a transformação maligna das células infectadas (CROOK *et al.*, 1989; HAWLEY *et al.*, 1989).

A maioria dos estudos desenvolvidos sobre a capacidade ou não de inibição de citocinas sobre a proliferação de células infectadas pelo HPV, foi realizada principalmente utilizando-se algumas linhagens celulares e foi altamente dependente das condições experimentais, gerando assim, resultados conflitantes (SCOTT *et al.*, 2001).

Um dos exemplos de citocinas cuja atividade anti-proliferativa continua a ser discutida é o TGF- β . Essa citocina tem demonstrado ser indutora e inibidora do crescimento de células não tumorais infectadas pelos HPVs 16 e 18, e esse efeito parece estar associado com a inibição da expressão das proteínas E6 e E7 (BRAUN *et al.*, 1992). Os últimos autores concluíram que o potencial anti-proliferativo do TGF- β sobre células infectadas parece ser dependente das linhagens celulares, do tipo de HPV considerado e dos diferentes estágios da progressão do tumor nas linhagens.

O TNF- α é outra citocina produzida por queratinócitos que parece apresentar um efeito anti-proliferativo em células infectadas pelo HPV, mas as conclusões também têm sido complexas, semelhantes àquelas observadas com o TGF- β . Essa citocina parece ter um efeito anti-proliferativo em células epiteliais infectadas pelo HPV-16, mas não em células infectadas pelo HPV-18 (MALEJCZYK *et al.*, 1992).

Os interferons (IFN), incluindo o IFN- α , o IFN- β e o IFN- γ , produzido por linfócitos T, também vêm sendo investigados quanto aos seus efeitos anti-proliferativos. O IFN- α parece inibir a proliferação de queratinócitos humanos infectados pelo HPV-16, em concentrações 10 a 100 vezes menor do que àquela necessária para inibir o crescimento de queratinócitos normais. O IFN- α também inibe a expressão da proteína E7 do HPV-16, mas não inibe a transcrição do seu gene e nem a expressão da proteína E6, sugerindo que a inibição do crescimento e transformação seja mediada pela inibição da expressão da proteína E7 (KHAN *et al.*, 1993). Conclui-se que, os efeitos mais variados atribuídos aos diferentes interferons, talvez sejam vírus tipos-específicos, linhagens celulares específicas ou dependentes de outras variáveis experimentais (SCOTT *et al.*, 2001).

1.4.2 – A RESPOSTA IMUNE ADAPTATIVA

Os diversos componentes celulares envolvidos na fase de reconhecimento e na fase efetora da resposta imune epitelial adaptativa já foram demonstrados tanto nas infecções cutâneas quanto nas infecções de mucosas pelo HPV (MORELLI *et al.*, 1994; MEMAR *et al.*, 1995). Esses componentes incluem (i) as células dendríticas (incluindo as células de Langerhans), que capturam antígenos para transportá-los aos linfonodos locais e apresentá-los às células T primárias; (ii) as células T proliferativas que retornaram aos tecidos epiteliais infectados, através de mecanismos envolvendo quimiocinas, moléculas de adesão e células acessórias como macrófagos.

1.5 - AS CÉLULAS DENDRÍTICAS

Células dendríticas (CDs) são células apresentadoras de antígeno ou APCs (“*antigen presenting cells*”) com uma habilidade peculiar para iniciar e manter uma resposta imune primária.

Existem muitos subgrupos de CDs que são caracterizados por diferenças nas vias de desenvolvimento, na expressão de marcadores de superfície e na localização anatômica. Com base no último critério, destacam-se as CDs encontradas na epiderme, ou células de Langerhans (CLs), na derme, ou células dendríticas dermais (CDDs), no baço, no timo e no fígado (BANCHEREAU *et al.*, 1999 e 2000).

Na pele humana, duas principais sub-populações de CDs podem ser discriminadas, as CLs e as células dendríticas dermais (CDDs) residentes na derme. Estudos de diferenciação *in-vitro* de precursores da medula óssea Cd34+, sugerem que as CLs e 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).

Entretanto, ambos os subgrupos de CDs também exibem marcadores específicos: as CLs são caracterizadas pela expressão de Langerina, uma lectina tipo C (BREATHNACH *et al.*, 1963; VALLADEAU *et al.*, 2000), de E-caderina (TANG *et al.*, 1993), de uma ATPase de membrana e do receptor CCR6 (CHARBONNIER *et al.*, 1999). As células dendríticas dermais (CDDs) podem ser distinguidas das CLs pela expressão de certas lectinas tipo C, como a MMR (“*macrophage mannose receptor*”), de SIGN, uma molécula de I-CAM específica de CD, do receptor Cd36, do fator de coagulação XIIIa (HEADINGTON, 1986; CERIO *et al.*, 1989) e do marcador de macrófago/monócito Cd14 - Tabela 1 (CAUX *et al.*, 1996 e 1997; De GRUIJL *et al.*, 2006; LENZ *et al.*, 1993).

É importante ressaltar, que a maioria do conhecimento corrente acerca das propriedades fenotípicas e funcionais das sub-populações de CDs (especialmente das CLs e CDDs), foi gerada pela análise de CDDs e CLs cultivadas *in-vitro* e obtidas a partir de monócitos sanguíneos e precursores da medula óssea Cd34+ (CAUX *et al.*, 1996; RATZINGER *et al.*, 2004). A análise de CDs que migraram de “*explants*” da pele ou isolada de suspensões da epiderme e da pele, demonstrou que a população de CDDs é mais complexa do que anteriormente determinado. Destaca-se o trabalho recente desenvolvido por Santeogoets e colaboradores (2008) que estudaram por meio da técnica de “*micro-array*” de alta definição o perfil transcricional de CLs e de sub-populações de CDDs em relação à expressão de quimiocinas e de seus receptores, de citocinas e de seus receptores, de moléculas de adesão e moléculas co - estimulatórias, das lectinas tipo C, de membros da família TNF- α e de seus receptores, de fatores de transcrição e fatores imuno-modulatórios (SANTEGOETS *et al.*, 2008). A diferença de expressão de algumas dessas moléculas observadas entre as duas populações de CDs (CLs e CDDs) está descrita na Tabela 1.

TABELA 1 – Expressão diferencial entre as sub-populações de Células dendríticas, as Células dendríticas dermais (CDDs) e as Células de Langerhans (CLs).

		Literatura			Expressão de RNAm pela técnica de Micro-array					
Gene		CDD ^a	CL ^a	Cd1a+ CDD ^b			CL ^b			
Cd1a		+	+	++			+++			
Cd 205		+	+	+			++			
Cd 206,		+	-	++			-			
Cd207, Langerina		-	+	-			+++			
Cd209, DC-SIGN		+	-	+			-			
Cd36		+	-	+			-			
Fator XIIIa		+	-	++			-			
CCR5		+	-	++			-			
CCR6		-	+	-			+			
ATPase		-	+	-			+			
E-caderina		-	+	++			+++			
Níveis de Expressão Relativos de Moléculas Co-estimulatórias										
Gene	Cd1a	Cd1b	Cd1c	Cd11b	Cd11c	Cd80	Cd83	Cd86		
CDD ^a Cd1a+	++	++	+++	++	+	+	+++	++		
CL ^a	+++	+	++	-	-	-	+++	++		
Níveis de Expressão Relativos de Quimiocinas e Receptores de Quimiocinas										
Gene	CCL3, MIP-1 _∞	CCL4	CCL20	CCL22	CXCL2	CXCL3	CCR5	CCR6	CCR7	
Cd1a+ CDD ^a	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	+++	
CL ^a	-	++	++	+++	-	-	-	+	-	
Níveis de Expressão Relativos de Citocinas e Receptores de Citocinas										
Gene	IL-1 α	IL-1 β	IL-6	IL-8	IL-10	IL-15	IL-16	IFN- β 1	IFN- γ R1	IFN- γ R2
Cd1a+ CDD ^a	++	+++	++	+++	++	++	+	+	++	++
CL ^a	++	+++	-	+++	-	-	-	-	++	++
Níveis de Expressão Relativos de Lectinas Tipo C, Fc RS e Receptores										
Gene	Cd207, Langerina			Cd208, DC Lamp		Lectina TipoC 13		E-caderina		
Cd1a+ CDD ^a	-			+++		+++		++		
CL ^a	+++			++		+		+++		
Níveis de Expressão Relativos de Membros da Família TNF alfa										
Gene	Cd40	TNF- α		TNF- R1		TNF- R2		Cd30		
Cd1a+ CDD ^a	++	++		+		++		-		
CL ^a	+	++		+		++		+		
Níveis de Expressão Relativos de Fatores Imuno-modulatórios										
Gene		IL-10		PGE2 R2		PGE2 R3		PGE2 R4		
Cd1a+ CDD ^a		++		+		++		+++		
CL ^a		-		-		+		++		

^aExpressão descrita na literatura: revista por Valladeau e Saeland (2005) e Larregina e Falo (2005). Valores: -, Ausente; +, Presente. ^b Expressão Determinada pela análise de “Micro-array” de alta intensidade. Níveis de intensidade: -: <200; +: 200 - 500; ++: 500-5000; +++: >5000. Fonte: [SANTEGOETS, 2008 (modificado)].

1.5.1 FUNÇÃO E MATURAÇÃO DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

Como “sensores-chave” de perigo, as células dendríticas imaturas residem em tecidos periféricos e órgãos que estão normalmente muito expostos a antígenos como a pele, mucosa nasal, pulmões, estômago e intestinos. Essas células são especializadas na captura de antígenos e constantemente “patrulham” o meio ambiente à procura de antígenos, inflamação local e patógenos (ROMANI *et al.*, 2003). Eventualmente, todas as CDs residentes em um mesmo tecido migram através da linfa para os linfonodos regionais onde reagem com linfócitos “virgens” circulantes (“T - *naive cells*”). A indução da resposta imune adaptativa tem início quando um dado patógeno é fagocitado por uma célula dendrítica imatura em um tecido infectado. Sob o reconhecimento de sinais de perigo, as CDs imaturas sofrem maturação resultando na inibição da capacidade de captura de antígenos, assim como na mudança na expressão de receptores de superfície, especialmente de quimiocinas. (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 quimiocinas e de seus receptores (como as interleucinas IL-1 α e IL-1 β , e o TNF- α) nesse processo, facilitando e guiando a migração das CDs (ROAK *et al.*, 1995; CUMBERBATCH *et al.*, 1999 e 2003). Esse processo culmina na apresentação apropriada de antígenos processados aos linfócitos T, e ao início de uma adequada resposta imune. (VALLADEAU, SAELAND, 2005). Considerando que as células T necessitam do transporte e processamento de antígenos, a sua dependência funcional das CDs constitui requerimento absoluto para que possam eficientemente iniciar suas funções como células efectoras, os linfócitos T citotóxicos CD4+ ou CD8+.

1.6 - AS CÉLULAS DE LANGERHANS

A pele, em particular a epiderme, não pode ser apenas considerada como uma camada inerte que protege o organismo das injúrias do meio exterior: ao contrário, ela está intimamente envolvida no estabelecimento da resposta imune, e as células de Langerhans (CLs), membros do sistema de células dendríticas da epiderme, desempenham uma função central nesse processo. Essas células residem na camada mais basal da epiderme e dos demais epitélies, 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.

Como revisado por Romani e colaboradores (2003), as CLs da epiderme foram as primeiras células dendríticas descritas, descobertas em 1868 pelo então estudante de Medicina em Berlim, Paul Langerhans, que descreveu “células com ramificações semelhantes a dendritos” na epiderme, por meio da técnica de impregnação por Cloreto de ouro, utilizada à época para a identificação de células nervosas. Por mais de um século as CLs foram consideradas como neurônios. Porém com o advento da técnica de microscopia eletrônica, estudos dedicados à análise ultraestrutural dessas células falharam em demonstrar aspectos estruturais relacionados às células nervosas, passando essas células a serem consideradas melanócitos especializados. Entretanto a demonstração de CLs em amostras de vitiligo (epiderme com ausência de melanócitos) por Birbeck em 1961, e da expressão da enzima ATPase (normalmente sintetizada por leucócitos) por Wolff em 1963, contribuiu para que essas células deixassem de ser classificadas como neurônios, para serem consideradas inicialmente como histiócitos, e posteriormente como células mesenquimais e macrófagos. O estabelecimento definitivo de uma função relacionada ao sistema imune, só foi finalmente demonstrado para as CLs quando foi observada, na superfície dessas células, a expressão de receptores Fc (e receptores do complemento) e de moléculas de MHC da classe II (KLARESKOG *et al.*, 1977; ROWDEN *et al.*, 1977). Estudos posteriores desenvolvidos na década de 80, tanto no modelo experimental (cobaias e camundongos) quanto em humanos (STINGL *et al.*, 1978; GREEN *et al.*, 1980; PEHAMBERGER *et al.*, 1983; BRAATHEN *et al.*, 1980; BJERCKE *et al.*, 1984; SCHEYNIUS *et al.*, 1983), demonstraram para as CLs a importante função de APCs. Contudo, a verdadeira posição dessas células dentro do sistema hematopoiético só foi elucidada quando foi estabelecido que as CLs deveriam ser consideradas como verdadeiras células dendríticas, com base na comparação morfo-funcional realizada entre CLs epidérmicas e células dendríticas esplênicas, em camundongo (SCHULER *et al.*, 1985).

Desde então, as CLs foram utilizadas como o principal modelo de estudo da biologia das células dendríticas, e, de fato, importante conhecimento acerca da função dessas células foi estabelecido em estudos desenvolvidos em CLs, como (i) a descoberta de GM-CSF (Fator Estimulador de Colônia Granulócito - Macrófago) como fator de crescimento crucial para 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), (iv) a translocação de moléculas de MHC II para a superfície celular sob maturação (PIERRE *et al.*, 1997), entre outros (ROMANI *et al.*, 1989; ROMANI *et al.*, 1989; LEE *et al.*, 1993; REIS E SOUSA *et al.*, 1993).

Entretanto, embora as CLs pertençam à família de células dendríticas, e, compartilhem com os demais membros dessa família diversas características morfo-funcionais, agora é conhecido que as CLs 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 (ROMANI *et al.*, 2003).

1.6.1 ONTOGENIA DAS CÉLULAS DE LANGERHANS

Como todas as células do sistema imune, as CLs se originam de precursores da medula óssea que expressam o marcador Cd34, como definido em importantes trabalhos realizados no modelo experimental (FREELINGER *et al.*, 1979; KATZ *et al.*, 1979;) ou em humanos (PERREAULT *et al.*, 1984; VOCL-PLATZER *et al.*, 1984). Durante a ontogenia, os precursores das CLs migram para a epiderme e adquirem moléculas imunologicamente importantes como a ATPase, Cd45, MHC de classe II e Langerina/Cd207 – uma lectina tipo C, assim como os grânulos de Birbeck, como exposto adiante (ROMANI *et al.*, 1986; ELBE *et al.*, 1989; FOSTER *et al.*, 1989)

Embora o exato precursor das CLs na medula óssea não tenha sido ainda identificado, alguns trabalhos indicam que, sob certas circunstâncias, os monócitos do sangue periférico podem dar origem às CLs. Monócitos cultivados *in-vitro* na presença de GM-CSF, IL-4 e TGF- β são capazes de originar células com alguns aspectos de CLs, e monócitos que “transmigram” através de células epiteliais podem se transformar em células dendríticas tanto *in-vitro* como *in-vivo* (GEISSMANN *et al.*, 1998; RANDOLPH *et al.*, 1998; RANDOLPH *et al.*, 1999).

Outra intrigante questão acerca da ontogenia das CLs corresponde à definição de sua origem mielóide ou linfóide, uma vez que essas células expressam típicos marcadores mielóides, como Cd11b (uma integrina α manose) e Cd33, mas também são capazes de expressar, sob as condições de maturação e migração a molécula Cd8 α , antígeno característico da linhagem linfóide (SCHULER *et al.*, 1985; LENZ *et al.*, 1993). Porém trabalhos utilizando camundongos “*knock-out*” para a linhagem linfóide

(Ikaros) ou linhagens celulares (células tronco Cd34+) transfectadas com o fator de transcrição mielóide PU. 1, demonstraram produção normal de CLs epiteliais assim como a diferenciação das células tronco em células com fenótipo de CLs (expressão de Langerina/Cd207+ e E-caderina), respectivamente (IWAMA *et al.*, 2002). Os últimos trabalhos fortemente sugerem uma origem mielóide para as CLs (LENZ *et al.*, 1993; ANJUÈRE *et al.*, 2000; MERAD *et al.*, 2000; TRAVER *et al.*, 2000).

Embora relativamente pouco seja conhecido acerca da migração das CLs para a epiderme a partir da medula óssea aonde as mesmas são geradas, um importante aspecto relativo à renovação das CLs na epiderme já foi elucidado, como, por exemplo, o baixo “*turnover*” ou capacidade de renovação dessas células, capazes de permanecer na epiderme por longos períodos, que variam de algumas semanas até 4 meses. Esse fato pode ser devido tanto à elevada longevidade dessas células dentro do ambiente epidermal, quanto ao baixo nível de divisão apresentado por essas células (CZERNIELEWSKI *et al.*, 1985; KAMATH *et al.*, 2002; MERAD *et al.*, 2002).

Destaca-se que duas importantes citocinas estão criticamente envolvidas no processo de migração de precursores das CLs para a epiderme, o TGF- β 1 e a proteína MIP-3 α /CCL20. O TGF- β 1 consiste em uma citocina derivada de queratinócitos essencial para estimular o influxo de precursores de CLs na pele, assim como o adequado desenvolvimento dos grânulos de Birbeck em CLs (BORKOWSKI *et al.*, 1996). Alguns estudos indicam que essa citocina é capaz de induzir o fator de transcrição Id2 aumentando a expressão de genes relacionados aos processos acima descritos (TAKAHARA *et al.*, 2002). Da mesma forma, a citocina MIP-3 α /CCL20, produzida por queratinócitos na presença de inflamação, é capaz de se ligar ao receptor CCR6, e possivelmente ao receptor CCR2, presentes na superfície de precursores de CL, favorecendo a migração desses para a epiderme (BORKOWSKI *et al.*, 1996; BORKOWSKI *et al.*, 1997; CHARNONNIER *et al.*, 1999).

1.6.2 ASPECTOS MORFOLÓGICOS E FENOTÍPICOS DAS CÉLULAS DE LANGERHANS

Os grânulos de Birbeck são estruturas que geralmente apresentam forma de raquete presentes unicamente nas CLs, cuja estrutura foi intensamente estudada e estabelecida por microscopia eletrônica (BIRBECK *et al.*, 1961). Uma vez que estão presentes apenas em CLs, eles podem ser ultra-estruturalmente utilizados para a

identificação dessas células em sítios extra-epidérmicos como a derme, o timo, a mucosa, a parede vascular, os tecidos do aparelho respiratório e os linfonodos (BIRBECK *et al*, 1961; WOLFF *et al*, 1967). 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 CLs, 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 com a formação dos grânulos de Birbeck (GB). 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. Assim, por meio da formação de estruturas de membrana sobrepostas e com aspecto de “zipper” a molécula de Langerina foi capaz de induzir a formação desses grânulos (VALLADEAU *et al.*, 2000). Os últimos autores sugeriram que essa propriedade da molécula de Langerina seria uma consequência da função de captura de antígenos estabelecida por essa glicoproteína, permitindo o transporte antigênico através dessas organelas (GB), e fornecendo o acesso a uma via não clássica de processamento de antígeno. Considerando a capacidade já demonstrada pelas CDs de realizar a apresentação de antígenos cruzada (“*cross-presentation*”) entre as moléculas MHC de classe I e II (ROMANI *et al.*, 1989; DEN HAAN JMM *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 de classe I (VALLADEAU *et al.*, 2000).

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 CLs em importantes aspectos biológicos, como a sua ontogenia, maturação e ativação (VALLADEAU *et al.*, 1999 e 2000).

Além da presença dos grânulos de Birbeck, as CLs diferem das demais células dendríticas quanto à expressão de moléculas de superfície (Tabela 1), com destaque para uma maior expressão de Cd1a, do receptor de adesão celular E - caderina, da ATPase (adenosina tri-fosfatase) de membrana e do receptor de quimiocinas CCR6 (SANTEGOETS *et al.*, 2008).

1.6.3 PROPRIEDADES FUNCIONAIS DAS CÉLULAS DE LANGERHANS

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

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

As diferenças observadas na expressão de lectinas tipo C, sugerem que ambos os subgrupos de CDs da pele (CL e CDD) podem reconhecer e responder com um diferente espectro de patógenos (ROMANI *et al.*, 2006; SANTEGÓES *et al.*, 2008). Além disso, células dendríticas dermais 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 as CLs parecem ser mais potentes estimuladores *in-vitro* de linfócitos T citotóxicos, assim como indutores mais potentes de uma resposta TH1 como resultado de sua incapacidade de produzir IL-10 sob a ligação de Cd40 (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 CLs 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 CLs e na apresentação apropriada de antígenos aos linfócitos T, para desencadeamento de uma resposta imune eficiente, como descrito adiante.

1.6.4 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 fenotipica e funcionalmente, denominadas de células dendríticas maduras e imaturas (FLORES *et al.*, 2005; HAYATI *et al.*, 2007; SANTGOETS *et al.*, 2008). As células imaturas são capazes de identificar e capturar antígenos, enquanto que as células maduras possuem a capacidade de funcionar como APCs. As CDs da pele, ou seja, as CLs da epiderme e as CDs da derme são células dendríticas imaturas típicas, que necessitam sofrer maturação para funcionarem como APCs. A característica diferencial entre essas duas populações (células maduras e imaturas) é a expressão de algumas moléculas acessórias, especialmente Cd83, que pode ser demonstrada imuno-histoquimicamente (HAYATI *et al.*, 2007, SANTGOETS *et al.*, 2008).

As células de Langerhans imaturas que residem na periferia da epiderme em estado estável 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 CLs, ocorre o processamento desses (Figura 4A) e a apresentação dos antígenos processados na superfície dessas células por meio das moléculas MHC de classe I ou II e da associação à citocinas pró-inflamatórias, eventos que garantem a ativação das CLs.

Após ativação, há um aumento drástico na expressão de moléculas co - estimulatórias na superfície das CLs e o início da produção de citocinas requeridas para o desencadeamento de uma resposta inflamatória tipo TH1 ou TH2 (Figura 4B). O receptor de quimiocina CCR7, que apresenta importante função na migração dessas células para o encontro com células T nos linfonodos, constitui o exemplo de uma das moléculas de superfície que tem a sua expressão aumentada durante a ativação das CLs (ROMANI *et al.*, 2003). Além disso, quando ativadas, essas células diminuem a expressão de uma molécula envolvida na adesão celular, a E - caderina, conhecida por manter a posição das CLs na epiderme (TANG *et al.*, 1993).

Assim, a fase de reconhecimento de antígenos continua com o transporte desses e a migração das CLs para os órgãos linfóides periféricos, eventos essenciais para garantir a interação das CLs com células T específicas. Como revisado por Wang e colaboradores em (1999), citocinas produzidas principalmente por queratinócitos, mas também pelas células de Langerhans propriamente ditas, parecem ser cruciais na mediação do processo de migração das CLs. Uma importância particular tem as citocinas IL-1 α e TNF- α (produzidas principalmente por queratinócitos) e IL-1 β (produzida principalmente pelas células de Langerhans), uma vez que todas promovem a migração das células de Langerhans. A IL-10, produzida por queratinócitos, age como inibidora da migração das células de Langerhans (CAUX *et al.*, 1997). Outras citocinas, como por exemplo, GM-CSF, também produzida por queratinócitos, promovem o início da transformação das células de Langerhans em células dendríticas maduras (WANG *et al.*, 1999).

Dessa forma, quando as CLs chegam aos linfonodos adquirem uma superfície fenotipicamente característica de célula dendrítica madura capaz de ativar as células TCD8+ ou TCD4+ 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 (presente na superfície das células T) com o ligante da família B7 (expresso na membrana das CLs), e outros sinais co - estimulatórios das CDs que transmitem o estímulo de ativação para células T tornando-as células-efetoras, ou seja, linfócitos TCD8+ citotóxicos e células TCDC4+ “*helper*”. Essas células efetoras adquirem moléculas que auxiliam na sua migração para os tecidos afetados, no qual exercerão sua função efetora reconhecendo e eliminando especificamente as células infectadas, como apresentado na Figura 4A (JANEWAY *et al.*, 2002; TINDLE *et al.*, 2002; ROMANI *et al.*, 2003; STEINMAN *et al.*, 2007).

A capacidade de apresentar antígenos via a molécula de MHC-II é diminuída nas CLs sob maturação. A apresentação cruzada de antígenos, originalmente considerada uma via não convencional de apresentação de antígeno é agora aceita como componente essencial da resposta imune contra patógenos que não infectam CDs e que, portanto, poderiam requisitar respostas restritas à moléculas de MHC classe I (DEN HAN *et al.*, 2001).

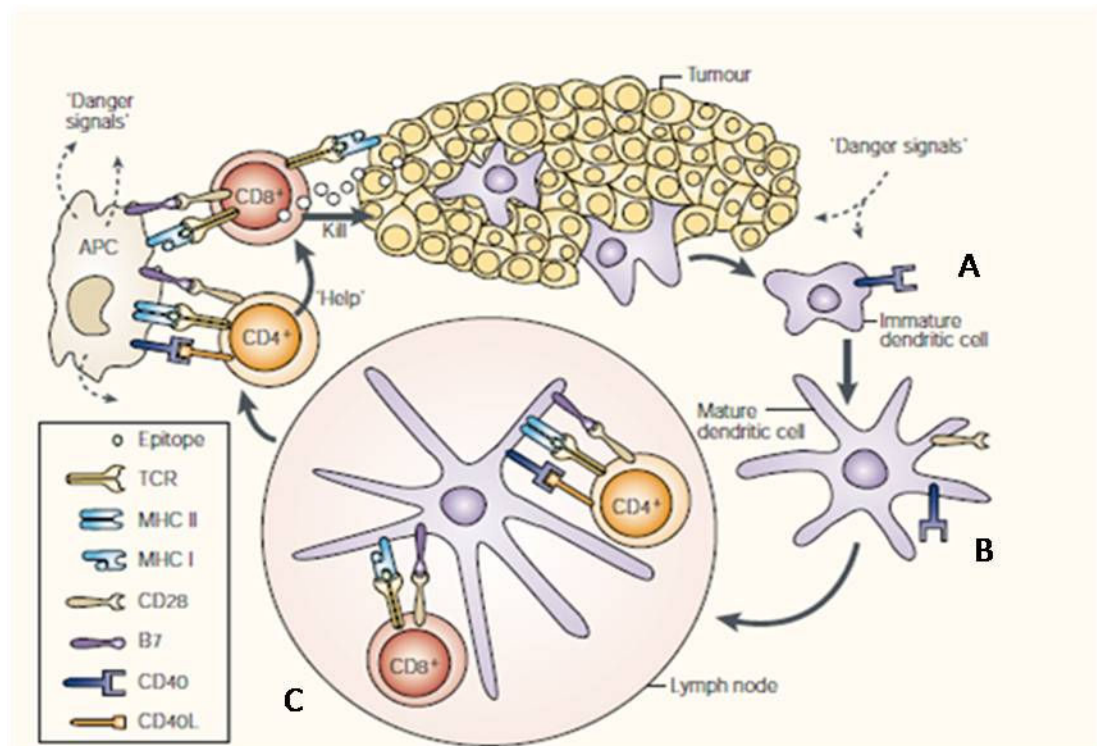


FIGURA 4: Reconhecimento e Resposta do Sistema Imune Adaptativo à presença de células tumorais e ou infectas. As CDs reconhecem proteínas antigênicas. Uma vez dentro das CD essas proteínas são processadas em peptídeos e expostas através de MHC de classe I e II. Sendo assim, quando as CLs chegam aos linfonodos adquirem uma superfície fenotipicamente característica de célula dendrítica madura capaz de ativar as células TCD8+ ou TCD4+ através da apresentação cruzada (“cross-presentation”) com as moléculas MHC de classe I e II, respectivamente. Destaca-se a co-estimulação estabelecida pela ligação de Cd28 (presente 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 células-efetoras, ou seja, linfócitos TCD8+ citotóxicos e células TCD4+ “helper”. Essas células efetoras adquirem moléculas que auxiliam na sua migração para os tecidos afetados, no qual exercerão sua função efetora atacando especificamente as células infectadas. [Fonte: TINDLE, 2002 (modificado)].

1.6 5 O PAPEL DAS CÉLULAS DE LANGERHANS NO CONTROLE DA INFECÇÃO PELO HPV

Considerando que as células T necessitam do transporte e processamento de antígenos, a sua dependência das CDs constitui requerimento absoluto para que possam eficientemente iniciar e exercer as suas funções como células efectoras, linfócitos T citotóxicos CD4+ ou CD8+.

Portanto, como ressaltado, 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 tal célula com potencial fagocitário, um elemento importante de defesa imune local (ROMANI *et al.*, 1989). Sendo assim, dado o confinamento da infecção pelo HPV na camada epitelial, a presença de células dendríticas ou de células de Langerhans nesse sítio poderia ser eficaz em gerar uma resposta imune eficiente.

A demonstração do papel da imunidade celular, ou seja, da 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 (FRAZER *et al.*, 2004). Apesar da origem infecciosa da neoplasia cervical e da cronicidade da infecção pelo HPV, estudos indicam que os linfócitos T citotóxicos de uma substancial proporção de mulheres parecem não ser responsivos à infecção pelo HPV. Esse fato parece ser em parte devido à falha no estabelecimento de uma resposta imune local observada nos processos de captura e apresentação de antígenos mediados pelas CLs, como será descrito posteriormente na seção de Discussão no presente estudo (CONOOR *et al.*, 1999). Por outro lado, outros estudos também têm demonstrado que o HPV é capaz de induzir vários mecanismos que resultam na subversão da resposta imune do hospedeiro, como descrito a seguir.

1.6.6 MECANISMOS DE EVASÃO À RESPOSTA IMUNE

A evasão ou capacidade do organismo infeccioso de subverter a resposta imune do hospedeiro pode contribuir substancialmente para a sua seleção natural. Como observado para outros vírus associados à gênese de tumores, o ciclo replicativo do HPV foi primorosamente modelado pela co-evolução com o hospedeiro, de forma que a

infecção pelo HPV, ou mesmo a neoplasia que geralmente se segue a essa infecção, provavelmente não dará ao Sistema Imune a possibilidade de eliminar as células infectadas ou transformadas (revisão em TYRING *et al.*, 2000; TINDLE, 2002; MANICKAM *et al.*, 2007; PATEL *et al.*, 2009).

Diversos trabalhos indicam que alguns importantes fatores minimizam ou previnem a exposição do vírus ao Sistema Imune do hospedeiro, como descrito a seguir:

(1) O ciclo replicativo do HPV está profundamente associado à diferenciação dos queratinócitos. Como descrito previamente, as proteínas precoces são produzidas em queratinócitos não diferenciados da camada basal do epitélio estratificado, enquanto que as proteínas expressas tardiamente, e possivelmente mais imunogênicas, como a L1 e a L2, são produzidas nas células periféricas nas quais os capsídeos virais são formados e liberados na superfície das células epiteliais (TINDLE, 2002; STUBENRAUCH, LAIMINS, 1999).

(2) O HPV não é capaz de infectar e nem de se replicar no interior de APCs localizadas no epitélio; os papilomavírus não lisam os queratinócitos durante a infecção desses. Sendo assim, quase não há oportunidade para que as APCs englobem vírions ou células lisadas e os apresentem às células efectoras do Sistema Imune. Além disso, na infecção pelo HPV não há fase de infecção sanguínea, de forma que o Sistema Imune periférico tem pouca chance de detectar a presença do invasor (revisão em TINDLE, 2002).

(3) As proteínas expressas precocemente (“*early*”) pelo vírus como E1, E2, E6 e E7, localizam-se principalmente no núcleo dos queratinócitos. Pacientes infectadas pelo HPV geralmente induzem uma resposta pobre a essas proteínas, o que indica que tais proteínas são produzidas em quantidades insuficientes ou mesmo não são acessíveis ao reconhecimento imune (revisão em TYRING, 2000; TINDLE, 2002; MANICKMANN *et al.*, 2007; PATEL *et al.*, 2009).

(4) Embora a presença de proteínas expressas tardiamente (“*late*”), especialmente de L1 seja detectável em esfregaços ou amostras de tecidos originadas de pacientes infectadas pelo HPV, somente após meses de infecção há indícios de anticorpos desenvolvidos contra tais proteínas. Esse fato indica que os HPVs foram evolutivamente selecionados para minimizarem os níveis de expressão de proteínas do capsídeo viral ou para adiar a expressão dessas proteínas ao epitélio diferenciado. Assim, os papilomavírus são capazes de evitar a ação das células de Langerhans, as APCs presentes nas camadas epiteliais (JANEWAY *et al.*, 2002; TINDLE., 2002).

1.6.7 O PAPEL DAS CÉLULAS DE LANGERHANS NA PROGRESSÃO DAS LESÕES ESCAMOSAS INTRA-EPITELIAIS

Como mencionado anteriormente, as CLs constituem as células primárias responsáveis pelo reconhecimento e apresentação de antígenos no epitélio escamoso, representando um elemento chave na resposta imune local na defesa da cérvix uterina (HACHISUGA *et al.*, 1989). Com o objetivo de investigar a participação das CLs no controle da infecção pelo HPV e, conseqüentemente, do desenvolvimento da progressão da neoplasia cervical, diversos trabalhos foram direcionados à avaliação da densidade das CLs em amostras controle e histopatologicamente afetadas por graus diversos de Neoplasias Intra-epiteliais Cervicais (FLORES *et al.*, 2005; HAYATI *et al.*, 2007; SANTGOETS *et al.*, 2008).

A utilização de anticorpos direcionados à identificação de moléculas da superfície das células de Langerhans por meio da técnica de imunohistoquímica consiste em estratégia sensível e adequada para a identificação e determinação do número dessas células. Para essa finalidade os anticorpos anti-S-100, anti-Cd1a, anti-Cd83 e anti-Langerina tem sido os principalmente utilizados (FLORES *et al.*, 2005; VALLADEAU *et al.*, 2005; HAYATI *et al.*, 2007; SANTGOETS *et al.*, 2008).

A proteína S-100 é uma proteína ligadora ao cálcio que está presente em uma grande variedade de tecidos e 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 S-100 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.*, 1987; XIE *et al.*, 1990; AL-SALEH *et al.*, 1995; TAKEHARA *et al.*, 1996; ABDOU *et al.*, 1999; CONNOR *et al.*, 1999; UCHIMURA *et al.*, 2004; LEVI *et al.*, 2005; CAMPANER *et al.*, 2007).

Um outro marcador eficiente de células de Langerhans (especialmente das células imaturas) em amostras de tecidos cervicais consiste em uma molécula de superfície, a glicoproteína Cd1a, que pertence à família de moléculas apresentadoras de antígenos não protéicos aos linfócitos T (VAYRINEM *et al.*, 1984; HAWTHORN *et al.*, 1988; HUGHES *et al.*, 1988; MORELLI *et al.*, 1992 e 1993; CONNOR *et al.*, 1999; FLORES *et al.*, 2006; HAYATI *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. (HAYATI *et al.*, 2007; SANTGOETS *et al.*, 2008).

O anticorpo anti-Langerina também já foi utilizado para a análise da densidade de células de Langerhans em biopsias cervicais (KASHIHARA *et al.*, 1986; FLORES *et al.*, 2006) e “folhas epiteliais” (“*epidermal sheets*”) (FLORES *et al.*, 2006) derivadas de pacientes. Estudos realizados por Valladeau e colaboradores (1999 e 2000) demonstraram que a Langerina é uma glicoproteína exclusivamente expressa em células de Langerhans. Além disso, a Langerina consiste em uma lectina tipo C associada à membrana, uma molécula de 40 a 42 KDa com PI de 5.2 a 5.5, expressa não somente na superfície celular, mas também intracelularmente em associação com os grânulos de Birbeck (VALLADEAU *et al.*, 1999 e 2000).

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

Alguns estudos observaram uma redução do número das CLs em amostras cervicais, com significativa associação entre o número dessas células e a severidade (ou progressão) das lesões cervicais, utilizando os anticorpos **anti-S100** (TAY *et al.*, 1987; AL-SALEH *et al.*, 1995; ABDOL *et al.*, 1999; CONNOR *et al.*, 1999; UCHIMURA *et al.*, 2004), **anti-Cd1a** (HAWTHORNE *et al.*, 1988; HUGHES *et al.*, 1988; MORELLI *et al.*, 1992 e 1993; CONNOR *et al.*, 1999; FLORES *et al.*, 2006; HAYATI *et al.*, 2007) e **anti-Langerina** (KASHIHARA *et al.*, 1986; FLORES *et al.*, 2006). Esses resultados são compatíveis com a hipótese, de que uma redução local das CLs poderia ser responsável pela geração de uma resposta imune celular ineficiente, incapaz de deter a progressão das lesões intraepiteliais de baixo grau em direção a lesões invasoras mais severas.

Entretanto, de maneira oposta, outros estudos verificaram um aumento da densidade das CLs em amostras cervicais caracterizadas pela presença de graus distintos de alterações cervicais e amostras controles, utilizando os anticorpos **anti-S100** (CAMPANER *et al.*, 2007) e **anti-Cd1a** (MORELLI *et al.*, 1992 e 1993). Utilizando a técnica de impregnação por ZnI e OsO4 para contagem das CLs em amostras cervicais, Caorsi e colaboradores (1986) também observaram um aumento do número dessas células, quando compararam amostras normais com aquelas apresentando Neoplasias

Cervicais. Esses autores defenderam a hipótese de que o aumento observado das CLs, poderia ser devido a um possível aumento da migração das CLs para o sítio da lesão cervical.

Porém outros estudos observaram dados conflitantes, como o simultâneo aumento e redução das CLs de acordo com o tipo de amostras analisada (verrugas genitais, condilomas ou NICs) (MORRIS *et al.*, 1983; McARDLE *et al.*, 1986) ou de acordo com a técnica empregada (ABDOU *et al.*, 1999). Da mesma forma, um outro estudo que utilizou o anticorpo **anti-Cd1a** para a análise de lesões cervicais HPV positivas em comparação à controles não infectados, não observou nenhuma variação numérica das CL nos dois diferentes grupos estudados (VAYRINEM *et al.*, 1984).

Uma das hipóteses levantadas para os resultados encontrados nos últimos estudos, foi a de que, embora presentes em número normal as CLs poderiam apresentar alterações funcionais e morfológicas. De fato, alterações morfológicas das CLs 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.*, 2000).

Estudos que foram direcionados ao estudo da resposta imune local à infecção pelo HPV, e que analisaram a densidade das células de Langerhans em Lesões HPV positivas (LEIs, condilomas e verrugas genitais) em comparação à Lesões HPV negativas (LEIs) ou mesmo em tecidos cervicais de pacientes controles não infectadas, também diferiram quanto aos resultados encontrados. Embora a grande maioria desses trabalhos tenha verificado uma redução do número das CLs em Lesões HPV positivas (DRIJKONINGEN *et al.*, 1988; VIAC *et al.*, 1990; LEHTINEM *et al.*, 1993; CONNOR *et al.*, 1999; SCOTT *et al.*, 2001; HUBBERT *et al.*, 2005; FLORES *et al.*, 2006) outros trabalhos não verificaram uma alteração significativa da densidade dessas células (AL-SALEH *et al.*, 1995).

Portanto, o importante papel das CLs no controle da infecção local pelo HPV na mucosa cervical e no controle da progressão das Lesões Intraepiteliais Escamosas rumo ao Carcinoma invasor, permanece por ser investigado.

Destaca-se que a maioria dos estudos direcionados à determinação do número de células de Langerhans em amostras cervicais foi baseada na utilização de anticorpos anti-S-100 e anti-Cd1a para a análise imunohistoquímica dessas amostras. Além disso, muitos desses estudos utilizaram apenas um dos anticorpos citados, e naqueles que empregaram a técnica de imunohistoquímica com o uso de dois anticorpos diferentes, a marcação com os dois anticorpos foi realizada em cortes seriados, que foram obtidos

consecutivamente, procedimento esse que não permitiu verificar a colocalização dos dois distintos anticorpos, ou seja, se as mesmas células estavam sendo duplamente consideradas.

Dessa forma, acreditamos que a análise da densidade das células de Langerhans em amostras cervicais por meio da técnica de Imunofluorescência confocal que permite a localização simultânea de dois importantes marcadores expressos por essas células, a molécula de S-100 que consiste em um marcador preferencial de superfície que permite a visualização incontestável das ramificações dendríticas das CLs, e a molécula de Langerina, que corresponde a um potente marcador intracelular específico para as CLs, consistiria em nova e importante estratégia para um melhor entendimento da Resposta Imune local na progressão das Neoplasias cervicais.

2. JUSTIFICATIVA

Evidências epidemiológicas mostram que a infecção persistente, a alta carga viral e a integração do DNA de tipos oncogênicos do vírus do papiloma humano (HPV) no genoma da célula hospedeira, têm um importante papel no desenvolvimento das Lesões Intraepiteliais Cervicais em direção ao carcinoma cervical.

Inúmeros estudos indicam que mulheres imunologicamente comprometidas, como aquelas submetidas à transplantes e mulheres HIV positivas, apresentam (i) um aumento do risco para as Neoplasias Intraepiteliais Cervicais e para o câncer cervical; (ii) uma maior incidência de patologias cervicais mais agressivas; (iii) uma maior taxa de persistência e recidiva das lesões cervicais; (iv) uma maior incidência da infecção por HPV e (v) a infecção por múltiplos tipos de HPV. Todos esses fatores sugerem que a vigilância imune cervical que deve ser estabelecida para o adequado controle das infecções cervicais, depende de uma resposta imune celular eficiente, que depende, por sua vez, de uma adequada identificação de antígenos e eficiente apresentação dos mesmos para as populações linfocitárias efectoras da resposta imune.

Dentro do epitélio escamoso, as células de Langerhans (CLs) correspondem às células primárias responsáveis pelo reconhecimento, transporte e apresentação de antígenos, constituindo-se essas APCs em elementos-chave na defesa imune local da cérvix uterina. As sub-populações de células dendríticas presentes na pele e nas mucosas diferem quanto à expressão de moléculas de superfície, sendo essas diferenças fenotípicas observadas cruciais para as propriedades funcionais dessas células. Dentre os marcadores expressos pelas CLs, destacam-se a molécula de Langerina, de Cd1a, a molécula de E – caderina, a ATPase de membrana e o receptor CCR6.

Destaca-se que embora um grande número de estudos já tenha sido desenvolvido para a determinação do número das células de Langerhans em amostras cervicais normais ou apresentando graus distintos de Lesões Escamosas Intraepiteliais, e que utilizaram a técnica imunohistoquímica clássica para identificação dos marcadores S-100, Cd1a e Langerina, apresentaram resultados controversos quanto à densidade das CL nessas lesões.

Portanto, o importante papel das CLs no controle da infecção local pelo HPV na mucosa cervical e no controle da progressão das Lesões intraepiteliais escamosas rumo

ao Carcinoma invasor permanece por ser melhor investigado, como proposto no desenvolvimento do presente estudo.

Nesse estudo será avaliada a densidade das células de Langerhans em amostras cervicais utilizando-se a técnica de Imunofluorescência Indireta para análise da localização simultânea de dois importantes marcadores expressos por essas células, a molécula de superfície S-100 e um marcador intracelular específico das CLs, a molécula de Langerina. Acreditamos que nosso estudo consistirá em nova e importante estratégia para um melhor entendimento da Resposta Imune local na progressão das Neoplasias cervicais e na presença da infecção pelo HPV.

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar em Lesões Escamosas Intra-epiteliais e invasoras do colo uterino a densidade das células de Langerhans em comparação à presença da infecção pelo Papilomavírus Humano, por meio da contagem de Células de Langerhans em graus distintos de lesões cervicais.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar, em amostras cervicais correspondentes a graus distintos de Neoplasias Intra-epiteliais Cervicais (NIC I, II, III), ao Carcinoma invasor e em amostras controle, o número de células de Langerhans, por meio da técnica de Imunofluorescência e do uso dos anticorpos anti-S100 e anti-Langerina.
- Avaliar, nessas amostras, a presença da infecção pelo HPV por meio da técnica de PCR.
- Avaliar, nas amostras controle e naquelas correspondentes às lesões cervicais, a correlação do número de células de Langerhans em comparação à presença da infecção pelo Papilomavírus Humano.

4.1 POPULAÇÃO ESTUDADA

Neste trabalho foram analisadas amostras cervicais obtidas de pacientes atendidas pelo Serviço de Patologia do Colo da Unidade de Referência Secundária – URS – Sagrada Família, conhecida também como Posto de Atendimento Médico (PAM), Sagrada Família, pertencente à Secretaria de Coordenação Municipal e Gestão Regional – S.C.O.M.G.E.R – Leste, da Secretaria Municipal de Saúde, Prefeitura de Belo Horizonte. Inicialmente foram avaliadas 140 amostras cervicais que apresentavam o seguinte diagnóstico histopatológico: 30 de NICI, 30 de NICII, 30 de NICIII, 30 de CA e 20 amostras controles negativos. Entretanto essas amostras foram submetidas à análise histopatológica por dois médicos patologistas adicionais e sofreram uma reclassificação. Assim, o novo grupo de amostras que foi avaliado no presente estudo ficou reduzido a 68 amostras, apresentando a seguinte classificação histopatológica: 15 apresentavam diagnóstico de NIC I, 15 de NIC II, 15 de NIC III e 15 de Câncer invasor. Oito (8) amostras cervicais provenientes de pacientes não apresentando alterações histopatológicas foram utilizadas como controle negativo. Essas amostras são correspondentes a biópsias ou amostras provenientes de Cirurgia de Alta Frequência (CAF) coletadas pelos médicos ginecologistas do Serviço supracitado para realização de exame histopatológico de rotina. Após a realização do exame histopatológico, tais amostras foram encaminhadas para alguns Laboratórios de Anatomia Patológica de Belo Horizonte que prestam serviço a essa Unidade, entre eles, o Laboratório de Anatomia Patológica Tafuri, localizado em Belo Horizonte, MG e coordenado pelos Dr. Alexandre Tafuri e Dr. Celso Tafuri. As amostras utilizadas no presente estudo se encontravam sob a responsabilidade e guarda do referido Laboratório, que é responsável pela seleção e empréstimo provisório dos blocos para realização da referida pesquisa. Todas as amostras corresponderam à espécimes incluídas em parafina, que foram gentilmente cedidas pelo Dr. Alexandre Tafuri. O empréstimo das amostras de tecidos foi concedido mediante o preenchimento do Termo de Responsabilidade apresentado no Anexo I.

O presente Projeto de Pesquisa foi submetido ao COEP (Comitê em Ética e Pesquisa) da UFMG, se encontrando no momento sob análise, porém tendo recebido uma aprovação preliminar (Anexo I).

No presente estudo foi efetuada uma criteriosa categorização das amostras sob análise. A análise histopatológica das amostras cervicais foi realizada por três patologistas diferentes - Dr. Alexandre Tafuri do Laboratório de Anatomia Patológica Tafuri; Profª Paula Ávila Fernandes, do Departamento de Análises Clínicas, da Faculdade de Farmácia da UFMG; Dr. Marcelo Pascoal, do Departamento de Anatomia Patológica da UFOP. As amostras foram classificadas dentro de um determinado grupo de lesão quando recebiam o mesmo diagnóstico histopatológico por no mínimo dois distintos patologistas.

4.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS: COLETA DAS AMOSTRAS, FIXAÇÃO E PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

A prática da coleta amostral foi realizada sob visão colposcópica (Colposcópio Vasconcelos). Para realização de biópsias utilizou-se a pinça de Gaylor e para a realização das Cirurgias de Alta Frequência (CAFs) utilizou-se o aparelho “Wavetronic 2000”, acoplado ao aspirador de fumaça. Esses procedimentos foram realizados pelos médicos ginecologistas no PAM - Sagrada Família, segundo protocolo do próprio serviço de Patologia do Colo Uterino dessa Instituição. As amostras foram processadas rotineiramente para inclusão em parafina. Inicialmente foi realizada a fixação dos tecidos em formalina a 10%, em seguida, os fragmentos foram submetidos à desidratação gradativa em álcool absoluto, sendo realizada posteriormente, a diafanização em xilol e por último a impregnação e inclusão em parafina (temperatura média de 60° C). O tempo máximo de fixação das amostras anterior ao processamento histopatológico foi de 7 dias.

No presente estudo optamos por limitar a data de obtenção dos blocos que seriam submetidos à análise molecular e à técnica de Imunofluorescência, sendo que foram utilizados blocos obtidos nos anos de 2006 a 2008.

4.3 EXTRAÇÃO DO DNA DAS AMOSTRAS

Para a realização da extração do DNA, foi necessária a obtenção de cortes histológicos em micrótomo (MICROM, HM 335E), realizada no Laboratório de Experimentação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Departamento de Morfologia, ICB, UFMG. Quatro 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 (eppendorf). 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 *et al.*, 1990; SHIMIZU & BURNS *et al.*, 1995). Além disso, no intervalo entre cada amostra foram realizados 2 cortes de um bloco que continha apenas parafina, sendo esses cortes considerados os controles negativos de contaminação cruzada. Para a extração do DNA das amostras parafinadas foi utilizado o protocolo de extração descrito por Wright & Manos (1990), modificado.

Para remoção da parafina, por 2 vezes, os cortes foram imersos em 1 ml xilol, e lentamente agitados em shaker por dois períodos de 1 hora, e após, centrifugados sendo o sobrenadante desprezado. Em seguida os cortes foram lavados, por 2 vezes, com álcool etílico absoluto para remoção da mistura xilol + parafina residual, com consecutiva centrifugação e desprezo do sobrenadante (SND). Foi realizada a secagem do tecido precipitado cobrindo-se os tubos com Parafilm (American N.C). Por último foi realizada a lise do tecido, a 37°C “*overnight*”, com 450µL 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 (lisado) transferido para outro tubo para ser utilizado nas reações de PCR (WRIGHT & MANOS, 1990, modificado).

4.4 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, através dos iniciadores PC03

e PC04 (Saiki *et al.*, 1985), capazes de amplificar um fragmento de 110 pb do gene de β -globina. As condições de preparo da reação e o programa de amplificação utilizado estão descritos nas Tabelas 2 e 3:

TABELA 2- Componentes do Mix de PCR para o Gene da β -globina humano

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

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

TABELA 3- Programa de Amplificação do Gene da 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	

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% por duas horas, em tampão TBE (Tris-Borato-EDTA) 1X, a uma voltagem constante de 100V. As amostras foram aplicadas utilizando-se 5 μ l dos produtos de PCR homogeneizados com 5 μ l de tampão de amostra 2X (TBE 5X / Azul de bromofenol a 0,25% / Xilenocianol a 0,25% / Ficoll 400 a 15%). Após o término da eletroforese, os produtos de interesse foram visualizados nos géis de poliacrilamida após coloração pela prata (SANGUINETTI *et al.*, 1994).

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, íon magnésio, iniciadores e *Taq* DNA polimerase) sem adição de qualquer amostra de DNA.

4.5 DETECÇÃO DA INFECÇÃO POR HPV

4.5.1 Prevalência do HPV

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 na qual são utilizados os primers genéricos MY09 e MY11 (MANOS *et al.*, 1989) numa primeira reação de PCR e os primers GP5 e GP6+ (MOLIJN *et al.*, 2005), internos ao fragmento amplificado na primeira reação, numa segunda reação de PCR (RODA HUSMAN *et al.*, 1995; HUSNJAK *et al.*, 2000; ZEHBE; WILANDER *et al.*, 1996; FUESSEL HAWS *et al.*, 2004). As condições da reação de Nested - PCR estão descritas nas Tabelas 4 e 6.

TABELA 4-Componentes do MIX de PCR para o Fragmento Viral de 450pb

Constituintes	[] 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 (pht, phoneutria)	10X	1X	1,0 μ L
Taq DNA polimerase (pht, phoneutria)	5UI/ μ L	1UI	0,2 μ L
H2O (Mili-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.

As reações de PCR foram realizadas no Termociclador MJR PTC-100 e os programas de amplificação utilizados se encontram descritos nas Tabelas 5 e 7.

TABELA 5 Programa de Amplificação do Fragmento de DNA Viral de 450 pb

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	

TABELA 6 - Componentes do MIX de PCR para amplificação de um fragmento de 150 pb.

Constituintes	[] 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 (pht, phoneutria)	10X	1X	1,0μL
Taq DNA polimerase (pht, phoneutria)	5UI/μL	1UI	0,2□μL
H ₂ O (Mili-Q)	-	-	5,0□μL

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

TABELA 7- Programa de Amplificação do Fragmento de DNA Viral de 150 pb.

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	

Como controle positivo da reação de PCR para o HPV foi utilizado o DNA extraído de células HeLa, que possuem o DNA do HPV 18 integrado ao seu genoma. Como controle negativo da reação de PCR, foi utilizado o branco do MIX da reação.

4.6 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

A expressão das proteínas S-100 e Langerina foi analisada por meio da técnica de Imunofluorescência Indireta. Essa etapa do trabalho foi realizada em colaboração com o Prof. Gregory Thomas Kitten do Laboratório de Desenvolvimento do Coração e Matriz Extracelular do Departamento de Morfologia, ICB, UFMG.

TABELA 8:Especificações dos anticorpos utilizados na técnica de Imunofluorescência Indireta:

Anticorpo	Especificações	Hospedeiro	Marca	Código
<i>Primários</i>	Anticorpo Anti – S-100	Polyclonal Rabbit	Dako	Z0311
	Anticorpo Anti – Langerina	Monoclonal Mouse	Abcam	Ab49730
<i>Secundários</i>	Anticorpo anti-rabbit conjugado com Cy5 (Cy5-conjugated - Affini Pure)	Goat	Jackson Immuno	111-175-144
	Anticorpo anti-mouse conjugado com biotina (Biotin-SP-conjugated – AffiniPure)	Goat	Jackson Immuno	111-065-146
	Estreptoavidina conjugada com Cy2 (Cy2-conjugated Streptavidin)		Jackson Immuno	016-220-084

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

Os cortes de 7 µm dos tecidos foram desparafinizados em 4 banhos com xilol por 10 minutos e reidratados através de uma série graduada de etanol (100-25%). Para aumentar a detecção do antígeno foi realizada a recuperação antigênica onde os cortes foram imersos em solução de TRIS (1,21g/l), EDTA (0,37g/l) 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 PBS (Phosphate - Buffered Saline), BSA (Bovine Serum Albumine) e Tween 20 (0,1%) durante 60 minutos a temperatura ambiente. Os cortes foram então incubados com o anticorpo primário anti-S100 a uma diluição de 1:200, por

60 minutos em temperatura ambiente. Após a lavagem em PBS, os cortes foram incubados por 60 minutos com o anticorpo secundário anti-rabbit conjugado com Cy5 a uma diluição de 1:200 em temperatura ambiente. Realizou-se novamente a lavagem das lâminas em PBS e os cortes passaram por mais uma etapa de bloqueio com PBS (Phosphate-Bufferes Saline), BSA (Bovine Serum Albumine) e Tween 20 (0,1%) durante 60 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente os cortes foram incubados com o segundo anticorpo primário anti-Langerina a uma diluição de 1:400 “*overnight*” à temperatura de 4°C. No dia seguinte, após a lavagem em PBS os cortes foram incubados por 60 minutos com anticorpo anti-mouse marcado com Biotina-SP, a uma diluição de 1:200. Realizou-se novamente a lavagem das lâminas em PBS, e, posteriormente os cortes foram incubados, em uma única solução com o anticorpo conjugado à estreptoavidina e marcado com Cy2 (Cy2-Streptavidin) e 0,5 µL de Iodeto de Propideo para cada 100 µL de solução, por uma hora em temperatura ambiente. Finalmente após lavagem em PBS, a montagem das lâminas foi realizada com o meio de montagem Hydromount (National Diagnostics, Georgia, Atlanta, USA).

Para controle negativo de cada reação, foi feita a substituição do anticorpo primário pela solução de bloqueio (PBS/BSA 2%). Para controle positivo utilizou-se uma amostra de NICII sabidamente positiva para a marcação de Células de Langherans.

4.7 Padronização da Reação de Imunofluorescência para Dupla Marcação dos anticorpos anti-S100 e anti-Langerina

Com o objetivo de padronizarmos a técnica de Imunofluorescência para quantificação das células de Langherans por meio do uso dos anticorpos anti-S-100 e anti-Langerina em amostras cervicais, diversos experimentos foram realizados, dentre eles: (i) curvas de diluição dos anticorpos primários; (ii) tempo de incubação para otimização do uso dos anticorpos primários (anti-S-100 e anti-Langerina); (iii) verificação de possível reação cruzada estabelecida entre os anticorpos primários. Considerando que a maioria dos trabalhos descritos na literatura, utiliza a técnica de Imunohistoquímica (baseada no uso da peroxidase) para análise dos marcadores citados acima, no presente estudo também foi avaliada a (iv) viabilidade do uso da técnica de Imunofluorescência (em comparação à técnica de Imunohistoquímica) para análise das amostras cervicais.

Para a otimização do uso dos anticorpos primários foram testadas as diluições de 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 e 1:1000 e os períodos de incubação de 1 hora, 2 horas, 3 horas e *overnight*, em todos os grupos de lesões.

As etapas de desparafinização, bloqueio, recuperação antigênica, incubação da Biotina, incubação dos anticorpos secundários e de montagem das lâminas foram semelhantes às etapas descritas no tópico anterior.

Para avaliação da área de marcação das células de Langherans pelos anticorpos anti-S-100 e anti-Langerina, inicialmente foi determinada em cada amostra a área de lesão pelos três patologistas que realizaram a análise histopatológica. Quando a amostra continha mais de um local apresentando lesão histopatológica, selecionou-se para o estudo a área com a melhor área representativa a (denominada de “hot spot”). A seguir, efetuou-se a captura de todos os campos dessa lesão, preferencialmente consecutivos. Os campos com possíveis áreas de dobras ou artefatos de descolamento foram excluídos da análise.

As imagens obtidas como resultados da técnica de Imunofluorescência foram capturadas através de microscopia confocal (Zeiss LSM 510 Meta) utilizando-se o programa Carl Zeiss Laser Scanning Microscope LSM 510 Meta (versão 3.2).

4.8 AVALIAÇÃO E INTERPRETAÇÃO DAS MARCAÇÕES DE S100 E LANGERINA.

As medidas de área de expressão e do número de células positivas para os marcadores foram obtidas pelo software KS300. Essa etapa do trabalho foi realizada em colaboração e sob a Orientação do Prof. Marcelo Vidigal Caliari, do Laboratório de Morfometria do Departamento de Patologia Geral, ICB, UFMG.

A imunoreatividade foi avaliada pela (i) área de expressão e (ii) distribuição de células positivas para os marcadores S100 e Langerina. O epitélio lesionado foi visualizado pela objetiva de 40X e foram digitalizadas imagens de toda a extensão da lesão. De cada imagem foi obtida, em escala quantitativa, a área de epitélio, utilizando como padrão, a extensão em micrômetros do epitélio lesionado. Em escala semi - quantitativa, foi analisada a distribuição de células positivas para os marcadores acima relacionados. Para a identificação, seleção e contagem das células de Langherans marcadas por S100 e Langerina, utilizou-se como critério a presença de células marcadas cujo núcleo com prolongamentos 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 medidas da área epitelial e do número de células positivas para os marcadores foram obtidas pelo software KS300 contido no analisador de imagens Carl Zeiss (Oberkochen, Germany).

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente ao acaso. Os dados morfométricos e dos componentes das lesões de colo uterino foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). As médias entre os grupos estudados foram comparadas através do teste Tukey, LSD, e Test T, quando apropriado e a variabilidade foi analisada por meio de análise de variância (ANOVA). Estes testes estatísticos foram realizados utilizando-se o programa *SPSS 12.0 for Windows*. O nível de significância considerado foi de $P < 0,05$.

5.1 Padronização da técnica de Imunofluorescência Indireta para análise das proteínas S100 e Langerina

Para a otimização do uso dos anticorpos primários foram testadas as diluições de 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800 (para o anticorpo anti-S100) e 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 (para anti-Langerina) e os períodos de incubação de 1 hora, 2 horas, 3 horas e “*overnight*”, em uma amostra representativa de cada um dos grupos de lesão. Porém nas Figuras 5, 6 e 7 são apresentados os resultados obtidos pela análise de uma amostra correspondente à Neoplasia Intra-epitelial Cervical grau II.

Tomando-se como base os critérios acima mencionados, considerou-se que os melhores resultados obtidos pela utilização do anticorpo primário S100 nas diluições de 1:100 e 1:200 (Figura 1A e B). Porém ao comparar-se a intensidade de marcação entre as diluições de 1:100 e 1:200, verificou-se que essa diferença era ínfima e que as características morfológicas das células eram preservadas. Sendo assim, optou-se por utilizar o anticorpo anti-S100 na maior diluição de 1:200.

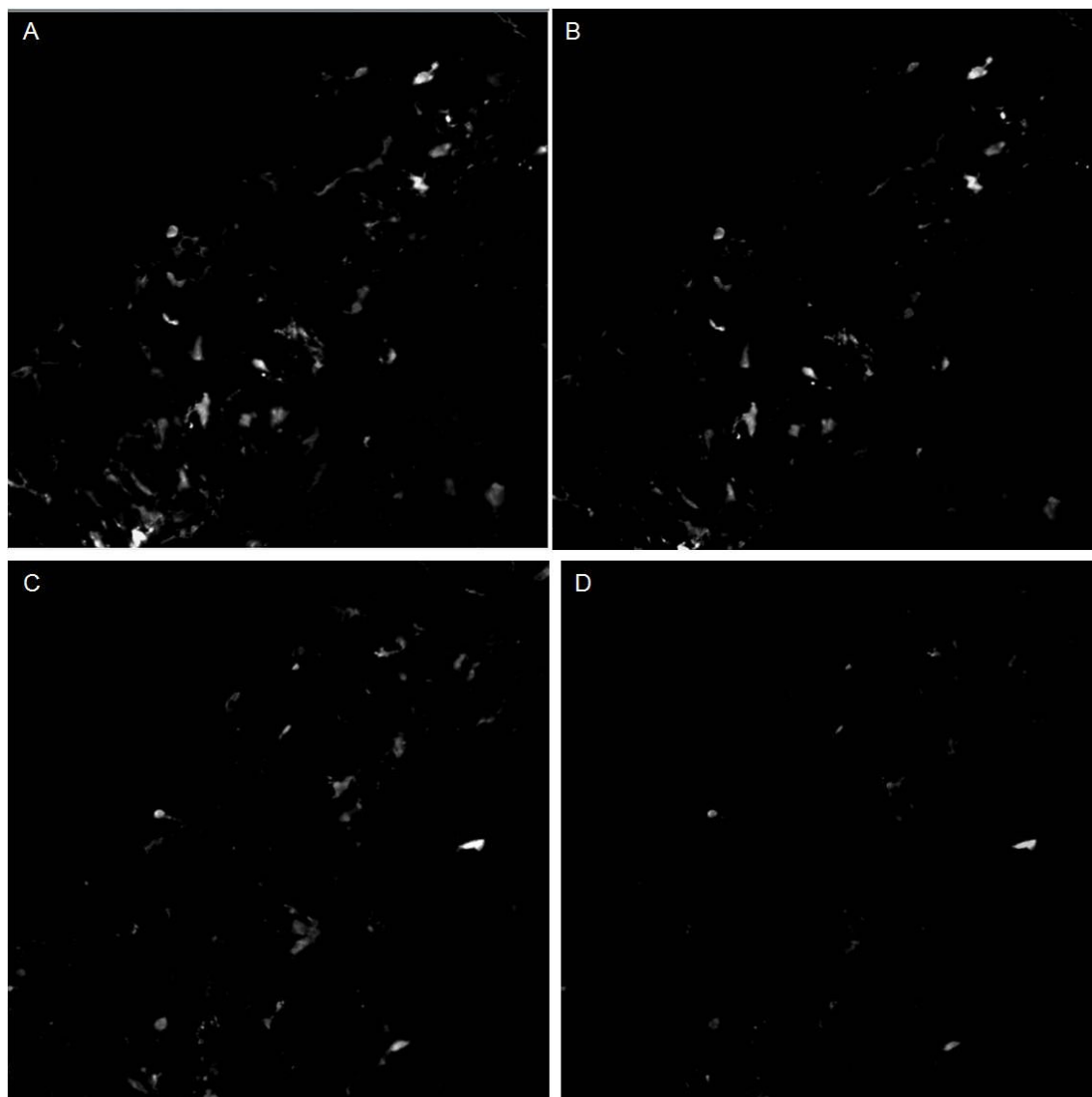


FIGURA 5: Curva de diluição do anticorpo anti-S100, em secções histológicas de amostras cervicais de NIC II, utilizando-se a técnica de Imunofluorescência Indireta. Observa-se maior intensidade de marcação na secção correspondente à diluição de 1:200 do anticorpo anti-S100 (A- 1:100 B- 1:200; C- 1:400; D- 1:800). Aumento de 400X.

Em seguida, foram realizados os testes do tempo de incubação do anticorpo anti-S100 nas amostras cervicais, correspondentes a 1 hora, 2 horas e 3 horas à temperatura ambiente e “*overnight*” a 4° C. Com base nos critérios qualidade e intensidade de marcação, e ainda, levando em consideração todos os critérios anteriormente mencionados, optou-se pela utilização do anticorpo anti-S100 no tempo de incubação de 1 hora à temperatura ambiente (Figura 6A).

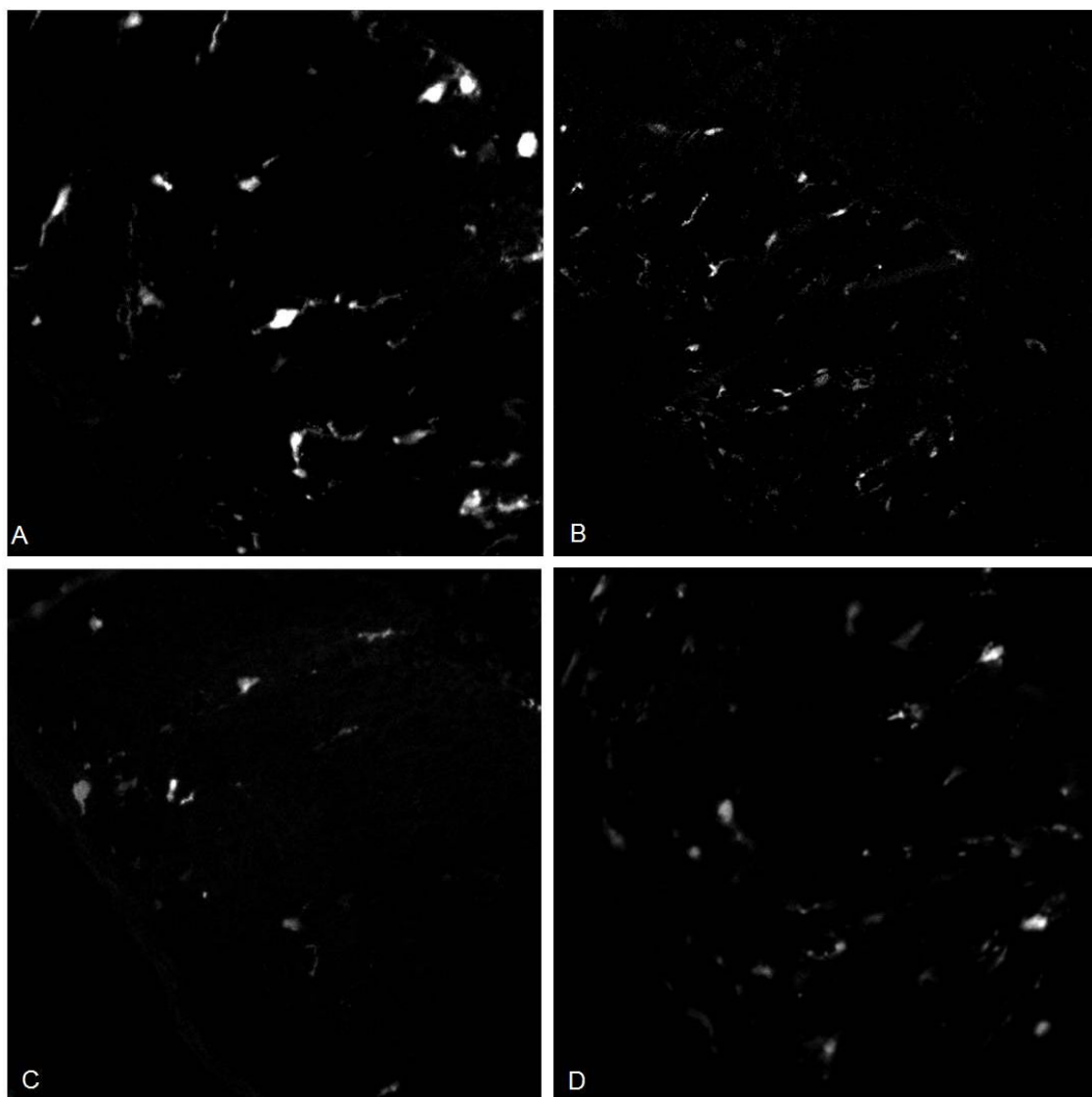


FIGURA 6: Curva do tempo de incubação do anticorpo anti-S100, em secções histológicas de amostras cervicais de NIC II, utilizando-se a técnica de Imunofluorescência Indireta. Observa-se maior intensidade de marcação na secção correspondente ao tempo de incubação de 1 hora do anticorpo anti-S100 (A: 1 hora; B: 2 horas; C: 3 horas; D: overnight). Aumento de 400X.

Também foram realizados os testes de curva de diluição e do tempo de incubação para o anticorpo primário anti-Langerina. Os melhores resultados alcançados para esse anticorpo foram aqueles obtidos pela utilização do anticorpo na diluição de 1:400 (Fig 7C), onde observou-se um aumento na intensidade da marcação das células de Langerhans em comparação com as demais condições avaliadas.

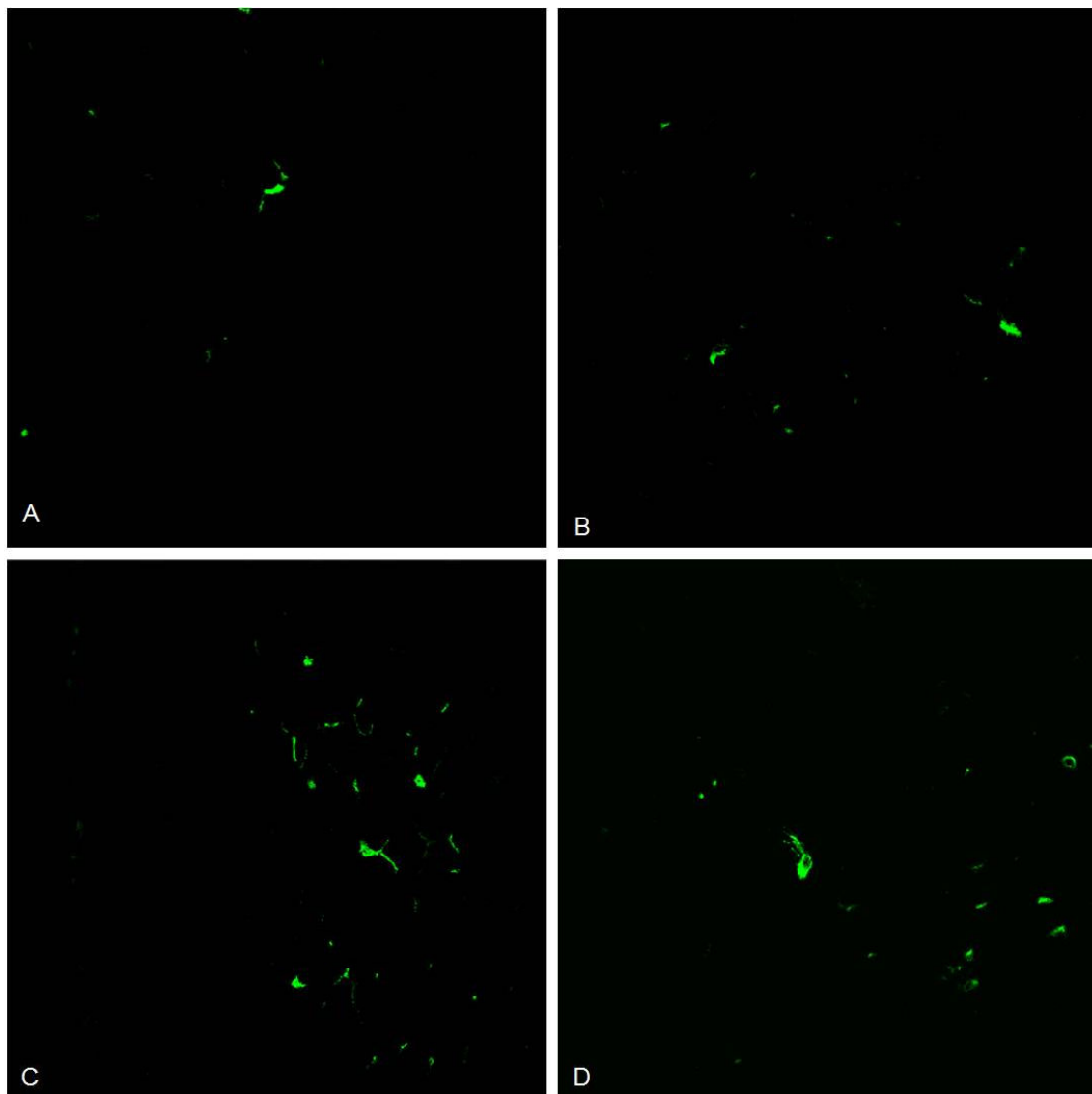


FIGURA 7: Curva de diluição do anticorpo anti-Langerina, em secções histológicas de amostras cervicais de NIC II, utilizando-se a técnica de Imunofluorescência Indireta. Observa-se maior intensidade de marcação na secção correspondente à diluição de 1:400 do anticorpo anti-Langerina (A- 1:100 B- 1:200; C- 1:400; D- 1:800). Aumento de 400X.

Em seguida, foram realizados os testes do tempo de incubação do anticorpo anti-Langerina nas amostras cervicais, correspondentes a 1 hora, 2 horas e 3 horas à temperatura ambiente e “*overnight*” a 4° C (Figura 8). Com base nos critérios qualidade e intensidade de marcação, e ainda, levando em consideração todos os critérios já mencionados, optou-se pela utilização do anticorpo anti-Langerina no tempo de incubação overnight à temperatura de 4°C.

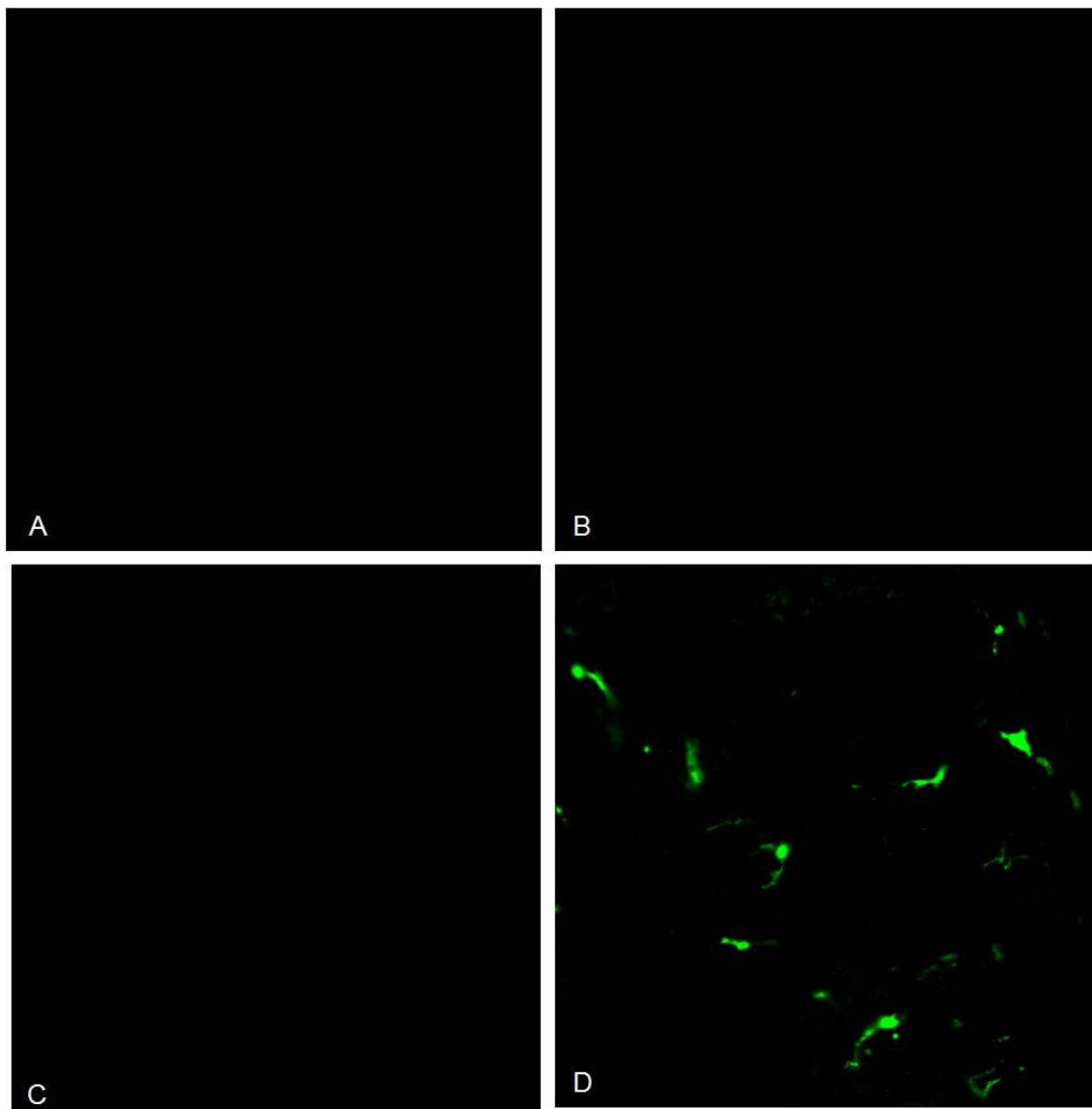


Figura 8: Curva do tempo de incubação do anticorpo anti-Langerina, em amostras cervicais de NIC II, utilizando-se a técnica de Imunofluorescência Indireta. Observa-se que só houve marcação na secção correspondente ao tempo de incubação overnight do anticorpo anti-Langerina (A: 1 hora; B: 2 horas; C: 3 horas; D: overnight). Aumento de 400X.

Testes de padronização também foram realizados para o uso dos anticorpos secundários. A utilização dos anticorpos diluídos a 1:200 durante o período de incubação de 1 hora à temperatura ambiente, mostraram os melhores resultados para ambos anticorpos (dados não mostrados).

Para verificar-se a existência de uma possível reação inespecífica desenvolvida pelos anticorpos secundários, realizou-se um experimento no qual os anticorpos primários (anti-S100 e anti-Langerina) foram substituídos pela solução de bloqueio (PBS/BSA 2%). Destaca-se que nenhuma marcação inespecífica foi observada na Figura 9C, F e I. Adotou-se esse procedimento como o controle negativo da reação, de forma que em cada experimento realizado, uma lâmina de NIC II (amostra 29, a mesma utilizada nos experimentos de padronização do uso dos anticorpos) foi introduzida como controle negativo da reação na qual o anticorpo primário foi substituído como descrito acima.

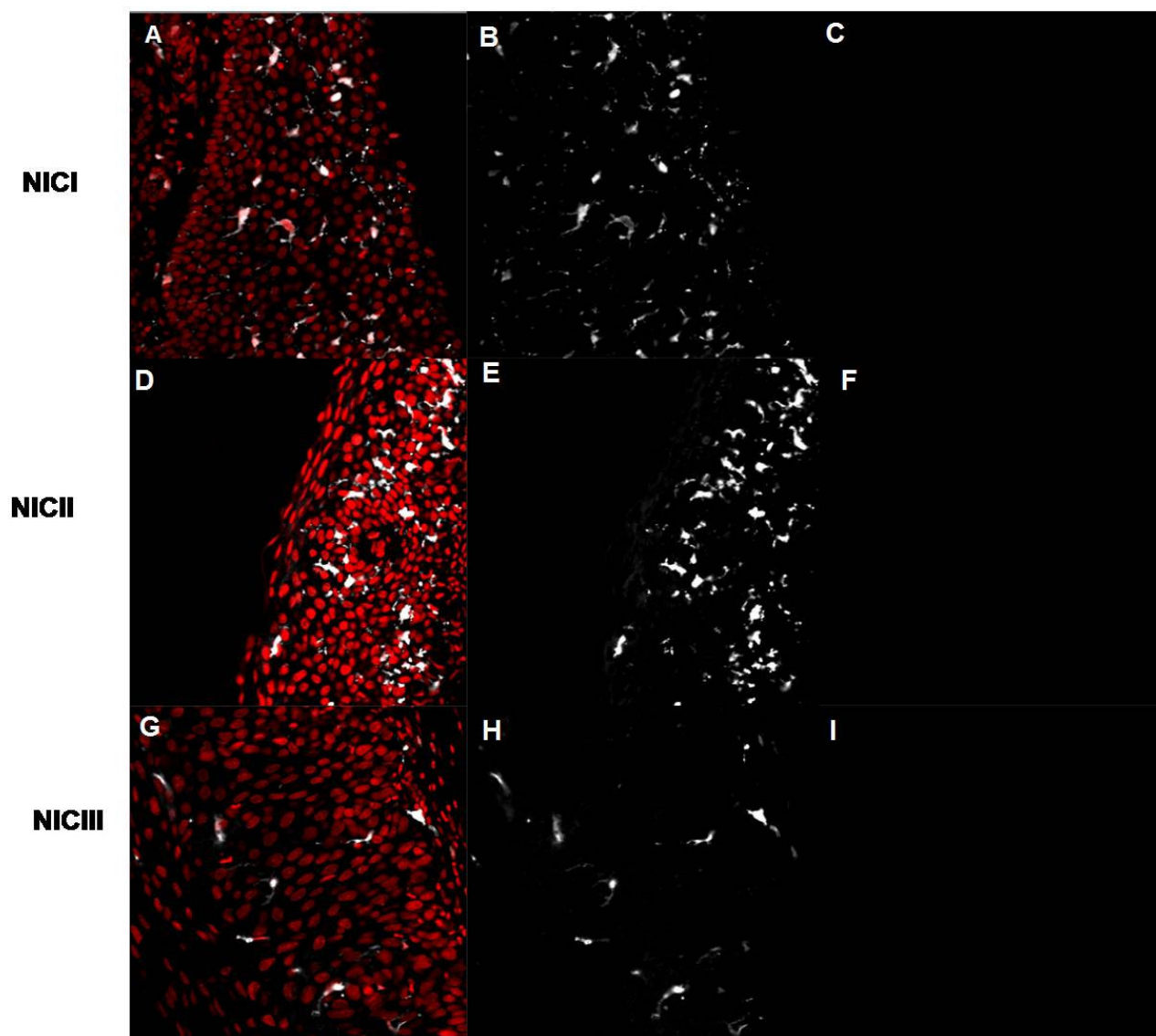


FIGURA 9: Teste de possível reação inespecífica estabelecida pelos anticorpos secundários, pela técnica de Imunofluorescência Indireta. Secções de amostras cervicais correspondentes a NIC I (A-C), a NIC II (D-F) e a NIC III (G-I). Marcação nuclear por Iodeto de propídeo (vermelho); co-localização com o anticorpo primário S100 (branco) mais anticorpo secundário. Em B, E, H utilizou-se os anticorpos primário e secundário. Em C, F, I utilizou-se só o anticorpo secundário, com substituição do anticorpo primário por solução de PBS/BSA 2%. Aumento: 400X.

Após a etapa de padronização da técnica de Imunofluorescência Indireta, foi de nosso interesse avaliar a viabilidade da mesma para a análise das amostras cervicais, uma vez que a maioria dos trabalhos descritos na literatura utiliza a técnica de Imunohistoquímica (com a marcação pela peroxidase) para análise da expressão de S100 e Langerina em amostras cervicais. Com esse objetivo, foi realizada a comparação

da marcação obtida pelo uso dos anticorpos anti-S100 e anti-Langerina utilizando-se a técnica de Imunohistoquímica com a marcação obtida com os mesmos anticorpos por meio do uso da técnica de Imunofluorescência Indireta (Figura 10). Observa-se que houve marcação das células de Langerhans pelo uso dos anticorpos anti-S100 e anti-Langerina pela utilização de ambas as técnicas. Considerou-se, porém, que a reatividade, o grau de intensidade de marcação e a visualização da morfologia das células de Langerhans obtidos pelo uso da técnica de Imunofluorescência Indireta foram superiores (Figura 10 B e D).

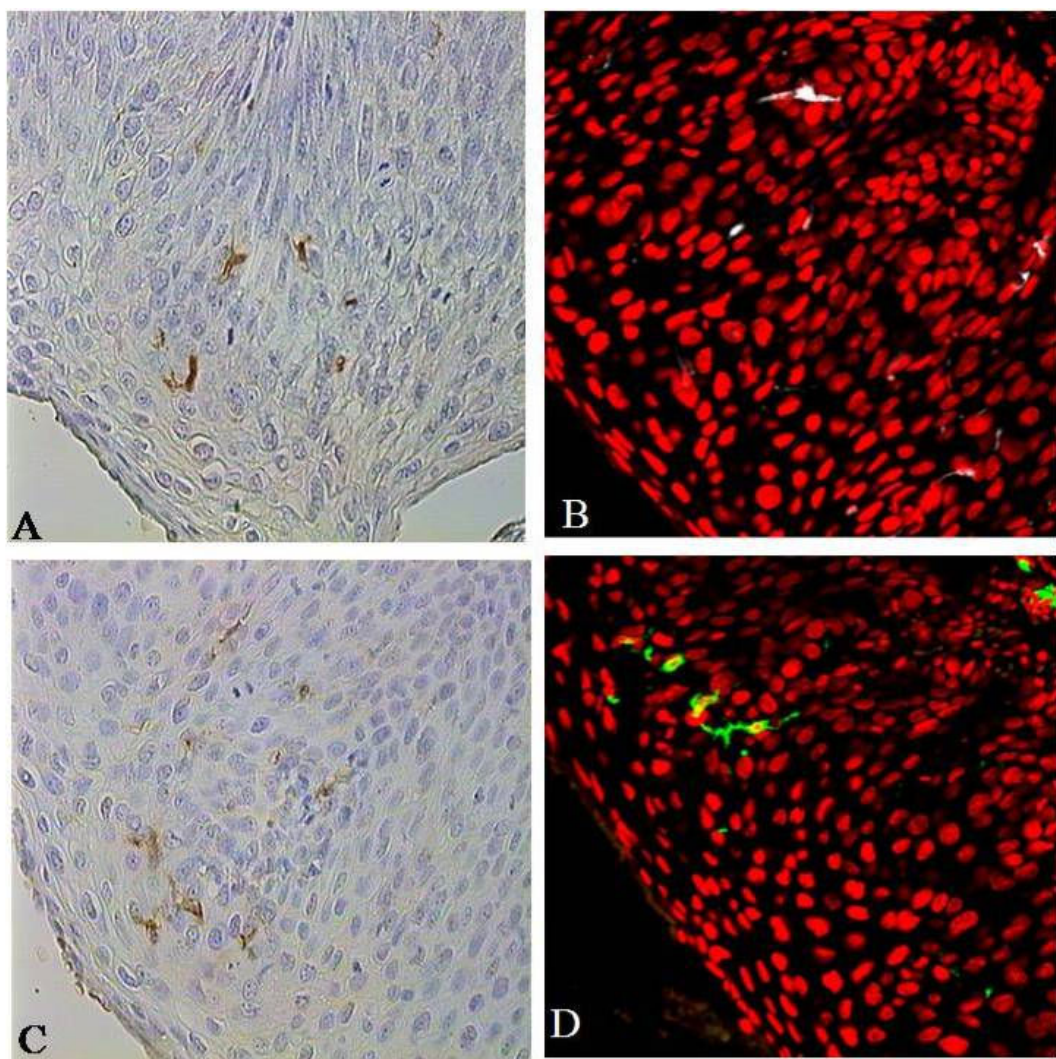


FIGURA 10: Expressão das proteínas S100 e Langerina em secções histológicas de amostras de tecidos cervicais utilizando as técnicas de Imunohistoquímica (marcação pela Peroxidase) e Imunofluorescência Indireta. Em A e B utilizou-se o anticorpo anti-S100 e em C e D o anticorpo anti-Langerina. Aumento de 400X.

Após a realização desse estudo comparativo, alcançou-se a validação do uso da técnica de Imunofluorescência para a análise das amostras do presente estudo. Da mesma forma, verificou-se uma vantagem na utilização da Imunofluorescência em relação à técnica de Imunohistoquímica, uma vez que foi observada uma redução no tempo necessário à realização dos experimentos, além da possibilidade de realização da dupla marcação em uma mesma lâmina com dois distintos anticorpos e, assim, verificar-se a co-expressão das duas diferentes proteínas.

5.2 Expressão das proteínas S100 e Langerina em Lesões Intra-epiteliais Cervicais

Um total de 68 amostras cervicais (15 amostras de cada grupo de lesão e 8 amostras controle negativos) foi analisado quanto à imuno - reatividade dos marcadores S100 e Langerina (Figuras 11 a 14).

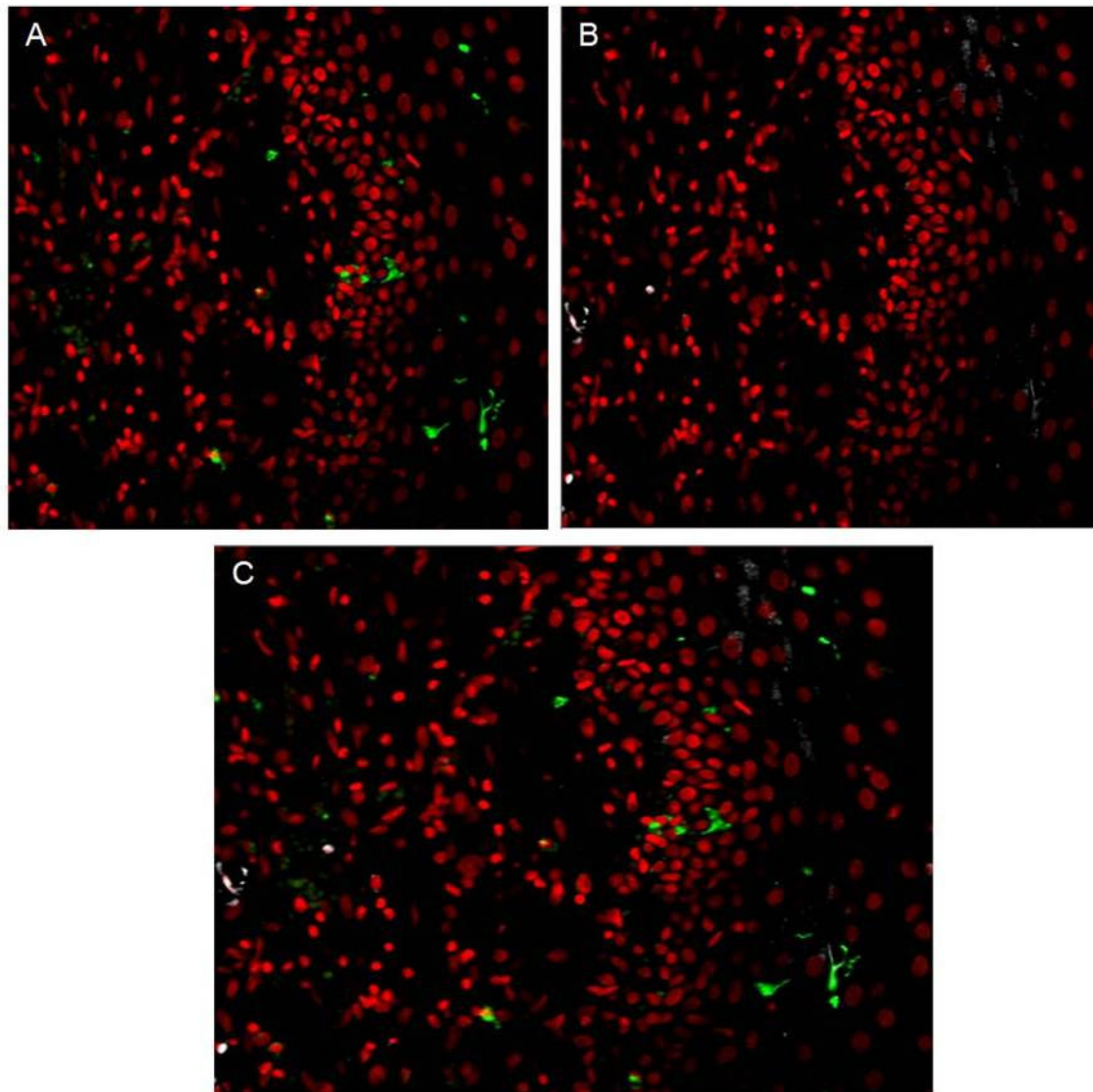


FIGURA 11: Marcação dos anticorpos anti- S100 e anti-Langerina em secções histológicas de amostras de NIC I, utilizando a técnica de Imunofluorescência Indireta. Em A: expressão do anticorpo anti-Langerina; B: expressão do anticorpo anti-S100 e C: co-localização dos anticorpos anti-S100 (branco) e anti-Langerina (verde). Os núcleos foram corados por Iodeto de Propídeo. A letra C foi ampliada para melhor visualização. Aumento de 400X.

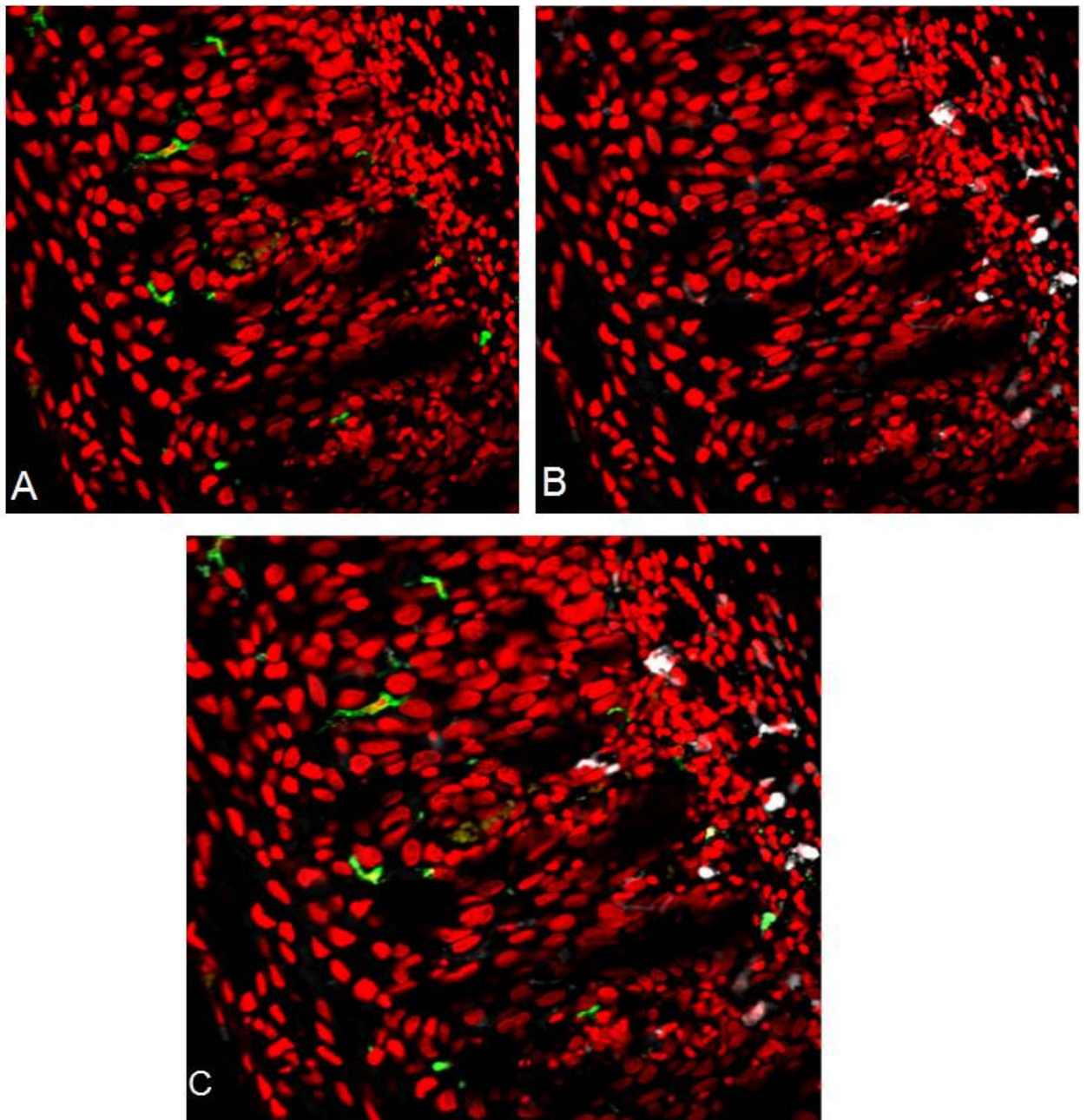


FIGURA 12: Marcação dos anticorpos anti- S100 e anti-Langerina em secções histológicas de amostras de NIC II, utilizando a técnica de Imunofluorescência **Indireta**. Em A: expressão do anticorpo anti-Langerina; B: expressão do anticorpo anti-S100 e C: co-localização dos anticorpos anti-S100 (branco) e anti-Langerina (verde). Os núcleos foram corados por Iodeto de Propídeo. A letra C foi ampliada para melhor visualização. Aumento de 400X.

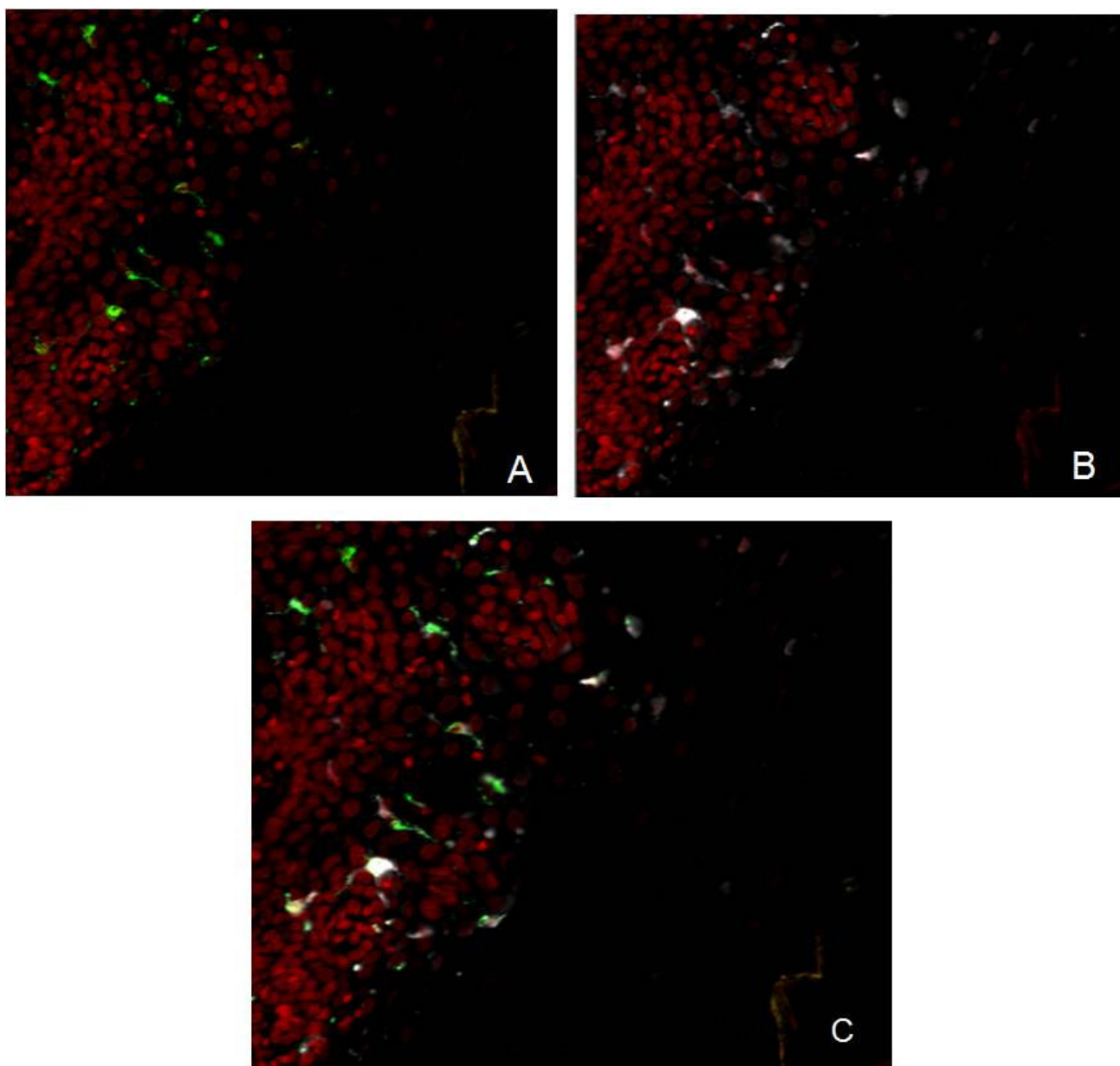


FIGURA 13: Marcação dos anticorpos anti- S100 e anti-Langerina em secções histológicas de amostras de NIC III, utilizando a técnica de Imunofluorescência Indireta. Em A: expressão do anticorpo anti-Langerina; B: expressão do anticorpo anti-S100 e C: co-localização dos anticorpos anti-S100 (branco) e anti-Langerina (verde). Os núcleos foram corados por Iodeto de Propídeo. A letra C foi ampliada para melhor visualização. Aumento de 400X.

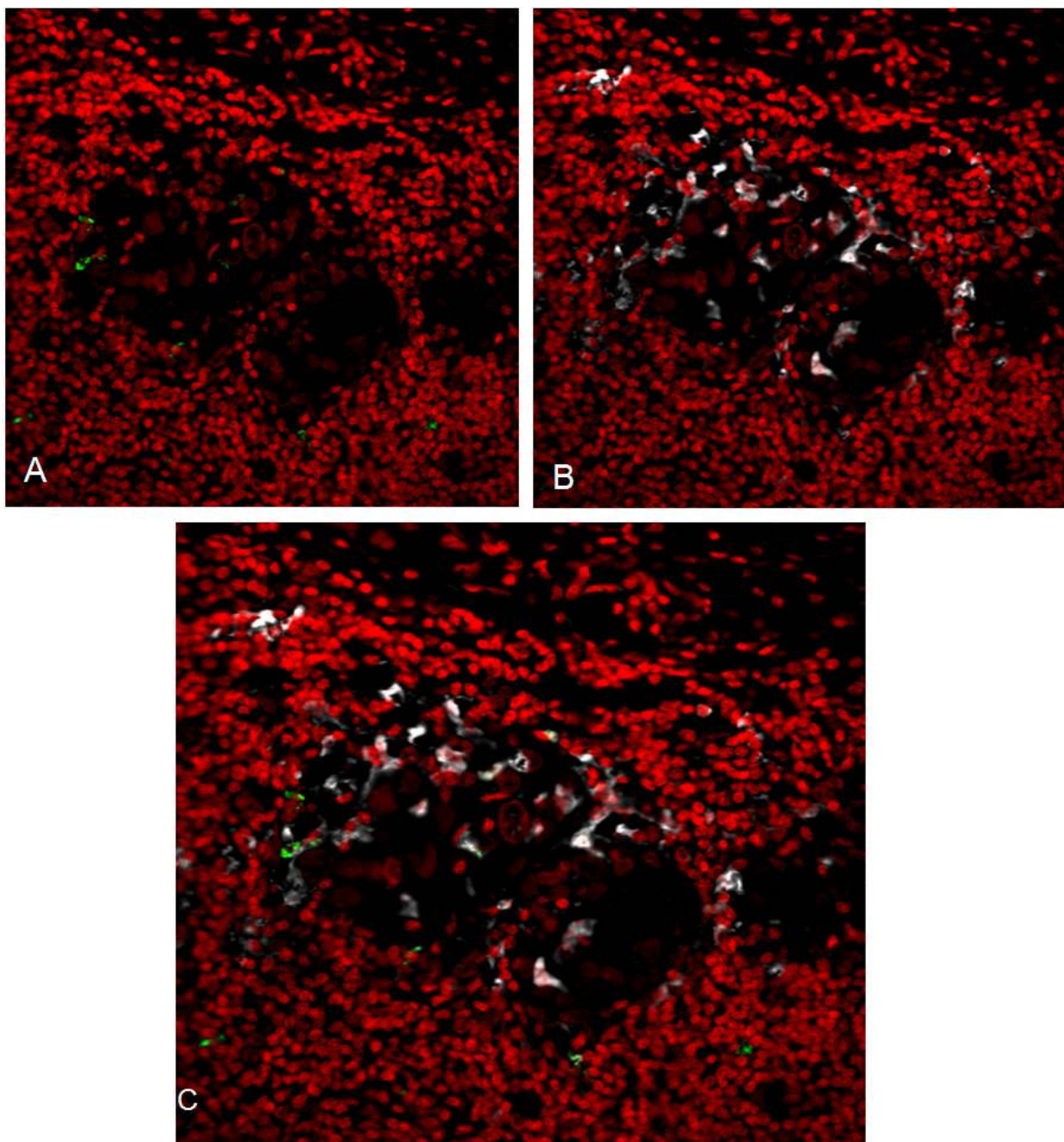


FIGURA 14: Marcação dos anticorpos anti- S100 e anti-Langerina em secções histológicas de amostras de câncer cervical, utilizando a técnica de **Imunofluorescência Indireta**. Em A: expressão do anticorpo anti-Langerina; B: expressão do anticorpo anti-S100 e C: co-localização dos anticorpos anti-S100 (branco) e anti-Langerina (verde). Os núcleos foram corados por Iodeto de Propídeo. A letra C foi ampliada para melhor visualização. Aumento de 400X.

5.3 Análise estatística dos dados

Após a captura das imagens por microscopia confocal e posterior análise morfométrica das mesmas por meio do software KS, as médias entre os grupos estudados foram comparadas através do teste Tukey, LSD, e Test T, quando apropriado e a variabilidade foi analisada por meio de análise de variância (ANOVA). Estes testes estatísticos foram realizados utilizando-se o programa *SPSS 12.0 for Windows*, sendo obtidos os resultados descritos a seguir. Ao efetuarmos a comparação do número médio de células de Langerhans (CLs) marcadas pelo anticorpo anti-S100 em cada grupo de lesão cervical (NICI, NICII, NICIII e Ca) verificou-se que houve uma diminuição no número dessas células entre os grupos NICI, NICII e NICIII. Porém observou-se um aumento do número médio das CLs do grupo de Câncer em relação aos demais grupos (Tabela 9).

Quando o grupo controle foi incluído na análise, observou-se uma redução do número médio das CLs em cada grupo de lesão (NICI, NICII e NICIII) em relação ao controle. Contudo, não foi observada uma diminuição entre o número médio de CLs entre o grupo das amostras de Câncer e controle (Tabela 9). Entretanto esses dados não foram considerados estatisticamente significativos.

Tabela 9 - Expressão de S-100 em Lesões cervicais e controles*.

Grupos	S100
Grupo 0- Controles	3,8
Desvio Padrão	4,2
Grupo 1- NICI	2,6
Desvio Padrão	3,4
Grupo 2- NICII	2,3
Desvio Padrão	2,4
Grupo 3- NICIII	1,9
Desvio Padrão	1,5
Grupo 4- Câncer	3,9
Desvio Padrão	3,3

*número médio de células de Langerhans marcadas pelo anticorpo anti-S100 nos diferentes grupos de lesão e nas amostras controles.

Ao realizar-se a comparação entre o número médio das células de Langerhans marcadas pelo anticorpo anti-Langerina obtido entre os diferentes grupos de

lesão, observou-se que houve uma diminuição no número médio dessas células de acordo com a progressão dessas lesões, com exceção do número de células Langerina-positivas no grupo das amostras de Câncer, que foi semelhante ao número de CLs apresentado nas amostras de NIC I (Tabela 10). Ao comparar-se o número médio das CLs obtido no grupo controle com o número médio obtido nos demais grupos portadores de lesão, verificou-se que houve uma redução significativa no número de células de Langerhans entre as amostras controle e os grupos com lesão, principalmente entre os grupos de NIC II e III. Entretanto esses resultados não foram considerados estatisticamente significativos.

Tabela 10 - Expressão de Langerina em Lesões cervicais e controles*.

Grupos	Langerina
Grupo 0- Controles	3,9
Desvio Padrão	7,2
Grupo 1- NICI	1,1
Desvio Padrão	2,5
Grupo 2-NICII	0,7
Desvio Padrão	0,9
Grupo 3-NICIII	0,8
Desvio Padrão	1,0
Grupo 4- Câncer	1,2
Desvio Padrão	1,2

*número médio de células de Langerhans marcadas pelo anticorpo anti-Langerina nos diferentes grupos de lesão e nas amostras controles.

O presente estudo é o primeiro a realizar a co-localização da expressão das moléculas de S100 e Langerina em células de Langerhans por meio da técnica de Imunofluorescência Indireta e Microscopia confocal a laser. Ao comparar-se a expressão das duas moléculas nas CLs provenientes das amostras controles e das lesões cervicais, observou-se um número maior de células de Langerhans expressando ambas as moléculas S100 e Langerina nas amostras controle do que nas amostras apresentando lesões cervicais. Além disso, nota-se que não houve diferença na expressão das duas moléculas entre os diferentes grupos portadores de lesão. Salienta-se que os dados não foram estatisticamente significativos (Tabela 11).

Tabela 11 – Co-localização da Expressão dos anticorpos anti-S100 e anti-Langerina em Lesões cervicais e controles*.

Grupos	Colocalizações
Grupo 0- Controles	2,4
Desvio Padrão	4.4
Grupo 1- NICI	0,6
Desvio Padrão	1.9
Grupo 2- NICII	0.6
Desvio Padrão	0.8
Grupo 3- NICIII	0.5
Desvio Padrão	0.7
Grupo 4- Câncer	0.6
Desvio Padrão	0.6

*número médio de células de Langerhans duplamente marcadas pelos anticorpos anti-S100 e anti-Langerina nos diferentes grupos de lesão e nas amostras controles.

5.4 Avaliação da Infecção pelo HPV em Lesões Intra-epiteliais Cervicais

5.4.1 Análise da integridade do DNA extraído das amostras cervicais

No presente estudo, verificou-se a presença da infecção pelo HPV por meio da técnica de PCR em todas as amostras de NIC I, II, III e amostras de câncer cervical. Como controle da integridade do DNA obtido das amostras após extração, foi avaliada a amplificação do gene de beta-globina humana, por meio dos iniciadores PC03 e PC04, capazes de amplificar um fragmento de 110 pb do gene de β -globina.

A Figura 15 ilustra os produtos obtidos pela reação de PCR do fragmento de 110 pb do gene de β - globina humano. Observa-se a presença de um fragmento de aproximadamente 110 pb nas canaletas correspondentes às amostras que apresentaram amplificação positiva do gene de β - globina humano.

A análise das 60 amostras, quanto à integridade do DNA obtido demonstrou que apenas uma amostra (1,66%) foi β - globina negativa e 59 (98,33%) apresentaram amplificação positiva para β – globina.

O resultado encontrado de amplificação positiva do gene da β - globina humano de 98,33% das amostras diverge do resultado ideal que seria a amplificação de 100%

das amostras analisadas. Porém, uma vez que um dos objetivos do presente estudo foi a identificação de amostras positivas para o DNA viral, tentou-se a amplificação do fragmento do genoma viral em todas as 60 amostras.

5.4.2 Prevalência do HPV nas Amostras Cervicais Analisadas

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, no presente estudo utilizou-se a técnica de Nested - PCR na qual foram utilizados os iniciadores genéricos MY09 e MY11 em uma primeira reação de PCR e os iniciadores GP5 e GP6+, internos ao fragmento amplificado na primeira reação, numa segunda reação de PCR.

A Figura 15 ilustra os produtos obtidos pela reação de PCR do fragmento de 150 pb do genoma viral obtidos pela utilização dos iniciadores GP5 / GP6+. Observa-se a presença de um fragmento de aproximadamente 150 pb nas canaletas correspondentes às amostras que apresentaram amplificação positiva.

Em relação à amplificação do fragmento viral de 150 pb, utilizando-se os iniciadores GP5 / GP6+ (Figura 13, canaletas 8 a 10), no grupo das amostras classificadas como NIC I, 9 (53,3%) foram positivas para a amplificação do gene viral. No grupo de NIC II, 10 (66,6%) amostras apresentaram o DNA do HPV. Nas amostras de NIC III, 9 (60%) amostras foram positivas para o HPV, enquanto que ao analisar as amostras de Ca verificou-se que apenas uma amostra (6,66%) foi negativa para o DNA do HPV sendo que 14 (93,33%) foram positivas (Tabela 12).

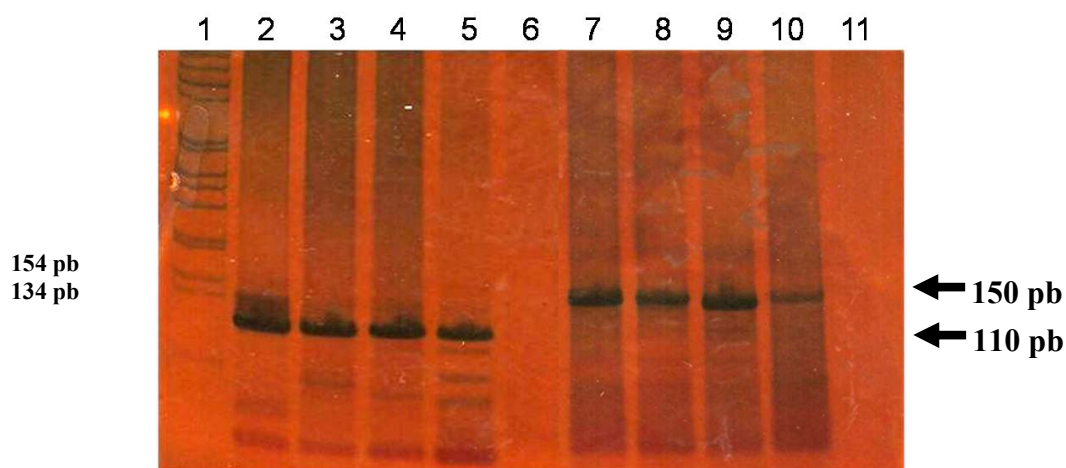


Figura 15: Gel representativo da amplificação do fragmento de 110 pb do gene de β -globina humano e do fragmento viral de 150 pb. Canaleta 1: Padrão de Peso Molecular 1Kb DNA Ladder (Invitrogen); canaleta 2: controle positivo da reação (amostra de DNA extraída de sangue); canaletas 3 a 5: produtos de PCR obtidos das amostras positivas para o gene de β -globina humano; canaleta 6: controle negativo da reação (componentes de PCR sem DNA adicionado); canaleta 7: controle positivo da reação (DNA extraído de células HeLa); canaletas 8 a 10: produtos de PCR obtidos das amostras que apresentaram amplificação positiva com os iniciadores GP5 / GP6+; canaleta 11: controle negativo da reação (componentes de PCR sem DNA adicionado).

Tabela 12 – Resultado da Amplificação dos fragmentos do Gene de β globina humana e do genoma viral nas amostras cervicais portadoras de Lesões Intraepiteliais.

NIC I	PC03/PC04	GP5/GP6+	NIC II	PC03/PC04	GP5/GP6+	NIC III	PC03/PC04	GP5/GP6+	Ca	PC03/PC04	GP5/GP6+
1	+	-	1	+	+	1	+	+	1	+	+
2	+	-	2	+	+	2	+	-	2	+	+
3	+	-	3	+	-	3	+	+	3	+	+
4	+	+	4	+	-	4	+	+	4	+	+
5	+	+	5	+	-	5	+	+	5	+	+
6	+	-	6	+	-	6	+	-	6	+	+
7	+	+	7	+	+	7	+	-	7	+	-
8	+	-	8	+	+	8	+	+	8	+	+
9	+	-	9	+	+	9	+	-	9	+	+
10	+	+	10	+	-	10	+	+	10	+	+
11	+	+	11	+	+	11	+	-	11	+	+
12	+	+	12	+	+	12	-	-	12	+	+
13	+	+	13	+	+	13	+	+	13	+	+
14	+	+	14	+	+	14	+	+	14	+	+
15	+	+	15	+	+	15	+	+	15	+	+

NIC - Neoplasia Intraepitelial Cervical; + amostras positivas; - amostras negativas.

Ao avaliar-se a correlação entre o número das células de Langerhans com a presença ou ausência da infecção pelo HPV verificou-se um aumento do número dessas células marcadas pelo anticorpo S100 em relação à presença do DNA de HPV, no total de amostras analisadas por esse anticorpo. Porém esse aumento não foi observado entre a população de CL marcadas pelo anticorpo anti-Langerina (Tabela 13). Esses resultados não foram considerados estatisticamente significativos.

Tabela 13 - Associação entre o número médio de CL marcadas pelos anticorpos anti-S100 e anti-Langerina positivas ou negativas ao DNA de HPV.

Amostras NIC I				Amostras NIC II			
HPV	S100	Langerina	Colocalizações	HPV	S100	Langerina	Colocalizações
Positivas	3.0	1.4	1.0	Positivas	2.6	0.7	0.6
Desvio Padrão	4.4	3.3	2.5	Desvio Padrão	2.9	0.9	0.8
Negativas	2.1	0.6	0.2	Negativas	1.8	0.7	0.6
Desvio Padrão	1.8	0.6	0.2	Desvio Padrão	0.5	0.9	0.9
Amostras NIC III				Amostras de Câncer			
HPV	S100	Langerina	Colocalizações	HPV	S100	Langerina	Colocalizações
Positivas	2.1	0.9	0.6	Positivas	4.0	1.1	0.6
Desvio Padrão	1.9	1.2	0.8	Desvio Padrão	3.4	1.2	0.6
Negativas	1.7	0.5	0.4	Negativas	1.5	1.9	0.7
Desvio Padrão	1.0	0.8	0.7	Desvio Padrão	0.0	0.0	0.0

6.1 O Papel das Células de Langerhans na Progressão das LEIs e na Resposta Imune Local à Infecção pelo HPV

As células de Langerhans são células dendríticas que constituem um sistema especializado de células apresentadoras de antígeno, que funcionam como “sentinelas” do sistema imune e que sob diversos estímulos são induzidas a migrarem para tecidos linfóides.

A migração das CLs está sob o controle de moléculas de adesão, citocinas e quimiocinas, expressas por queratinócitos e pelas próprias CLs. Essa migração está associada com a diminuição da expressão (“*down – regulation*”) na membrana de E-caderina, molécula de adesão expressa tanto por queratinócitos quanto pelas CLs, que apresenta entre outras, a função de retenção das CLs na matriz (BORKOWSKI *et al.*, 2005). Dentre as citocinas envolvidas na migração celular destacam-se a IL-1 α e o TNF α , principalmente produzidos por queratinócitos, e a IL-1 β , produzida pelas CLs, que promovem a migração dessas células induzindo a diminuição da expressão de E-caderina. Por outro lado, a IL-10 produzida por queratinócitos, promove a redução da migração das CLs por meio do aumento da expressão da molécula de E-caderina (SCOTT *et al.*, 2001). A quimiocina MIP3 α /CCL20 secretada por queratinócitos parece apresentar a função de recrutamento das CLs através do receptor CCR6 o qual é altamente expresso nas CLs imaturas. De fato, o processo de maturação das CLs está associado à troca do receptor CCR6 para CCR7 permitindo a migração das CLs do epitélio para os linfonodos (CAUX *et al.*, 2002).

A função de captura, de transporte de antígenos para os linfonodos locais e apresentação desses às células T “*naive*” exercida pelas CLs foi demonstrada ser essencial para iniciação da resposta imune adaptativa contra antígenos virais, especialmente anti - HPV (SCOTT *et al.*, 2001; MATTHEWS *et al.*, 2003).

Em queratinócitos não transformados infectados pelo HPV, a imunidade inata é induzida a eliminar o patógeno invasor através da sensibilização à presença das proteínas sintetizadas pelo HPV por CLs residentes no epitélio, macrófagos e outras células da resposta imune. Uma vez que a infecção pelo HPV escapa do patrulhamento

exercido pela imunidade inata, a imunidade celular (ou adaptativa) é acionada para eliminar queratinócitos da cérvice uterina infectados pelo HPV por meio da resposta imune desenvolvida por CDs nos órgãos linfóides regionais, e pelas CLs no epitélio cervical (LEE *et al.*, 2006). Assim, tanto as CLs quanto as CDs estão envolvidas no controle da infecção pelo HPV através de ambas as respostas imunes, local e sistêmica (MANICKAM *et al.*, 2007).

Vários estudos têm reconhecido o importante papel das células de Langerhans no controle de doenças virais com manifestações cutâneas, incluindo a infecção pelo HPV e neoplasias associadas.

Considerando os estudos que analisaram a densidade de CLs de acordo com o grau de progressão das LEIs, muitos estudos observaram uma redução do número das CL em amostras cervicais, com significativa associação entre o número dessas células e a severidade (ou progressão) das lesões cervicais, utilizando os anticorpos anti-S100 (TAY *et al.*, 1987; XU *et al.*, 1990; AL-SALEH *et al.*, 1995; ABDOU *et al.*, 1999; CONNOR *et al.*, 1999; UCHIMURA *et al.*, 2004), anti-CD1a (HAWTHORNE *et al.*, 1988; HUGHES *et al.*, 1988; MORELLI *et al.*, 1992 e 1993; CONNOR *et al.*, 1999; FLORES *et al.*, 2006; HAYATI *et al.*, 2007) e anti-Langerina (KASHIHARA *et al.*, 1986; FLORES *et al.*, 2006). Destaca-se que os resultados obtidos no presente estudo, foram concordantes com os trabalhos anteriores.

Ao considerar-se o número das CLs em lesões cervicais de acordo com a presença da infecção pelo HPV, verificou-se em um número significativo de artigos que nas lesões induzidas por HPV as CLs estariam quantitativamente reduzidas ou funcionalmente deficientes, o que poderia contribuir para a persistência da infecção por esse vírus (revisão em MANICKAM *et al.*, 2007). De fato, uma redução das células de Langerhans foi observada em infecção genital pelo HPV, condilomas ou lesão intraepitelial escamosa (MORELLI *et al.*, 1994; MOSCICKI *et al.*, 2000).

Uma das hipóteses que foram postuladas para explicar a redução do número das células de Langerhans na epiderme de tecidos infectados pelo HPV, foi a de que essa redução representaria simplesmente a migração dessas células carregando antígenos da epiderme para os linfonodos, para apresentá-los às células T primárias. Certamente existe a possibilidade de que a redução das células de Langerhans quer pela migração normal quer por algum mecanismo ainda não identificado, poderia contribuir para prejudicar a imunidade local. Alguns autores sugerem que a depleção intra-epitelial das células de Langerhans, associada à infecção pelo HPV, talvez, juntamente com outras

imunodeficiências locais, poderiam contribuir para uma infecção mais prolongada ou possibilidade de malignidade (DEL MISTRO *et al.*, 1994; MEMAR *et al.*, 1995).

Destaca-se que a redução do número das células de Langerhans em amostras cervicais portadoras de LEIs, observada no presente estudo, não esteve diretamente relacionada com a presença da infecção pelo HPV.

Entretanto, Caorsi e Figueroa (1986) observaram um aumento no número de CLs concomitante ao aumento do grau de lesão cervical. Da mesma forma, outros autores também observaram um aumento da densidade das células de Langerhans em neoplasias cervicais por meio da utilização do anticorpo S100 (McARDLE *et al.*, 1986; ABDOL *et al.*, 1999).

Algumas hipóteses foram formuladas para se tentar explicar o aumento do número das CLs em neoplasias intraepiteliais cervicais, como (i) o aumento de proliferação dessas células para o desenvolvimento de uma resposta imune local baseada no recrutamento de linfócitos para eliminação de células infectadas ou de células neoplásicas transformadas. Essa teoria foi em parte fundamentada pela verificação da presença de focos de infiltrado inflamatório em amostras de neoplasia cervical (MORRIS *et al.*, 1983). Outros autores sugeriram que o aumento da densidade das células de Langerhans em lesões cervicais poderia ser devido (ii) a um aumento na migração dessas células da medula para o epitélio ou de áreas sem alterações histopatológicas para outras com tecidos cervicais afetados ou (iii) à retenção de CLs no epitélio neoplásico por períodos maiores que aqueles observados em epitélios cervicais normais (CAMPANER *et al.*, 2007).

Porém outro estudo não observou nenhuma mudança na proporção de células de Langerhans em tecidos normais em comparação com tecidos neoplásicos (VAYRYNEN *et al.*, 1984).

Vários estudos sugerem que em lesões causadas pelo HPV, as células de Langerhans poderiam estar funcionalmente deficientes, o que também poderia contribuir para a persistência da infecção. Já foi observada morfologia anormal das células de Langerhans em condiloma genital, com perda da arquitetura das células dendríticas (COLEMAN *et al.*, 1994; MORELLI *et al.*, 1994).

Um grupo, utilizando amostras de biópsias e dois diferentes anticorpos (S-100 e Cd1a) contra células de Langerhans, demonstrou que células S-100⁺ estavam significativamente mais reduzidas em LEIs, quando comparadas com epitélio cervical normal, enquanto as células Cd1a⁺ não se apresentaram diminuídas. Esses autores

sugeriram que a diminuição das células de Langerhans, seria devido a uma deficiência na expressão da proteína S-100 nessas células. Uma vez que S-100 pertence à família de proteínas ligadoras de cálcio, os autores sugeriram que essas proteínas deveriam ser importantes na função das células de Langerhans na infecção pelo HPV (CONNOR *et al.*, 1999).

Em contraste com os estudos sugerindo uma deficiência funcional das células de Langerhans, Cooper e colaboradores, estudando lesões de pacientes com EV pelo HPV, relataram que, apesar da significativa redução no número de células de Langerhans nas lesões, assim como a morfologia anormal dessas células, as células isoladas pareciam estar funcionalmente intactas na sua habilidade de apresentar antígeno às células T (COOPER *et al.*, 1990).

6.2 Marcadores e Procedimentos Utilizados para a Determinação da Densidade de Células de Langerhans em Amostras Cervicais

Alguns autores consideram que os resultados controversos descritos na literatura acerca da densidade das células de Langerhans em amostras cervicais podem ser explicados por limitações e diferenças metodológicas, como (i) o uso de biópsias cervicais ao invés de fragmentos cervicais; (ii) o pequeno número de amostras analisadas; (iii) o uso de diferentes anticorpos; (iv) as diferenças inerentes à técnica de imunohistoquímica entre laboratórios distintos; (v) o emprego de diferentes diluições de anticorpos e (vi) o uso de diferentes técnicas para se determinar a densidade celular (FLORES *et al.*, 2006; CAMPANER *et al.*, 2007).

No presente estudo foi utilizada a técnica de morfometria visando determinar de maneira mais precisa a densidade das células de Langerhans nas amostras analisadas. As técnicas morfométricas apresentam a capacidade de aumentar a objetividade da contagem de células individuais, porem requerem o uso de "softwares" complexos e análise computacional.

A quantificação de células de Langerhans imuno-marcadas por S100 ou Cd1a tem sido estabelecida usando ambos os procedimentos, a morfometria (AL-SALEH *et al.*, 1995) e, mais comumente, as técnicas de contagem direta (CONNOR *et al.*, 1999; ROSINI *et al.*, 1996; MORELLI *et al.*, 1993; SPINILLO *et al.*, 1993). Entre as técnicas não morfométricas, alguns autores tem contado diretamente as células dendríticas

usando os aumentos de 400X (MORELLI *et al.*, 1993), 250X (SPINILLO *et al.*, 1993) e 200X (ROSINI *et al.*, 1996), enquanto alguns se baseiam na medida do número de CD por mm do epitélio. Levi e colaboradores (2004) utilizaram o aumento de 400X para contagem dessas células sendo 4.5 campos equivalentes a 0.1 mm que permitiu uma detecção efetiva dos elementos celulares imuno-reativos.

Ao realizar a análise de células dendríticas em “folhas epiteliais” (“*epithelial sheets*”) por meio de três distintos marcadores, o antígeno MHCII, a molécula de Cd1a e Langerina, Flores e colaboradores fizeram uso de três critérios para garantir uma maior precisão na localização e contagem dessas células: (i) a seleção de células com morfologia dendrítica evidente, (ii) a distribuição topográfica das células dendríticas nos tecidos e (iii) a quantificação dessas células por área analisada.

No presente estudo, utilizou-se a análise morfométrica associada a critérios bem definidos que levaram em consideração a morfologia dendrítica das células de Langerhans, a intensidade de marcação, a verificação da marcação em todos os componentes celulares - membrana, citoplasma e núcleo, a quantificação das células dendríticas na área de todo o epitélio adjacente à lesão, assim como a análise de toda a extensão do corte histológico. Acreditamos que esses critérios puderam proporcionar uma visualização mais completa de toda a célula dendrítica assim como de sua distribuição epitelial.

A maior parte dos trabalhos descritos na literatura dedicados à contagem das células de Langerhans no epitélio cervical é baseada no emprego da técnica de Imunohistoquímica e dos anticorpos, S100 e Cd1A. A S100 é uma proteína de ligação ao Cálcio que está presente em uma ampla variedade de tipos celulares e que foi observada pela primeira vez nas CLs, por Cochia e colaboradores em 1981. Embora S100 não seja uma proteína específica das CLs, ela é útil para a melhor visualização das extensões das CLs, que são únicas para esses tipos celulares, naquela localização anatômica. Além disso, a quantificação das CLs por ambos marcadores tem resultado em achados discrepantes (CONNOR *et al.*, 1999). Dentre esses dois marcadores, escolhemos, portanto, verificar no presente estudo a expressão da molécula de S100 por ser um antígeno bastante utilizado em diversos trabalhos, e que tem mostrado resultados consistentes em muitos outros estudos similares ao nosso (SPINILLO *et al.*, 1993; AL-SALEH *et al.*, 1995; ROSINI *et al.*, 1996). Vale salientar que a maior parte dos trabalhos anteriores não realizou a comparação da densidade das CLs em todos os diferentes graus de lesão, como realizado no presente estudo.

A Langerina é 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, a 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 com a formação dos grânulos de Birbeck (GB). 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: por meio da formação de estruturas de membrana sobrepostas e com aspecto de “*zipper*” a molécula de Langerina foi capaz de induzir a formação desses grânulos (VALLADEAU *et al.*, 2000). Os últimos autores sugeriram que essa propriedade da Langerina seria uma consequência da função de captura de antígenos estabelecida por essa glicoproteína, permitindo o transporte antigênico através dessas organelas (GB), e providenciando o acesso a uma via não clássica de processamento de antígeno. Considerando a capacidade já demonstrada pelas CDs de realizar a apresentação de antígenos cruzada (“*cross-presentation*”) entre as moléculas MHC de classe I e II (ROMANI *et al.*, 1989; DEN HAAN JMM *et al.*, 2001), os autores propõem que o material endocitado pelas CLs poderia ganhar acesso a essas células por meio da via de MHC de classe I (VALLADEAU *et al.*, 2000).

No presente estudo observou-se, de acordo com o aumento do grau da lesão, uma redução no número médio das células de Langerhans em lesões cervicais em comparação ao número observado nas amostras controles, pela utilização de ambos os marcadores, a molécula de S100 e de Langerina.

Por meio da utilização da técnica de imunohistoquímica, alguns autores consideraram de difícil verificação definir ainda que em cortes histológicos consecutivos, se as células de Langerhans marcadas por dois anticorpos diferentes seriam correspondentes à mesma célula ou a duas células distintas.

Assim, o uso da técnica de Imunofluorescência Indireta por Microscopia confocal a laser mostrou-se no presente estudo, eficaz para a análise das células de Langerhans por dois anticorpos distintos, por meio da visualização da marcação estabelecida pelos dois anticorpos em uma mesma célula individual. Verificou-se que o número médio de células de Langerhans expressando os dois marcadores nas amostras

controles, foi maior do que aquele observado nas amostras correspondentes às lesões cervicais. Uma das possibilidades que poderia explicar essas diferenças observadas poderia ser a composição das subpopulações das células dendríticas presentes no epitélio normal não infectado, em comparação às subpopulações de células dendríticas presentes no epitélio correspondente às lesões cervicais.

6.3 O Desenvolvimento de Vacinas baseadas em Células Dendríticas para o Controle da Infecção pelo HPV

Vacinas profiláticas são baseadas em partículas semelhantes ao vírus. As partículas utilizadas, chamadas de VLP (“*virus-like particles*”), têm em sua constituição básica apenas a proteína L1 do capsídeo viral. Cinco dessas proteínas formam um capsômero, e 72 capsômeros compõem uma VLP, estruturalmente igual ao HPV. Trata-se, portanto, de uma vacina não-infecciosa e não oncogênica que induz a formação de anticorpos neutralizadores de alta titulação e específicos para o HPV (FRANCO *et al.*, 2005). Uma vez injetadas por via intramuscular, as VLPs levam à formação de anticorpos séricos.

A habilidade de CDs de induzirem e manterem a resposta imune primária faz dessas células ótimas candidatas para o desenvolvimento de protocolos de vacinação contra o câncer. CDs cultivadas, derivadas de progenitores hematopoiéticos parecem ter função de APCs semelhantes àsquelas CDs maduras. Então, a geração *ex-vivo* de CDs, provêm uma fonte de células apresentadoras de antígenos para uso em imunoterapia experimental. Existem algumas vacinas utilizando CDs preparadas com HPV16 E6/E7, que podem ser classificadas como: (i) CDs pulsadas com peptídeos ou proteínas tumorais; (ii) CD induzidas com antígeno ou RNAs tumorais; (iii) CD que endocitaram capsídeos ou partículas virais de HPV; (iv) CDs carregadas com células tumorais alogênicas mortas; e (v) CDs que foram fundidas com células tumorais (BIRAGYN e KWAK, 2000; LING *et al.*, 2000; TINDLE, 2002).

Um estudo recente de vacinação utilizando CDs “pulsadas” com antígenos de HPV em pacientes com câncer cervical nas quais todas as modalidades de tratamentos convencionais haviam falhado mostrou que CDs maduras “pulsadas” com proteínas E7 de HPV16/18 foram capazes de induzir resposta sistêmica de células B e T em pacientes com câncer cervical (SANTIN *et al.*, 2006). Experimentos baseados no uso de CDs em

paciente imuno-competentes portadores de câncer cervical com estágio inicial da doença também têm sido sugeridos.

Dados clínicos do passado assim como estudos clínicos futuros, sobre a dosagem, via de administração, toxicidade, eficácia, resposta imune e resposta biológica de CDs “pulsadas” com antígenos de HPV irão contribuir para o desenvolvimento terapêutico ou mesmo profilático de vacinas contra o câncer cervical baseadas em CD, em um futuro próximo, como revisado por MANICKAM e colaboradores (2007). Os trabalhos em torno do desenvolvimento de uma vacina efetiva estão avançando.

A utilização da quimioterapia como única forma de controle ou mesmo tratamento do câncer cervical, têm se mostrado ineficiente contra essa neoplasia que se desenvolve relativamente de forma lenta, de maneira que a imunoterapia surge como uma promissora alternativa terapêutica. Considerando o importante papel desempenhado pelas células dendríticas ou células de Langerhans no desenvolvimento de uma imunidade celular efetiva, torna-se essencial o desenvolvimento de estudos sobre a função dessas células em pacientes infectados com HPV, portadores ou não de outras doenças infecciosas. Uma melhor compreensão sobre os importantes eventos de processamento e apresentação de antígenos nas infecções induzidas pelo HPV também serão de grande importância para o desenvolvimento de estratégias de imunoterapia baseadas no uso de CDs. Os dados obtidos de estudos clínicos poderão abrir novos caminhos para se estabelecer como as características funcionais de CLs e CDs podem ser exploradas para vencer a imunossupressão e obter respostas clínicas eficientes em pacientes com câncer cervical.

7. CONCLUSÕES

1. Observou-se no presente estudo uma redução do número médio de células de Langerhans expressando ambos os marcadores S100 e Langerina, em amostras cervicais portadoras de Lesões Escamosas Intraepiteliais. Essa redução foi associada à severidade dos distintos graus de lesão.
2. Foi observada nesse estudo uma redução do número médio de células de Langerhans expressando ambos os marcadores S100 e Langerina, em amostras cervicais portadoras de Lesões Escamosas Intraepiteliais, em comparação ao número médio dessas células que foi observado no grupo de amostras controles.
3. Nesse estudo verificou-se a presença do DNA do HPV em 53,3% das amostras de NIC I, em 66,6% das amostras de NIC II, em 60% das amostras de NIC III e em 93,33% das amostras de Câncer, com um aumento da detecção do DNA viral de acordo com a severidade da lesão.
4. Verificou-se, no presente estudo, que o número médio de células expressando ambos os marcadores S100 e Langerina foi maior nas amostras controle do que os números médios dessas células observados nas amostras portadoras de Lesões cervicais.
5. Observou-se maior número médio de células expressando a molécula de S100 em amostras correspondentes a lesões escamosas intraepiteliais HPV positivas, do que em amostras negativas ao DNA de HPV.

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.

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.

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.

APGAR BS, ZOSCHNICK L, WRIGHT TC. The 2001 Bethesda System terminology. *Am Fam Physician* 68:1992-8. 2003.

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.

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.

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.

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.

BJERCKE S, ELGO J, BRAATHEN L, THORSBY E Enriched epidermal Langerhans cells are potent antigen-presenting cells for T cells. *J Invest Dermatol* 83: 286–9. 1984.

BLACHON S, DEMERET C The regulatory E2 proteins of human genital papillomaviruses are pro-apoptotic. *Biochimie* 85: 813-9. 2003.

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.

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.

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 worldwide perspective. *J. Natl. Cancer* 78:796-802. 1995.

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

BRAATHEN LR, THORSBY E. Studies on human epidermal Langerhans cells. I. Allo-activating and antigen-presenting capacity. *Scand J Immunol* 11: 401–8. 1980.

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

BRAUN L, DURST M, MIKUMO R, CROWLEY A, ROBINSON M Regulation of growth and gene expression in human papillomavirus-transformed keratinocytes by transforming growth factor-beta: implications for the control of papillomavirus infection. *Mol. Carcinog* 6:100–111.1992.

BREATHNACH AS, BIRBECK MS, EVERALL JD Observations bearing on the relationship between langerhans cells and melanocytes *Ann. NY Acad. Sci* 100,223-238.1963.

BURD EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev* 16: 1-17.2003.

CAMARA GN, CERQUEIRA DM, OLIVEIRA AP, SILVA EO, CARVALHO LG, MARTINS CR Prevalence of human papillomavirus types in women with pre-neoplastic and neoplastic cervical lesions in the Federal District of Brazil. *Mem Instituto Oswaldo Cruz* 98: 879-83.2003.

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

CARVALHO MO, ALMEIDA RW, LEITE FM,, FELLOWS IB., TEIXEIRA MH., OLIVEIRA LH., CAVALCANTI SM Detection of human papillomavirus DNA by the hybrid capture assay. *Braz J Infect Disease* 7: 121-5.2003.

CASTELLSAGUÉ X, BOSCH FX, MUÑOZ N Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res* 89: 191-9.2002.

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.

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 .2. *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.

CERIO R, GRIFFITHS CE, COOPER KD, NICKOLOFF BJ, HEADINGTON JT Characterization of factor XIIIa positive dermal dendritic cells in normal and inflamed skin *Br. J. Dermatol* 121,421-431.1989.

CHARBONNIER AS, KOHRGRUBER N, KRIEHUBER 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.

COGLIANO V, BAAN R, STRAIF K, GROSSE Y, SECRETAN B, EL GHISSASSI F WHO International Agency for Research on Cancer. Carcinogenicity of human papillomaviruses. *Lancet Oncol* 6: 204.2005.

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.

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.

COOPER K, HERRINGTON CS, STICKLAND JE, EVANS MF, MCGEE JO. Episomal and integrated human papillomavirus in cervical neoplasia shown by non-isotopic in situ hybridisation. *J Clin Pathol*. 44:990-6.1991.

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.

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, 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.

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.

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.

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

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.

DEL MISTRO A, INSACCO E, CINEL A, BONALDI L, MINUCCI D, CHIECO-BIANCHI L Human papillomavirus infections of the genital region in human immunodeficiency virus seropositive women: integration of type 16 correlates with rapid progression. *Eur. Journal Gynaecol. Oncol.*15, 50-58. 1994.

DEMERET C, GARCIA-CARRANCA A, THIERRY F Transcription-independent triggering of the extrinsic pathway of apoptosis by human papillomavirus 18 E2 protein. *Oncogene* 22:168-75. 2003.

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

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.

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.

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.

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* 97:10002-7.2000.

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* 61:2356-60.2001.

ECKERT RL, CRISH JF, BALASUBRAMANIAN S, RORKE EA Transgenic animal models of human papillomavirus-dependent disease. *Int J Oncol* 16: 853-70. 2000.

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.

ELBE A, TSCHACHLER E, STEINER G, BINDER A, WOLFF K, STINGL G. Maturational steps of bone marrow-derived dendritic murine epidermal cells: phenotypic and functional studies on Langerhans cells and Thy-1⁺ dendritic epidermal cells in the perinatal period. *J Immunol* 143: 2431–8. 1989.

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: 2819-31.2003.

FERENCZY A, FRANCO E Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *Lancet Oncol* 3: 11-6. 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.

FOSTER CA, HOLBROOK KA Ontogeny of Langerhans cells in human embryonic and fetal skin: cell densities and phenotypic expression relative to epidermal growth. *Am J Anat* 184: 157-64. 1989.

FRANCO EL, ROHAN TE, VILLA LL Epidemiologic evidence and human papillomavirus infection as a necessary cause of cervical cancer. *Nat Cancer Inst* 17:506-11.1999.

FRAZER IH Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nat Rev Immunol* 4:46-54.2004.

FRELINGER JG, HOOD L, HILL S, FRELINGER JA Mouse epidermal Ia molecules have a bone marrow origin. *Nature* 282: 321-3. 1979.

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.

GEISSMANN F, PROST C, MONNET JP, DY M, BROUSSE N, HERMINE O Transforming growth factor β 1 in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 4, induces differentiation of human peripheral blood monocytes into dendritic Langerhans cells. *J Exp Med* 187: 961-6. 1998.

GENTHER SM, STERLING S, DUENSING S, MÜNGER K, SATTTLER 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: 2832-42. 2003.

GREEN I, STINGL G, SHEVACH EM, KATZ SI Antigen presentation and allogeneic stimulation by Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 75: 44-5. 1980.

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

GUESS J; MACCANCE DJ Decreased migration of langerhans precursor-like cells in response to human keratinocytes epressing human papillomavirus type 16 E6/E7 is

related to reduced macrophage inflammatory protein-3 α production. *Journal of Virology* 79: 14852-14862.2003.

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.

HALBE HW Tratado de Ginecologia. 2.ed. São Paulo: Roca v.1-2, 2115p.1998.

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, MUDDOCH 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.

HEADINGTON JT The dermal dendrocyte Adv. Dermatol 1,159-171.1986.

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.

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.

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 wiht dendritic cells. Role of granulocyte/macrophage colony-stimulaing factor. *Am J Pathol.* 154:775-784. 1999.

HUDSON EA, COLEMAN DV, BROWN CL The 1988 Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses.*Acta Cytol* 34: 902-3.1990.

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.

HUNSIJAK K, GRCE M, MAGDIÉ L, PAVELIÉ K. Comparison of five different polymerase chain reaction methods for detection of human papillomavirus in cervical cell specimens. *J Virol Methods*. 88:125-34.2000.

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). Estimativa 2010 incidência de câncer no brasil. Rio de Janeiro: INCA. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br>> Acesso em: 11 de dezembro de 2009.

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.

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

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.

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.

KATZ SI, TAMAKI K, SACHS DH Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow. *Nature* 282: 324–6. 1979.

KHAN MA, TOLLESON WH, GANGEMI JD, AND PIRISI L Inhibition of growth, transformation, and expression of human papillomavirus type 16 E7 in human keratinocytes by alpha interferons. *J. Virol* 67:3396–3403.1973.

KLARESKOG L, MALMNAS-TJERNLUND U, FORSUM U, PETERSON PA Epidermal Langerhans cells express Cd1a antigens. *Nature* 268: 248–50.1977.

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.

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.

LENZ A, HEINE M, SCHULER G, ROMANI N Human and murine dermis contain dendritic cells. Isolation by means of a novel method and phenotypical and functional characterization *J. Clin. Invest* 92:2587-2596.1993.

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

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

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

MALEJCZYK, J., M. MALEJCZYK, A. KOCK, A. URBANSKI, S. MAJEWSKI, N. HUNZELMANN, S. JABLONSKA, G. ORTH, AND T. A. LUGER Autocrine growth limitation of human papillomavirus type 16-harboring keratinocytes by constitutively released tumor necrosis factor-alpha. *J. Immunol* 149:2702– 2708.1992.

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

MATTHEWS K, LEONG CM, BAXTER L, INGLIS E, YUN K, BACKSTROM BT, DOORBAR J, J E HIBMA M Depletion of Langerhans cells in human papillomavirus type 16 infected skin is associated with E6-mediated down regulation of E-caderina. *J. Virol.* 77:8378-8375. 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.

MCBRIDE AA, ROMANCZUK H, HOWLEY PM The papillomavirus E2 regulatory proteins. *J Biol Chem* 266: 18411-4.1991.

MEMAR, O. M., I. ARANY, AND S. K. TYRING. Skin-associated lymphoid tissue in human immunodeficiency virus-1, human papillomavirus, and herpes

simplex virus infections. *J. Investig. Dermatol* 105:99S–104S.1995.

MERAD M, FONG L, BOGENBERGER J, ENGLEMAN EG. Differentiation of myeloid dendritic cells into CD8 α -positive dendritic cells in vivo. *Blood* 96: 1865–72.2000.

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.

Ministério da Saúde. Prevenção do Câncer do Colo do Útero. Manual Técnico: profissionais de saúde. Brasília, 2002b.

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.

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.

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.

MORELLI AE, BELARDI G, DI PAOLA G, PAREDES A, FAINBOIM L Cellular subsets and epithelial ICAM-1 and HLA-DR expression in human papillomavirus infection of the vulva. *Acta Derm. Venereol* 74:45–50.1994.

MOSCICKI AB, ELLENBERG JH, VERMUND SH, HOLLAND CA, DARRAGH T, CROWLEY-NOWICK PA, LEVIN L, WILSON CM. Prevalence of and risks for cervical human papillomavirus infection and squamous intraepithelial lesions in adolescent girls: impact of infection with human immunodeficiency virus. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 154:127-34.2000.

MÜNGER, K., BASILE, J.R., DUENSING, S., EICHTEN, A., GONZALEZ, S.L., GRACE, M., ZACNY, V.L Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene* 20: 7888-98.2001.

MÜNGER K, HOWLEY PM Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res* 89: 213-28.2002.

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.

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

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.

PEHAMBERGER H, STINGL LA, POGANTSCH S, STEINER G, WOLFF K, STINGL G. Epidermal cell-induced generation of cytotoxic T-lymphocyte responses against alloantigens or TNP-modified syngeneic cells: requirement for Ia-positive Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 81: 208–11. 1983.

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

PERREAULT C, PELLETIER M, LANDRY D, GYGER M Study of Langerhans cells after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 63: 807–11. 1984.

RANDOLPH GJ, BEAULIEU S, LEBECQUE S, STEINMAN RM, MULLER WA Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science* 282: 480–3. 1998.

RANDOLPH GJ, INABA K, ROBBIANI DF, STEINMAN RM, MULLER WA Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity* 11: 753–6. 1999.

RATZINGER G, BAGGERS J, DE COS MA., YUAN J, DAO T, REAGAN JL, MUNZ C, HELLER G, YOUNG JW Mature human Langerhans cells derived from CD34+ hematopoietic progenitors stimulate greater cytolytic T lymphocyte activity in the absence of bioactive IL-12p70, by either single peptide presentation or cross-priming, than do dermal-interstitial or monocyte-derived dendritic cells *J. Immunol* 173,2780-2791.2004.

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

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.

ROBERTS S, ASHMOLE I, ROOKES SM, GALLIMORE PH Mutational analysis of the human papillomavirus type 16 E1–E4 protein shows that the C terminus is dispensable for keratin cytoskeleton association but is involved in inducing disruption of the keratin filaments. *J Virol* 71:3554–62.1997.

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.

ROSINI S, CALTAGIRONE S, TALLINI G Depletion of stromal and intraepithelial antigen-presenting cells in cervical neoplasia in human immunodeficiency virus infection. *Hum Pathol* 27: 834–838. 1996.

ROTSZTEJN H.; TRZNADEL-BUDZKO E; JESIONEK- KUPNICKA D Do Langerhans cells play a role in vulvar epithelium resistance to squamous cell carcinoma? *Arch. Immunol* 55: 127–130.2007.

ROWDEN G, LEWIS MG, SULLIVAN AK Ia antigen expression on human epidermal Langerhans cells. *Nature* 268: 247–8.1977.

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.

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.

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.

SCHEYNIUS A, GRÖNVIK KO, ANDERSON J Epidermal Langerhans cells as accessory cells in co stimulation of T lymphocytes in the guinea-pig. *Scand J Immunol* 17: 283–90.1983.

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

SCOOT 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.

SHIMIZU H, BURNS J C. **Extraction of Nucleic Acids: Sample Praparation 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. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* 29: 48-54.2002.

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.

SOUZA PS, VILLA LL Genetic susceptibility to infection with human papillomavirus and development of cervical cancer in women in Brazil. *Mutation Research* 544:375-383.2003.

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.

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

STINGL G, KATZ SI, CLEMENTS L, GREEN I, SHEVACH EM Immunologic functions of Ia-bearing epidermal Langerhans cells. *J Immunol* 121: 2005–13.1978.

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

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

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.

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.

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

TINDLE, RW Vaccines for human papillomavirus infection and anogenital disease. 1st ed, vol. 14. R. G. Landes Company, Austin, Tex. 1999.

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

TRAVER D, AKASHI K, MANZ M, MERAD M, MIYAMOTO T, ENGLEMAN EG, WEISSMAN IL Development of CD8 α -positive dendritic cells from a common myeloid progenitor. *Science* 290: 2152–4. 2000.

TSUKUI T, HILDESHEIM A, SCHIFFMAN MH, LUCCI J 3RD, CONTOIS D, LAWLER P, RUSH BB, LORINCZ AT, CORRIGAN A, BURK RD, QU W, MARSHALL MA, MANN D, CARRINGTON M, CLERICI M, SHEARER GM, CARBONE DP, SCOTT DR, HOUGHTEN RA, BERZOFSKY JA Interleukin 2 production in vitro by peripheral lymphocytes in response to human papillomavirus-derived peptides: correlation with cervical pathology. *Cancer Res* 56:3967-3974.1996.

TURVILLE SG, CAMERON PU, HANDLEY A, LIN G, POHLMANN S, DOMS RW, CUNNINGHAM A L Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets *Nat. Immunol* 3,975-983.2002.

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 SETERS M, BECKMANN I, HEIJMANS-ANTONISSEN C, VAN BEURDEN
M, EWING PC, ZIJLSTRA FJ, HELMERHORST TJ, KLEINJAN A Disturbed patterns
of immunocompetent cells in usual-type vulvar intraepithelial neoplasia. *Cancer Res* 68:
6617-22.2008.

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.

VILLA LL, SICHERO L, RAHAL P, CABALLERO O, FERENCZY A, ROHAN T,
FRANCO EL Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18
preferentially associated with cervical neoplasia. *J Gen Virol* 81:2959-68.2000.

VILLA LL, PINHEIRO NA Low Frequency of p53 Mutation in Cervical Carcinomas
Among Brazilian Women. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*
34:27-33.2001.

DE VILLIERS EM, FAUQUET C, BROKER TR, BERNARD HU, ZUR HAUSEN H
Classification of papillomaviruses. *Virology* 324:17-27.2004.

VOLC-PLATZER B, STINGL G, WOLFF K, HINTERBERG W, SCHNEDL W Cytogenetic identification of allogeneic epidermal Langerhans cells in a bone-marrow-graft recipient. *N Engl J Med* 310: 1123–4. 1984.

WANG SS Human Leucocyte antigen class I and II alleles and risk of cervical neoplasia results from a population based study in Costa Rica. *J Infect Dis* 184:1310-1314.2001.

WALBOOMERS JM, JACOBS MV, MANOS MM, BOSCH FX, KUMMER JA, SHAH KV, SNIJDERS PJ, PETO J, MEIJER CJ, MUÑOZ N Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 189:12-9.1999.

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.

WOLLENBERG A, MOMMAAS M, OPPEL T, SCHOTTDORF EM, GUNTHER S, MODERER M Expression and function of the mannose receptor CD206 on epidermal dendritic cells in inflammatory skin diseases+ *J. Invest. Dermatol* 118,327-334.2002.

WOLFF K The fine structure of the Langerhans cell granule. *J Cell Biol* 35: 466–73.1967.

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.

ZEHBE I, KAUFMANN AM, SCHMIDT M Human papillomavirus 16 E6 especific CD45RA+ CCR7+ high avidity CD8+ T cells fail to control tumor growth despite interferon-gamma production in patients with cervical cancer. *J Immunother* 30:523-532.2007.

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

9. SEÇÃO DE ANEXOS

	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	
---	--	---

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 INTRAEPITELIAIS E INVASORAS DO COLO UTERINO”, a ser desenvolvido sob a Coordenação da Profª Annamaria Ravara Vago, do Laboratório de Biologia das Interações Celulares II, 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.

+55 (31) 3273-2503

	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 INTRAEPITELIAIS 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 Intraepiteliais 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,

Raquel Álvares da Silva Campos
Gerente da Unidade de Referência Secundária (U.R.S.)

Instituto de Ciências Biológicas da UFMG
Leste

Sagrada Família – S.C.O.M.G.E.R.

Secretaria Municipal de Saúde
Prefeitura de Belo Horizonte (PBH)

email: arvago@icb.ufmg.br

email: urssf@pbh.gov.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Esse documento tem como finalidade propor a sua participação no projeto de pesquisa “Avaliação da Resposta Imune Local à Infecção pelo HPV em Lesões Escamosas Intraepiteliais e Invasoras do Colo Uterino”. Muitos trabalhos indicam que a infecção pelo HPV (Vírus do Papiloma Humano) pode contribuir ao desenvolvimento do Câncer cervical. As proteínas produzidas por esses vírus são capazes de causar alterações celulares que transformam células normais em células tumorais. Entretanto, para se defender da infecção pelo vírus o organismo desenvolve uma Resposta Imune que parece ser importante para a prevenção do Câncer cervical. No presente estudo, pretendemos estudar a associação entre a infecção pelo HPV, a Resposta Imune Local (exibida pelo epitélio cervical) e a patogênese do Câncer cervical (denominado de Carcinoma de Células Escamosas).

Para esse estudo, precisamos utilizar parte do material que será coletado durante o procedimento de biópsia que é necessária para o diagnóstico do tumor. Esse material será fixado em solução adequada (formalina tamponada), incluído em um bloco de parafina do qual serão obtidos cortes para realização do exame histopatológico. Necessitamos da sua autorização para utilizar parte desse material incluído em parafina, após a utilização do mesmo para o exame histopatológico de rotina. Informamos que após a utilização do material para fins de pesquisa, o material restante ficará devidamente guardado (armazenado) no Laboratório de Anatomia Patológica que realizará o exame histopatológico.

Este estudo não é necessário para o diagnóstico, mas é de fundamental importância para a realização desta pesquisa. Além disso, não oferecerá riscos adicionais à sua saúde. Esta pesquisa nos ajudará a entender melhor essa patologia e isso será muito importante para que num futuro próximo possamos tratá-la melhor.

Mesmo não concordando em participar desta pesquisa, o seu tratamento será realizado normalmente.

TERMO DE LIVRE CONSENTIMENTO

Li e entendi as informações fornecidas. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Autorizo a utilização do fragmento da lesão que será coletado para realização do exame histopatológico para este projeto de pesquisa. Permito também a utilização dos dados para divulgação e ensino, respeitando sempre meu direito de não ser identificado.

Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim. Em qualquer momento da pesquisa, posso retirar este consentimento, havendo a continuação normal do tratamento.

LOCAL: _____ DATA: ____ / ____ / ____ .

NOME DO PACIENTE

NOME DO RESPONSÁVEL

ASSINATURA DO PACIENTE
RESPONSÁVEL

ASSINATURA DO

DOCUMENTO APRESENTADO: _____ No. _____

Pesquisadores:

Annamaria Ravara Vago. Telefone: (31) 3409-2783

Daniele de Souza Camargos. Telefone: (31) 8731-5616 / (31) 3532-2631.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (**COEP**).

COEP: Av. Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005,
Campus Pampulha, Belo Horizonte, MG – Brasil, 31270-901
coep@prpq.ufmg.br

Em caso de dúvida, você pode ligar para o **COEP** através do número (31) 3409-4592

MINISTÉRIO DA SAÚDE

Conselho Nacional da Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP

FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

1-Projeto de Pesquisa: AValiação da Resposta Imune Local à Infecção pelo HPV em Lesões Escamosas Intraepiteliais e Invasoras do Colo Uterino.				
2-Área do Conhecimento: (conforme relação no verso): Morfologia		3.Código: 2.06	4.Nível: (Só áreas do Conhecimento 2 a 4) (E) Epidemiológico	
5. Áreas Temática(s) Especial (s) (Ver fluxograma no verso)		6.Código(s):	7.Fase:(Só área temática 3) I () II () III () IV ()	
8.Unitermos: (3 opções)				
SUJEITOS DA PESQUISA				
9. Número de sujeitos Nº - Centro: 80 Total:		10. Grupos Especiais: < 18 anos () Portador de Deficiência Mental () Embrião/Feto (Relação de Dependência (Estudantes, Militares, Presidiários, etc) () Outros () Não se aplica (X)		
PESQUISADOR RESPONSÁVEL				
11. Nome: Annamaria Ravara Vago				
12..Identidade: M7-459581		13.CPF: 874345397-04	19.Endereço: (Rua, nº): Rua Estanislau Fernandes Nº197 Bairro Ouro Preto, BH, MG	
14.Nacionalidade: Brasileira		15.Profissão: Professora Universitária	20.CEP: 31340-130	21.Cidade: Belo Horizonte
16.Maior Titulação: Doutor		17.Cargo: Professora Universitária	23.Fone: 3409-2783	22.U.F. Minas Gerais
18. Instituição a que pertence: Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)			24 Fax: 3409-2781	
			25. E.mail: arvago@icb.ufmg.br	
Termo de Compromisso: Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas Complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e a publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima. Data: ____/____/____ Assinatura: _____				
INSTITUIÇÃO ONDE SERÁ REALIZADO				
26.Nome: UFMG		29.Endereço(Rua, nº): Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha		
27.Unidade/órgão Instituto de Ciências Biológicas		30.CEP: 30130-000	31.Cidade: Belo Horizonte	32.U.F. MG
28. Participação Estrangeira: Sim () Não (X)		33. Fone: 34092783	34. Fax:34092771	
35..Projeto Multicêntrico: Sim () Não (X) Nacional () Internacional () (Anexar a lista de todos os Centros Participantes)				
Termo de Compromisso: (do Responsável pela instituição): Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução. Nome: _____ Cargo _____ Data _____ Assinatura: _____				
PATROCINADOR Não se aplica (X)				
36.Nome:		39.Endereço:		
37.Responsável:		40.CEP:	41.Cidade:	42.U.F.
38.Cargo/Função:		43.Fone:		44.Fax:
COMITE DE ETICA EM PESQUISA - COEP				
45. Data de entrada: ____/____/____	46. Registro no CEP:	47.Conclusão. Aprovado:() Data: ____/____/____	48.Não Aprovado: () Data: ____/____/____	
49. Relatório(s) do Pesquisador Responsável previsto(s) para: ____/____/____				
Encaminho a CONEP 50. Os dados acima para registro () 51.O projeto para apreciação () 52. Data: ____/____/____		53.Coordenador/Nome _____ Assinatura		Anexar o parecer consubstanciado
COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA				
54. Nº Expediente:		57.Registro na CONEP:		
55. Processo:		56. Data Recebimento:		

58. Observações:

CÓDIGO – ÁREAS DO CONHECIMENTO

1-CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA
1.01-MATEMÁTICA
1.02-PROBABILIDADE E ESTATÍSTICA
1.03-CIÊNCIA DA COMPUTAÇÃO
1.04-ASTRONOMIA
1.05-FÍSICA
1.06-QUÍMICA
1.07-GEOCIÊNCIAS
1.08-OCEANOGRAPHIA

2-CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (*)

2.01-BIOLOGIA GERAL
2.02-GENÉTICA
2.03-BOTÂNICA
2.04-ZOOLOGIA
2.05-ECOLOGIA
2.06-MORFOLOGIA
2.07-FISIOLOGIA
2.08-BIOQUÍMICA
2.09-BIOFÍSICA
2.10-FARMACOLOGIA
2.11-IMUNOLOGIA
2.12-MICROBIOLOGIA
2.13-PARASITOLOGIA
2.14-TOXICOLOGIA

3-ENGENHARIAS

3.01-ENGENHARIA CIVIL
3.02-ENGENHARIA DE MINAS
3.03-ENGENHARIA DE MATERIAIS E METALÚRGICA
3.04-ENGENHARIA ELÉTRICA
3.05-ENGENHARIA MECÂNICA
3.06-ENGENHARIA QUÍMICA
3.07-ENGENHARIA SANITÁRIA
3.08-ENGENHARIA DE PRODUÇÃO
3.09-ENGENHARIA NUCLEAR
3.10-ENGENHARIA DE TRANSPORTES
3.11-ENGENHARIA NAVAL E OCEÂNICA
3.12-ENGENHARIA AEROSPAIAL
3.13-ENGENHARIA BIOMÉDICA

4-CIÊNCIAS DA SAÚDE(*)

4.01-MEDICINA
4.02-ODONTOLOGIA
4.03-FARMÁCIA
4.04-ENFERMAGEM
4.05-NUTRIÇÃO
4.06-SAÚDE COLETIVA
4.07-FONAUDIOLOGIA
4.08-FISIOTERAPIA E TERAPIA OCUPACIONAL
4.09-EDUCAÇÃO FÍSICA

5-CIÊNCIAS AGRÁRIAS

5.01-AGRONOMIA
5.02-RECURSOS FLORESTAIS E ENGENHARIA FLORESTAL
5.03-ENGENHARIA AGRÍCOLA
5.04-ZOOTECNIA
5.05-MEDICINA VETERINÁRIA
5.06-RECURSOS PESQUEIROS E ENGENHARIA DE PESCA
5.07-CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

6-CIÊNCIAS SOCIAIS APLICADAS

6.01-DIREITO
6.02-ADMINISTRAÇÃO
6.03-ECONOMIA
6.04-ARQUITETURA E URBANISMO
6.05-PLANEJAMENTO URBANO E REGIONAL
6.06-DEMOGRAFIA
6.07-CIÊNCIA DA INFORMAÇÃO
6.08-MUSEOLOGIA
6.09-COMUNICAÇÃO
6.10-SERVIÇO SOCIAL
6.11-ECONOMIA DOMÉSTICA
6.12-DESENHO INDUSTRIAL
6.13-TURISMO

7-CIÊNCIAS HUMANAS

7.01-FILOSOFIA
7.02-SOCIOLOGIA
7.03-ANTROPOLOGIA
7.04-ARQUEOLOGIA
7.05-HISTÓRIA
7.06-GEOGRAFIA
7.07-PSICOLOGIA
7.08-EDUCAÇÃO
7.09-CIÊNCIA POLÍTICA
7.10-TEOLOGIA

8-LINGUÍSTICA, LETRAS E ARTES

8.01-LINGUÍSTICA
8.02-LETRAS
8.03-ARTES

(*) NÍVEL: (P) Prevenção (D) Diagnóstico (T)Terapêutico (E)
Epidemiológico
(N) Não se aplica

CÓDIGO – ÁREA TEMÁTICA ESPECIAL (Resolução CNS 196/96 – item VIII. 4.c)

1. GENÉTICA HUMANA
2. REPRODUÇÃO HUMANA
3. FARMÁCOS, MEDICAMENTOS, VACINAS E TESTES DIAGNÓSTICOS NOVOS (FASES I, II E III) OU NÃO REGISTRADOS NO PAÍS (AINDA QUE FASE IV), OU QUANDO A PESQUISA FOR REFERENTE A SEU USO COM MODALIDADES, INDICAÇÕES, DOSES OU VIAS DE ADMINISTRAÇÃO DIFERENTES DAQUELAS ESTABELECIDAS, INCLUINDO SEU EMPREGO EM COMBINAÇÕES;
4. EQUIPAMENTOS, INSUMOS E DISPOSITIVOS PARA A SAÚDE NVOS, OU NÃO REGISTRADOS NO PAÍS;
5. NOVOS PROCEDIMENTOS AINDA NÃOCONSAGRADOS NA LITERATURA;
6. POPULAÇÕES INDÍGENAS;

7. PROJETOS QUE ENVOLVAM ASPECTOS DE BIOSSEGURANÇA;
8. PESQUISAS COORDENADAS DO EXTERIOR OU COM PARTICIPAÇÃO ESTRANGEIRA E PESQUISAS QUE ENVOLVAM REMESSA DE MATERIAL BIOLÓGICO PARA O EXTERIOR; E
9. PROJETOS QUE, A CRITÉRIO DO CEP, DEVIDAMENTE JUSTIFICADO, SEJAM JULGADOS MERECEDORES DE ANÁLISE PELA CONEP/MS.