

DANIELLA BORGES ALVES

**IDENTIFICAÇÃO “IN SITU” DE LINFÓCITOS T CD4, CD8 E CÉLULAS NK EM
CÉRVICE UTERINA DE PACIENTES INFECTADAS PELO PAPILOMAVÍRUS
HUMANO EM CAMPO GRANDE, MS**

**CAMPO GRANDE
2010**

DANIELLA BORGES ALVES

**IDENTIFICAÇÃO “IN SITU” DE LINFÓCITOS T CD4, CD8 E CÉLULAS NK EM
CÉRVICE UTERINA DE PACIENTES INFECTADAS PELO PAPILOMAVÍRUS
HUMANO EM CAMPO GRANDE, MS**

Dissertação apresentada como exigência para a obtenção do grau de Mestre em Doenças Infecciosas e Parasitárias, do Curso de Mestrado em Doenças Infecciosas e Parasitárias da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, MS.

Orientação: Profa. Dra. Inês Aparecida Tozetti.

**CAMPO GRANDE
2010**



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

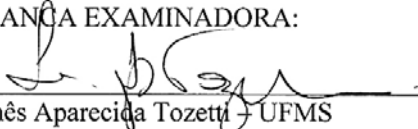
**Programa de Pós Graduação em
Doenças Infecciosas e Parasitárias**

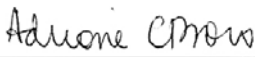


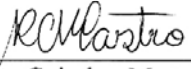
TERMO DE APROVAÇÃO

A dissertação intitulada **IDENTIFICAÇÃO “IN SITU” DE LINFÓCITOS T CD4⁺, CD8⁺ E CÉLULAS NK EM CÉRVIXE UTERINA DE PACIENTES INFECTADAS PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO EM CAMPO GRANDE, MS**, apresentada à banca examinadora por DANIELLA BORGES ALVES, como exigência para a obtenção do título de Mestre em Doenças Infecciosas e Parasitárias, na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, obteve aprovação.

BANCA EXAMINADORA:


Inês Aparecida Tozetti – UFMS


Adriane Cristina Bovo


Ana Rita Coimbra Motta de Castro – UFMS

Campo Grande, 05 de março de 2010.

À minha família: Assis, Gilmar, Graziella,
Marina e Onofra Aparecida, motivo maior
da minha vida.
Amo vocês

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Profa Dra Inês Aparecida Tozetti, grande exemplo, companheira, amiga e principal pessoa para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao meu esposo Assis que tanto amo, por me incentivar, apoiar, socorrer, compreender, amar, por todos esses anos.

Aos meus pais, por sempre me amarem e incentivarem a buscar conhecimento. Amo muito vocês.

A minha querida irmã Graziella, por sempre estar disposta a me ajudar, no que fosse necessário. Te amo.

A Mirian, Flávia, Simone, Tiago, Camila, que foram fundamentais no trabalho prático do estudo.

A Cacilda, pela colaboração na leitura das lâminas.

À colega Fernanda, pela parceria nos estudos e no desenvolver da pesquisa.

Ao Professor Carlos Eurico dos Santos Fernandes por ceder seus equipamentos e por colaborar com a estatística do estudo.

Aos professores da Pós-Graduação, que colaboraram com o meu crescimento intelectual.

A minha irmã postiça Elisangela, como ela mesma diz, pela disposição em tirar as minhas dúvidas.

Aos colegas da Pós-Graduação, pelo companheirismo e alegrias no decorrer do curso.

Às professoras que participaram da qualificação, fornecendo-me as devidas correções e orientações para o epílogo dos trabalhos.

Às pacientes que tomaram parte do estudo.

À fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) pelo suporte financeiro.

Aos que porventura olvidei, saibam que não ficou grafado no papel, mas escrito no coração.

A Deus a quem temos tão pouco a pedir e muito a agradecer.

Seja o que você quer ser,
porque você possui apenas uma vida e nela só se tem uma chance
de fazer aquilo que quer.
Tenha felicidade bastante para fazê-la doce.
Dificuldades para fazê-la forte.
Tristeza para fazê-la humana.
E esperança suficiente para fazê-la feliz.
As pessoas mais felizes não têm as melhores coisas.
Elas sabem fazer o melhor das oportunidades que aparecem em seus caminhos.
A felicidade aparece para aqueles que choram.
Para aqueles que se machucam.
Para aqueles que buscam e tentam sempre.
E para aqueles que reconhecem a importância das pessoas que passam por suas
vidas.

Clarice Lispector.

RESUMO

A resposta imune é vital para a proteção contra o Papilomavírus humano (HPV), principalmente pela ação das células Natural Killer (NK), linfócitos T CD4 e CD8, as quais contribuem para o controle da infecção através da destruição precoce de células infectadas e diminuição da carga viral, restringindo a infecção de novas células. Este estudo objetivou identificar e quantificar *in situ* a presença de linfócitos T CD4, CD8 e células NK, por imunohistoquímica, em lesões de alto e baixo grau da cérvix uterina de pacientes infectadas por HPV. Utilizou-se 56 amostras de biópsia da cérvix uterina, sendo 43 amostras positivas para DNA de HPV de alto risco oncogênico e com diagnóstico histopatológico de Neoplasia Intra-epitelial Cervical (NIC) de alto e baixo grau, ou Negativa para Lesão Intra-epitelial e Malignidade (NILM), e 13 amostras de pacientes negativas para DNA de HPV com diagnóstico histopatológico NILM. As células NK, predominaram em pequena quantidade, nas amostras com lesão de baixo grau e carcinoma. Os linfócitos T CD4, por sua vez, estiveram presentes em maior quantidade nas amostras NIC II, carcinoma e NILM, enquanto que os linfócitos T CD8 foram encontrados em maior quantidade nas lesões de alto grau. Observou-se relação estatística significativa entre a presença de linfócitos T CD4, T CD8 e os achados histopatológicos. Este estudo demonstrou a ausência de células que possam desencadear a fase efetora da resposta imune nas fases iniciais da replicação viral onde não há ainda alterações celulares de alto grau.

Palavras-chave: Papilomavírus humano, resposta imunológica, imunohistoquímica.

ABSTRACT

Immune response is vital to protect against Human Papillomavirus (HPV), especially by the action of Natural Killer (NK) cells, CD4 and CD8 T lymphocytes, contributing to infection control by precociously destructing infected cells and decreasing of viral load, restricting the infection of new cells. The objective of this paper was to identify and quantify the presence of CD4, CD8 T lymphocytes and NK cells, by immunohistochemistry in uterine cervix of HPV-infected patients with high- and low-grade lesions. This study was performed with 56 samples of the uterine cervix, being 43 positive for oncogenic high-risk HPV DNA and with histopathological diagnosis of high- and low-grade Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN) or Negative for Intraepithelial Lesion and Malignancy (NILM); and 13 samples negative for HPV DNA with NILM histopathological diagnosis. The NK cells were predominant in small amount in the low grade lesions and carcinoma samples. The CD4 lymphocytes, on the opposite hand were present in high amount in CIN II, carcinoma and NILM samples, whereas CD8 T lymphocytes were found in a larger quantity in high grade lesions. We observed the significant satatistic relation between the TCD4, TCD8 lymphocytes presence and histopathological findings. This study showed the absence of cells that may trigger the effector phase of the immune response in the initial phases of viral replication, when no high-grade changes are seen.

Key words: Human Papillomavirus, immunological response, immunohistochemical analysis.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 9 |
| 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA | 10 |
| 2.1 Histórico | 10 |
| 2.2 Papilomavírus humano | 11 |
| 2.3 Epidemiologia | 12 |
| 2.4 Aspectos clínicos e diagnósticos | 13 |
| 2.5 Tratamento e prevenção | 15 |
| 2.6 Resposta imunológica | 17 |
| 3 OBJETIVOS | 20 |
| 3.1 Objetivo geral | 20 |
| 3.2 Objetivos específicos | 20 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 21 |
| 4.1 Tipo de pesquisa | 21 |
| 4.2 Local da pesquisa | 21 |
| 4.3 Sujeitos da pesquisa | 21 |
| 4.4 Caracterização das amostras | 22 |
| 4.5 Procedimentos e técnicas | 23 |
| 4.5.1 <u>Técnica de imunohistoquímica</u> | 23 |
| 4.6 Análise dos dados | 24 |
| 4.6.1 <u>Análise quantitativa</u> | 24 |
| 4.6.2 <u>Análise estatística</u> | 24 |
| 4.7 Aspectos éticos | 25 |
| 5 RESULTADOS | 26 |
| 5.1 Análise imunohistoquímica | 26 |
| 5.1.1 <u>Análise das células T CD4</u> | 26 |
| 5.1.2 <u>Análise das células T CD8</u> | 27 |
| 5.1.3 <u>Análise das células Natural Killer</u> | 29 |
| 5.1.4 <u>Análise das amostras NILM e negativas para o DNA de HPV</u> | 30 |
| 6 DISCUSSÃO | 33 |
| 7 CONCLUSÕES | 37 |
| REFERÊNCIAS | 38 |
| ANEXO A – CARTA DE AUTORIZAÇÃO | 46 |
| ANEXO B – CARTA DE APROVAÇÃO | 47 |

1 INTRODUÇÃO

A resposta imune é vital para a proteção contra o Papilomavírus humano (HPV). O HPV pertence à família Papovaviridae e ao gênero Papillomavírus, é um DNA vírus, que infecta o epitélio estratificado escamoso da pele e membranas mucosas. Aproximadamente 20% de indivíduos saudáveis estão infectados com o HPV e a cada ano surgem no mundo cerca de 500.000 casos novos de câncer do colo do útero.

Estudos epidemiológicos mostraram que, em hospedeiros humanos e em outros animais com iatrogenia ou deficiência imune celular, as lesões por Papilomavírus apresentam maior persistência e progressão mais rápida. Mesmo nos indivíduos imunocompetentes os quais poderiam, em virtude da abundante expressão de proteínas virais, formar resposta imune eficiente, o Papilomavírus pode persistir por um longo período sem a ativação da resposta imune.

A investigação “in situ” da resposta imune, na infecção do trato genital pelo HPV tem sido desenvolvida, entretanto, foram observadas análises isoladas de alguns tipos celulares, principalmente linfócitos T CD4 e CD8. A interação entre as células apresentadoras de antígeno e células T CD4 e CD8 são determinantes para a resolução da infecção, bem como a presença e a atividade das células Natural Killer (NK) na fase inicial da infecção.

Considerando a importância da resposta imune como determinante do controle e ou progressão da infecção, frente à intrincada rede de interações celulares, torna-se importante a identificação e quantificação “in situ” da presença de linfócitos T CD4, CD8 e células NK, por imunohistoquímica, em pacientes infectadas pelo HPV, que apresentam lesões de alto e baixo grau, da cérvix uterina. Tais parâmetros poderão servir como base para o estabelecimento de um possível perfil prognóstico, podendo ser utilizado como auxiliar no determinante da conduta terapêutica.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Histórico

Relatos descritivos de verrugas genitais são encontrados desde a antiguidade, na Grécia e Roma. No século XIX, em 1867, Virchow denominou de condiloma as lesões genitais e as descreveu como massas com pequenas elevações na superfície, semelhantes à couve-flor. Gémy, em 1893, relacionou as verrugas genitais com as de pele, através da similaridade histológica observada (ORIEL, 1971).

No final do século XIX e início do século XX diversos experimentos foram realizados, demonstrando o caráter contagioso, os meios de transmissão, o período de incubação e a etiologia das verrugas vulgares e condilomas, relacionando-os ao mesmo agente etiológico (YAMAMOTO; ALVES, 1998).

Foi através da microscopia eletrônica (ME), em 1949, que se demonstrou a verdadeira etiologia das verrugas cutâneas, onde foram observadas partículas virais distribuídas em padrão cristalino (STRAUSS et al., 1949). Em 1968, através da ME, alguns autores analisaram verrugas genitais e concluíram que estas eram causadas por vírus idêntico ou fortemente relacionadas ao Papilomavírus humano, classificando-o no grupo Papova (DUNN; OGILVE, 1968; MELNICK, 1962).

O termo Papova deriva de três palavras: papiloma (verrugas do coelho e do homem), polioma (do rato) e vacuolizante (de células do símio). Posteriormente foram incluídos os Papilomavírus bovino, canino, humano, entre outros, que possuem dupla cadeia de DNA e capacidade de produzir infecções latentes ou crônicas em seus hospedeiros, ocasionando transformação de células normais em neoplásicas (VILLA, 1998).

Rowson e Mahy (1967) determinaram o período de latência desta infecção, entre três a doze meses e Zur Hausen et al. (1974), identificaram o DNA do HPV por hibridização molecular. Outros autores relataram a existência de diferentes tipos virais e estabeleceram que os Papilomavírus são constituídos por dois gêneros distintos pertencentes à mesma família Papovaviridae (GISSMANN; ZUR HAUSEN, 1976; JENSON et al., 1980).

2.2 Papilomavírus humano

Os Papilomavírus são partículas icosaédricas que possuem uma dupla fita circular de ácido desoxirribonucléico (DNA), com cerca de 7500 a 8000 pares de bases, não são envelopados, com diâmetro aproximado de 55nm (HOWLEY, 2007; ZUR HAUSEN, 1982). O genoma do Papilomavírus humano tem cerca de 9 a 10 genes e é dividido em regiões gênicas, sendo que de sete a oito genes estão na região precoce ou *early* e dois na região tardia ou *late*. Os genes precoces estão envolvidos na replicação do DNA viral (*E1* e *E8*), no controle da transcrição (*E2* e *E8*), na maturação intracelular (*E4*) e no estímulo da proliferação e transformação celular (*E5*, *E6* e *E7*). A região tardia contém dois genes, *L1* e *L2*, que comandam a síntese das proteínas principais e secundárias do capsídeo viral (VILLA, 1998).

O HPV é classificado com base na sequência de nucleotídeos do DNA viral e atualmente são reconhecidos cerca de 230 tipos virais. Os tipos 6, 11, 42, 43, 44 são os mais comumente associados às lesões benignas, como: condiloma acuminado e verrugas, com raros casos de evolução maligna. Os tipos 16, 18, 31, 33, 45 e 66 estão associados à lesão de alto grau e câncer cervical (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2007).

O HPV é considerado o principal agente para o desenvolvimento de neoplasias entre os vários fatores causais do câncer de colo de útero. Admite-se que as proteínas virais *E6* e *E7* são produtos oncogênicos, capazes de interagir com as proteínas controladoras do ciclo celular, p53 e pRb (proteína do retinoblastoma), que atuam como supressoras de tumores. Essa interação causa a degradação e inativação destas proteínas celulares, que podem conduzir à transformação e imortalização das células com evolução para o câncer (SOUTO; FALHARI; CRUZ, 2005). Os hormônios são provavelmente os principais co-fatores que contribuem para a integração do Papilomavírus ao DNA celular (VILLA, 1998). Porém, existem controvérsias em relação a esta associação, em estudo prospectivo com 1.812 mulheres, não foi encontrada associação; entre NIC III (Neoplasia Intra-epitelial Cervical) e câncer cervical e o uso de hormônios (CASTLE et al., 2002).

2.3 Epidemiologia

O HPV é transmitido pelo contato sexual e as estimativas de contaminação em indivíduos sexualmente ativos ao longo de suas vidas são de aproximadamente 80% (WEAVER, 2006). A infecção, na maioria das vezes, é contraída nos primeiros anos de vida sexual e o risco de aquisição é proporcional ao número de parceiros (CASTRO et al., 2004; ROSA et al., 2009). Os HPV raramente causam prejuízo à aptidão reprodutiva do hospedeiro e, por causarem mínimos danos às células, geram uma fraca resposta imune, possibilitando infecções vegetativas duradouras, contribuindo para sua propagação a outros hospedeiros (FRAZER, 2009).

Diversos co-fatores contribuem para aumentar as chances de infecção pelo vírus tais como: atividade sexual precoce e elevado número de parceiros sexuais, juntamente com o fumo, multi-paridade, uso de contraceptivos orais e infecções concomitantes por microrganismos sexualmente transmissíveis (BOSCH, 2003; HILDESHEIM; WANG, 2002).

Estudos epidemiológicos mostram que a detecção do HPV está associada a risco dez vezes maior de NIC (KOUTSKY et al., 1992). A progressão da infecção, por sua vez, está associada à persistência do vírus, à presença de tipos de alto risco oncogênico, à alta carga viral e à integração do DNA viral na célula. Aproximadamente 40% das mulheres sexualmente ativas são infectadas pelo HPV. A infecção pelo HPV parece ser mais prevalente em jovens sexualmente ativas até os 35 anos de idade, sendo que somente 10% das mulheres com mais de 40 anos e 5% das mulheres com mais de 55 anos apresentam-se infectadas (BEUTNER; TYRING, 1997; CHAOUKI et al., 1998; HO et al., 1998; MCCANCE, 1994).

As doenças associadas ao HPV, na sua maioria, são causadas principalmente pelos genótipos 6 e 11, responsáveis pelas lesões de baixo grau e 90% das verrugas anogenitais. Os tipos 16 e 18 são responsáveis por 70% das NIC de alto grau e 50 a 60% dos casos de câncer cervical invasivo, e os tipos 31 e 45, com 4-5% dos casos de câncer (BOSCH, 2003; ROSA et al., 2009; WILEY; MASONGSONG, 2006).

O câncer cervical é o segundo tipo de câncer mais comum entre as mulheres, com aproximadamente 500.000 casos novos por ano no mundo, sendo responsável por cerca de 230.000 mortes de mulheres anualmente (WHO, 2009).

No norte da África, 92% dos casos de câncer invasivo foram atribuídos ao HPV, sendo que os tipos mais comuns nesse caso foram o 16 (67,7%) e o 18 (CHAOUKI et al., 1998). Na Alemanha, o DNA viral do HPV 16 foi detectado em 70% dos casos e no Reino Unido em 80% (McCANCE; CAMPION; CLARKSON, 1985; WAGNER et al., 1984). Nos Estados Unidos, o HPV 16 e o HPV 18 foram encontrados em 55% das lesões escamosas e 70% das doenças malignas da cérvix (McCANCE, 1994).

Em estudo realizado em 11 países do mundo, compreendendo 15.613 mulheres entre 15 a 74 anos, houve uma prevalência do HPV variando de 1,4% na Espanha a 25,6% na Nigéria, sendo que na África (25,6%) a prevalência foi cinco vezes maior que na Europa (5,2%), com prevalências intermediárias na América do Sul (14,3%) e na Ásia (8,7%). Esses dados confirmaram a maior prevalência do HPV em países em desenvolvimento (CLIFFORD et al., 2005).

No Brasil, Eluf-Neto e colaboradores (1994) detectaram DNA de HPV em 84% dos casos estudados, sendo que 66% dessas amostras foram positivas para os tipos 16, 18, 31 e 33. Estudo realizado em Campo Grande, MS, detectou predomínio dos tipos 6, 11, 66 e 45 em 87 pacientes encaminhadas para exame clínico de rotina ou por suspeita de infecção (TOZETTI et al., 2006).

A incidência do câncer cervical é observada na faixa etária de 20 a 29 anos e o risco de progressão aumenta velozmente até alcançar seu pico, geralmente aos 45-49 anos (BRASIL, 2009). A estimativa para o ano de 2010, de casos novos de câncer do colo do útero para o Brasil, é de 18.430 casos, com um risco previsto de 18 casos a cada 100 mil mulheres. No Brasil o câncer cervical é mais prevalente na Região Norte, seguida das regiões Centro-Oeste, Nordeste, Sudeste e Sul (BRASIL, 2009).

2.4 Aspectos clínicos e diagnósticos

Richart e Barron (1969) propuseram o termo Neoplasia Intra-epitelial Cervical (NIC), devido à percepção da natureza progressiva das lesões que causariam a neoplasia cervical invasiva. Inicialmente estes autores as classificaram em NIC I, II, III e carcinoma *in situ*, posteriormente NIC III e carcinoma *in situ* foram agrupados como NIC III (ELUF-NETO, 1998). NIC I está relacionada à atividade de replicação do HPV e raramente evolui para o câncer, tendo regressão espontânea. Ao

contrário, NIC II e NIC III representam potenciais lesões precursoras de câncer. Cerca de 12% dos casos de NIC III progredirão se não tratados, entretanto, a maioria das infecções genitais causadas pelo HPV, são clinicamente indetectáveis e não resultam em NIC ou câncer (KOBAYASHI et al., 2004).

A presença do Papilomavírus humano é condição necessária para o desenvolvimento da lesão intra-epitelial de alto grau e do câncer invasivo da cérvix uterina, porém não é suficiente, uma vez que, para o desenvolvimento, manutenção e progressão das lesões intra-epiteliais, são necessárias, além da persistência do vírus, a sua associação com outros fatores de risco, tais como o uso de contraceptivo hormonal ou tabaco e co-infecções com outros agentes de infecção genital (BRASIL, 2009). Estudo de coorte realizado em São Paulo com 1.425 mulheres obteve média da persistência de positividade de 4,8 meses para os HPV não oncogênicos e de 8,1 meses para os oncogênicos (FRANCO et al., 1999).

No trato anogenital o HPV infecta células basais e parabasais do epitélio escamoso, podendo levar à infecção latente ou ativa, sendo que na infecção latente, praticamente não são observados os efeitos citopáticos do vírus e o epitélio é aparentemente normal. A infecção ativa pode ser clínica – condiloma acuminado e carcinoma invasivo - ou subclínica - Neoplasia Intra-epitelial Cervical de baixo e alto grau. Acredita-se que, em decorrência de abrasão ou microlesões da pele e mucosa as infecções ocorram inicialmente nas camadas basais da epiderme (McCANCE, 1994). As lesões intra-epiteliais tendem a evoluir para a cura sem tratamento, porém, o índice varia de acordo com a gravidade da lesão, sendo que, as lesões de alto grau têm elevado risco de progressão para neoplasia maligna cervical (ROSA et al., 2009).

O diagnóstico do HPV pode ser realizado por métodos diretos, através da pesquisa do DNA viral ou por métodos de caracterização da lesão, tais como o exame clínico ou a observação de alterações morfológicas macro e microscópicas. O exame clínico, a análise histopatológica da biópsia ou a citologia da cérvix uterina informam sobre características sugestivas da presença do vírus, enquanto a Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) e a captura híbrida identificam a presença do DNA viral e permitem a caracterização dos tipos de HPV (CASTRO et al., 2004).

A identificação de lesões na mucosa cervical, através da citologia cervicovaginal ou colpocitologia oncótica, foi introduzida por Papanicolaou e Traut

(1943) na década de 40 e tornou-se a técnica de rastreamento mais difundida. Fundamentando-se na detecção de aspectos morfológicos, tais métodos são classificados apenas como sugestivos da infecção (COPE et al., 1997). Para Motta et al. (2001), isso resultou pela significativa redução na mortalidade por câncer do colo do útero. No Brasil, o exame citológico é a estratégia de rastreamento recomendada pelo Ministério da Saúde, prioritariamente para mulheres de 25 a 29 anos (BRASIL, 2009).

A PCR é um teste de amplificação da sequência alvo, utilizada na detecção do HPV, quantificação viral, sequenciamento do DNA e análise de mutação (GIBSON; HEID; WILLIAMS, 1996; GRAVITT et al., 2000; JACOBS et al., 1999), enquanto que o teste de captura híbrida é realizado através da amplificação do sinal, sendo ambos considerados métodos diretos, alcançando elevada sensibilidade (HUBBARD, 2003).

2.5 Tratamento e prevenção

Segundo Castro et al. (2004) a profilaxia do HPV visa o controle da transmissão do vírus e diagnóstico precoce da doença, o que depende da realização de programas educativos e o uso de medidas preventivas. A população mais atingida pelo HPV de alto risco oncogênico é a feminina, sendo necessária a continuidade e a expansão das campanhas, para a conscientização deste segmento sobre a importância e necessidade da realização dos exames ginecológicos preventivos (SOUTO; FALHARI; CRUZ, 2005).

A detecção precoce da lesão por HPV permite a utilização de abordagens terapêuticas menos invasivas, diferentemente do que ocorre quando as mesmas são detectadas tardiamente. O homem é portador assintomático do vírus, podendo, em algumas ocasiões, apresentar lesões macroscópicas características da infecção viral. Por isso, desempenham o papel de transmissores do vírus para as suas parceiras, necessitando também, de serem alvos da educação preventiva (SOUTO; FALHARI; CRUZ, 2005). É recomendável que o parceiro sexual da paciente infectada seja encaminhado para exame clínico, laboratorial e acompanhamento médico (ZANINI, 2010).

O tratamento da infecção pelo HPV tem como objetivo a cura clínica, pois não há comprovação de erradicação definitiva do vírus. A ocorrência ou não de recidiva,

depende do estado imunológico de cada portador da infecção (CASTRO et al., 2004). Mesmo após a “cura” das lesões os testes de biologia molecular (captura híbrida e hibridização molecular) permanecem positivos até o organismo eliminar completamente o vírus circulante, o que leva de 8 a 24 meses, sendo, portanto, recomendados exames semestrais/anuais para controle (BAYER, 2010).

O tratamento pode ser local – cirúrgico, quimioterápico, cauterização, entre outros, visando à remoção de verrugas, condilomas e lesões do colo uterino. As recidivas podem ocorrer e são frequentes mesmo com o tratamento adequado. Encontra-se comercialmente disponível um creme imunomodulador, de aplicação tópica, que contém o princípio ativo imiquimode. Tal substância é um ativador inespecífico do sistema imune estimulando a migração celular, a fagocitose e a apresentação do antígeno. As taxas de recorrência das verrugas após aplicação deste creme são baixas. Enquanto os demais procedimentos destroem as verrugas, o imunomodulador aumenta a produção local de substâncias próprias do sistema imunológico, as quais auxiliam no combate ao vírus (BAYER, 2010).

A infecção pelo HPV quando diagnosticada por métodos de biologia molecular e sem a presença de lesões detectáveis pelos métodos de Papanicolau e Colposcopia não necessita ser tratada. Nestes casos, espera-se que o vírus seja combatido pelo sistema imune do indivíduo infectado (BAYER, 2010).

A profilaxia contra alguns tipos de HPV é possível por meio de vacinas que utilizam “partículas vírus *like*” (VLP). Desenvolvidas por tecnologia molecular recombinante, a partir da proteína estrutural *L1* do vírus HPV, a vacina é formulada em dois tipos: a bivalente contra HPV-16 e 18 e a quadrivalente para o HPV-6, 11, 16 e 18. De elevado custo, são administradas pela via intramuscular e conservadas em baixas temperaturas. Induzem principalmente à formação de anticorpos específicos, em elevadas concentrações, contra a proteína *L1* do vírus, sendo preventivas da infecção por estes tipos virais e não de caráter terapêutico (STANLEY; GISSMANN; NARDELLI-HAEFLIGER, 2008).

Vários países aprovaram a comercialização destas vacinas, sendo que no Brasil, está registrada a vacina quadrivalente, desenvolvida para prevenção de verrugas genitais (HPV 6 e 11) e de neoplasias cervicais (HPV 16 e 18) indicada para mulheres de 9 a 26 anos de idade (BRASIL, 2009). Ressalta-se a importância da administração da vacina antes do início da atividade sexual, ou seja, antes da possibilidade de infecção por estes tipos virais. Destaca-se, ainda, a importância de

realizar periodicamente o teste de Papanicolau, uma vez que a vacina protege somente contra dois tipos oncogênicos, embora estes sejam os mais relevantes.

2.6 Resposta imunológica

O HPV não causa lise celular, geralmente produz lesões verrugosas ou alterações celulares no epitélio escamoso sem induzir inflamação local. A replicação viral ocorre dentro das células epiteliais; logo após os vírus maduros são liberados e infectam novas células que estão descamando. Desta forma há pouca apresentação de antígeno viral ao sistema imune local e sistêmico, uma vez que as células da resposta imune situam-se no tecido conjuntivo abaixo do epitélio (GUZMÁN-ROJAS; ALCOCER-GONZÁLEZ; MADRID-MARINA, 1998).

Acredita-se que a vigilância de células infectadas, realizada por células T e Natural Killer (NK), é importante na infecção e na resolução da doença. As células NK são conhecidas como grandes linfócitos granulocitos, que representam 5 a 20% das células mononucleares no sangue e no baço, pouco frequentes em outros órgãos linfóides e são derivadas de precursores da medula óssea. Elas fazem parte da imunidade natural celular e compõem a resposta inicial aos microrganismos, pois impedem, controlam ou eliminam a infecção do hospedeiro imediatamente após a entrada dos microrganismos. As suas principais funções são a lise de células infectadas ou danificadas e ativação dos macrófagos através da citocina interferon-gama (IFN- γ) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Em quase todos os casos, a infecção viral é eliminada após a ativação da resposta imune. Entretanto, ocasionalmente, as lesões não regredem e a progressão maligna da doença pode seguir sob condições apropriadas. A infecção viral persistente é necessária para a progressão neoplásica e a falha da eliminação viral é atribuída a uma pobre resposta (MUÑOZ, 2000). A progressão também pode ser atribuída à existência das células T reguladoras (CD4+/CD25+) específicas para o HPV, que suprimem a indução e níveis das células T auxiliares (CD4+) (VAN DER BURG et al., 2007).

Os linfócitos T originam-se de células-tronco na medula óssea e migram para o timo, adquirindo imunocompetência e formando duas subpopulações, os linfócitos T auxiliares (CD4+) e os linfócitos T citotóxicos (CD8+). Diferindo entre si, funcionalmente e fenotipicamente, tais células participam da imunidade adquirida

celular, iniciada pelo reconhecimento de antígenos estranhos por linfócitos T auxiliares. Em resposta à estimulação antigênica, tais células secretam proteínas denominadas citocinas que estimulam a proliferação e a diferenciação das células T e a ativação de outras células, tais como os macrófagos e as células B. Os linfócitos T citotóxicos, por sua vez, depois de ativados por citocinas, lisam as células que expressam antígenos estranhos, por exemplo, as células infectadas por vírus e outros microrganismos intracelulares (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Os linfócitos T CD4 podem ser subdivididos em duas subpopulações celulares de acordo com o perfil de citocinas produzidas. As células T helper 1 (Th1), responsáveis pelo predomínio da imunidade mediada por células, e as T helper 2 (Th2) que determinam o predomínio de imunidade mediada por anticorpos ou imunidade humoral (ROMAGNANI, 1992; SEDER; PAUL, 1994). Nas infecções virais e na resposta anti-tumoral, as células Th1 ativadas estimulam a liberação de IFN- γ , que por sua vez, estimula os macrófagos a iniciarem a fagocitose e a liberação de outras citocinas, ativando tanto a replicação das células Th1 e a ação de células T CD8, quanto potencializando a atividade das células NK (GUZMÁN-ROJAS; ALCOCER-GONZÁLEZ; MADRID-MARINA, 1998).

Em lesões papilomatosas que regrediram, tem sido descrita a presença de infiltrados inflamatórios sugerindo a remoção das células infectadas por células citotóxicas. Este achado indica que a resposta imune local exerce papel fundamental para o desenvolvimento e progressão do câncer cervical, principalmente em um estágio inicial (VILLA, 1998). Entretanto, os mecanismos exatos, que disparam uma resposta imune eficiente contra lesões relacionadas ao HPV, ainda não são bem compreendidos e podem estar relacionados à ativação do sistema imune ou à composição genética do hospedeiro (PINTO; TULIO; CRUZ, 2002).

A maioria dos estudos enfoca a resposta sistêmica das células T às proteínas *E6* e *E7*, principalmente dos HPV 16 e 18 (BONTKES et al., 2000; KADISH et al., 2002; STEELE et al., 2005). Enquanto que outros autores têm demonstrado a presença de pequenos acúmulos de células linfóides na cérvix uterina e na zona de transformação. Os linfócitos T CD4 e CD8 têm sido observados como células isoladas e em pequenos acúmulos no estroma da mucosa vaginal e cervical (WHITE et al., 1997) e as respostas imunológicas citotóxica e humoral confirmadas a presença durante a resolução da infecção (KOBAYASHI et al., 2000).

A imunidade mediada por células é essencial para o controle da infecção pelo HPV e das neoplasias relacionadas a esse vírus. Tal fato é sugerido devido à incidência aumentada de câncer genital em indivíduos imunossuprimidos. Em pacientes imunocompetentes, poucas infecções genitais por HPV resultam no desenvolvimento de tumores (PENN, 1986). Por outro lado, a infecção por HPV pode interferir nos mecanismos de vigilância imune local na fase indutora na qual ocorre a apresentação do antígeno e na efetora que gera células T citotóxicas e células B ativadas (GONÇALVES; DONADI, 2004; TINDLE, 2002).

A investigação “in situ” sobre o perfil imunohistoquímico da resposta imune, na infecção do trato genital pelo HPV foi recentemente realizada por alguns grupos (JIMENEZ-FLORES et al., 2005; MONNIER-BENOIT et al., 2006; VILLADA et al., 2004). Entretanto, foram observadas análises isoladas de alguns tipos celulares, principalmente linfócitos T CD4 e CD8. O prognóstico clínico da infecção, regressão, persistência e progressão podem ser determinadas através da presença de infiltrado de linfócitos no sítio da neoplasia. Estudo anterior, por imunohistoquímica, mostrou significantes infiltrados de linfócitos T CD4, CD8 e linfócitos B no estroma abaixo da lesão (BELL et al., 1995).

Dada a relevância deste vírus, sua capacidade de ocasionar lesões de alto e baixo grau na cérvix uterina, sua alta transmissibilidade e o papel do sistema imune no controle da infecção, torna-se importante o estudo da resposta imune para verificar a possibilidade de se estabelecer relação com a carga viral e os diferentes tipos de lesões cervicais produzidas durante a infecção.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Identificar linfócitos T auxiliares, linfócitos T citotóxicos e células NK, em cérvix uterina de pacientes infectadas pelo Papilomavírus humano.

3.2 Objetivos específicos

- a) relacionar a presença e quantidade dessas células com o grau da lesão intra-epitelial observada;
- b) relacionar a presença e quantidade dessas células com a carga viral;
- c) comparar o perfil celular observado em pacientes NILM não infectadas por HPV.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Tipo de pesquisa

Estudo experimental e de caráter transversal.

4.2 Local da pesquisa

O material utilizado para a pesquisa, biópsia de cérvix uterina, foi coletado durante a execução do projeto de pesquisa “Avaliação da Sensibilidade e Especificidade dos Métodos Sugestivos e Diagnósticos de Infecção por Papilomavírus Humano (HPV) em Pacientes com Neoplasia Intra-epitelial Cervical de Alto e Baixo Grau”, no período de 2000 a 2002, no Centro de Prevenção ao Câncer de Campo Grande, MS, por ser um laboratório de referência e credenciado pelo Sistema Único de Saúde.

A execução da técnica de imunohistoquímica foi utilizada a estrutura física do Laboratório de Imunologia e a fotodocumentação foi realizada no Laboratório de Patologia, ambos do Departamento de Patologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul CCBS/UFMS.

4.3 Sujeitos da pesquisa

Foram utilizadas nesse estudo 56 amostras de biópsia da cérvix uterina, incluídas em parafina, aleatoriamente selecionadas, pertencentes ao banco de material biológico, sob responsabilidade da Profa. Inês Aparecida Tozetti, segundo autorização do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS (Anexo A).

Foram incluídas nesse estudo 43 amostras com os seguintes critérios:

- a) positividade pelo teste de captura híbrida (Digene), para DNA de HPV de alto risco oncogênico; e
- b) constatação por exame histopatológico da presença de NIC I, II e III/carcinoma ou Negativo para Lesão Intra-epitelial e Malignidade (NILM).

E foram adicionadas mais 13 amostras de pacientes negativas para DNA de HPV pelo teste de captura híbrida, com diagnóstico NILM.

4.4 Caracterização das amostras

As amostras utilizadas neste estudo foram selecionadas de pacientes com idade entre 18 e 57 anos (média= 28 anos). Os dados relativos aos achados histopatológicos e a carga viral são provenientes de estudos anteriores (TOZETTI, 2006). Quanto aos achados histopatológicos, a classificação das amostras está representada na Tabela 1.

Tabela 1 – Frequência absoluta e porcentagem de pacientes segundo os achados histológicos, Campo Grande – 2010

| Achados histológicos | N°. | % |
|---------------------------------|------------|--------------|
| NICI | 10 | 17,8 |
| NICII | 9 | 16,1 |
| NICIII | 7 | 12,5 |
| Carcinoma | 8 | 14,3 |
| NILM positivo para o DNA de HPV | 9 | 16,1 |
| NILM negativo para o DNA de HPV | 13 | 23,2 |
| Total | 56 | 100,0 |

Nota: NIC (Neoplasia Intra-epitelial Cervical), Carcinoma e NILM (Negativo para Lesão Intra-epitelial e Malignidade).

A carga viral, quantificada pelo teste de captura híbrida, foi classificada de acordo com Lorincz et al. (2002) em 0, 1, 2, 3 e 4, correspondendo respectivamente a negativo, 1 a <10, 10 a <100, 100 a <1000 e ≥ 1000 RLU/PCB (Unidades de Luz Liberadas/para Sonda do Grupo B). Quanto à carga viral a classificação das amostras está representada na Tabela 2.

Tabela 2 – Frequência absoluta e porcentagem de pacientes segundo a carga viral, Campo Grande – 2010

| Variáveis | N°. | % |
|--------------------------|------------|--------------|
| 0 (negativo) | 17 | 30,4 |
| 1 (1 a < 10 RLU/PCB) | 17 | 30,4 |
| 2 (10 a < 100 RLU/PCB) | 5 | 8,9 |
| 3 (100 a < 1000 RLU/PCB) | 7 | 12,5 |
| 4 (≥ 1000 RLU/PCB) | 10 | 17,8 |
| Total | 56 | 100,0 |

Nota: RLU/PCB (Unidades de Luz Liberadas/para Sonda do Grupo B).

4.5 Procedimentos e técnicas

4.5.1 Técnica de imunohistoquímica

A marcação imunohistoquímica foi realizada segundo a técnica de Santos et al. (1999) como descrito brevemente a seguir. A partir da biópsia de cérvix uterina emblocada em parafina, foram obtidos cortes histológicos de 3µm de espessura, os quais foram aplicados sobre lâminas silanizadas.

Para desparafinização, os cortes histológicos foram deixados em estufa a 60°C por 24 horas e em banho de xilol a 60°C por 30 minutos, seguido por xilol na temperatura ambiente por 20 minutos. As lâminas foram então submetidas à sequência de banhos de etanol (100% três vezes, 95% e 80% uma vez) e lavadas em água destilada.

Para a recuperação antigênica, as mesmas foram colocadas em tampão citrato 10mM, pH 6,0, sob pressão forte, durante 2 minutos e meio, contados a partir da fervura, para a detecção de CD8 e CD57, e em tampão EDTA 0,05M, pH 8,0, durante 4 minutos, para a detecção de CD4. Após o resfriamento, procedeu-se o bloqueio da peroxidase endógena utilizando água oxigenada 10 volumes, por dois banhos de 10 minutos cada. Posteriormente os cortes foram lavados rapidamente em água destilada e deixados por 10 minutos em salina tamponada fosfatada (PBS) pH 7,4.

Os anticorpos primários monoclonais anti-CD4 (Invitrogen, clone 1F6, cod. 182282), anti-CD8 (Invitrogen, clone 1A5, cod. 182289), e anti-CD57 (Invitrogen, clone NK-1, cod. 180167Z), foram diluídos em PBS com 1% de albumina, conforme titulação prévia. Cerca de 100µl de cada preparado foi depositado sobre cada exemplar dos cortes. As lâminas foram incubadas em câmara úmida a 37°C por 1 hora e a 8°C por 18 horas.

As lâminas foram então, lavadas com jato de PBS e colocadas em banho no mesmo tampão por 5 minutos. Para detecção do anticorpo primário foi utilizado o sistema LSAB+ Sys HRP (Dako código K0690), procedendo inicialmente à aplicação do anticorpo secundário biotinalado, em quantidade suficiente para cobrir o corte. As lâminas foram novamente levadas em câmara úmida para a estufa a 37°C por 40 minutos.

Após a incubação, as lâminas foram novamente lavadas em PBS e deixadas em banho como descrito acima. Em seguida foi aplicado sobre os cortes o complexo estreptoavidina/biotina. Nova incubação em câmara úmida a 37°C por 40 minutos, seguida de remoção do excesso do complexo, com jato de PBS e banho no mesmo tampão.

Para finalizar aplicou-se o cromógeno líquido diaminobenzidina (DAB) 60mg% em PBS e as mesmas foram incubadas a 37°C por 30 minutos. A reação foi interrompida pela lavagem e banho em água destilada por 5 minutos.

As lâminas foram contracoradas com hematoxilina, lavadas em água corrente por 4 vezes e rapidamente em água destilada. Em seguida as lâminas foram submetidas a uma sequência de banhos de etanol (50%, 95% uma vez e 100% três vezes), por último no xilol e montadas em Entelan. Como controle da reação foi utilizado cortes de tonsila humana, sendo que os positivos seguiram metodologia acima descrita e para os negativos suprimiu-se a adição do anticorpo primário, sendo aplicado apenas o tampão PBS com 1% de albumina.

4.6 Análise dos dados

4.6.1 Análise quantitativa

As lâminas foram observadas em microscopia óptica, por dois observadores independentes, previamente calibrados, com objetiva de 10X e 40X, sendo consideradas positivas quando da observação de marcação de coloração marrom em células características. A quantificação das células imunomarcadas foi realizada de forma subjetiva, avaliando 10 campos aleatórios e classificando em escores de zero a três, de acordo com a quantidade de células coradas, correspondendo a: negativo para a ausência de células coradas, discreta quantidade, moderada quantidade e abundante quantidade, respectivamente.

4.6.2 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando o programa SPSS versão 10.0 (NORUSIS, 2000).

4.7 Aspectos éticos

O estudo foi revisado e aprovado pelo Comitê de Ética da UFMS, protocolo 1353/09 de 4 de junho de 2009 (Anexo B). Como as amostras faziam parte do banco de material biológico, foi obtida a dispensa da utilização do Termo de Consentimento Livre Informado (TCLE).

5 RESULTADOS

5.1 Análise imunohistoquímica

5.1.1 Análise das células T CD4

Na figura 1 observa-se a distribuição das células CD4 nas amostras analisadas, segundo os achados histopatológicos. Considerando o total das amostras com presença moderada e abundante destas células, houve predomínio dos linfócitos T CD4 nas amostras NIC II (88,9%), carcinoma (87,5%) e NILM (86,4%). Ocorreu relação estatística significativa entre a presença de células CD4 e os achados histopatológicos ($p=0,048$).

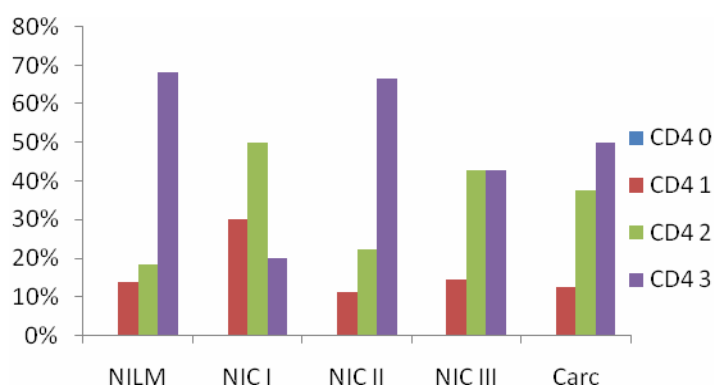


Figura 1 – Classificação das amostras segundo os achados histopatológicos e presença de linfócitos T CD4, (n=56). Obs: NIC (Neoplasia Intra-epitelial Cervical), Carc (carcinoma) e NLIM (Negativo para Lesão Intra-epitelial e Malignidade). CD4 0= negativo, CD4 1= presença discreta, CD4 2= quantidade moderada e CD4 3= presença abundante.

Na figura 2 está representada a distribuição das células CD4 nas amostras analisadas, segundo a carga viral. Não houve correlação estatística entre a carga viral e presença de células CD4 ($p=0,443$). Adotando o mesmo critério anterior, o somatório das amostras com presença moderada e abundante, observa-se maior presença de linfócitos T CD4 nas amostras CV 2 (100%), CV 3 (100%), seguida pela CV0 (94,1%).

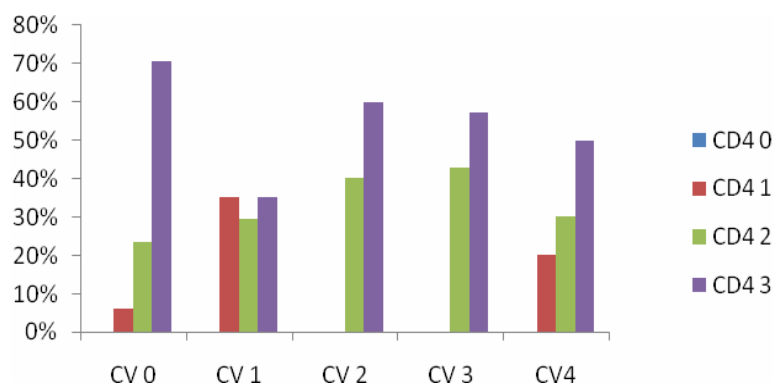


Figura 2 – Classificação das amostras segundo a carga viral e a presença de linfócitos T CD4, (n=56). Obs: CV 0= negativo para DNA de HPV, CV 1= 1 a < 10 RLU/PCB, CV 2= 10 a < 100, CV 3= 100 a < 1000 e CV 4= \geq 1000. CD4 0= negativo, CD4 1= presença discreta, CD4 2= quantidade moderada e CD4 3= presença abundante.

Na figura 3 observa-se a marcação de células CD4 em biópsia de cérvix uterina.

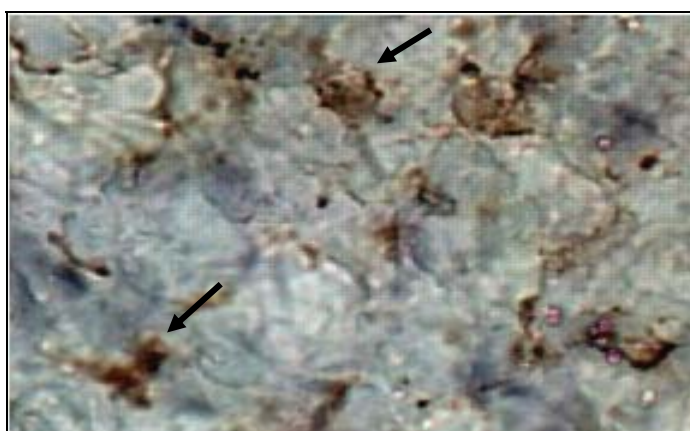


Figura 3 – Marcação de linfócitos T CD4 em biópsia de cérvix uterina. (IHQ, aumento de 400X).

5.1.2 Análise das células T CD8

Na figura 4 pode ser observada a distribuição das células CD8 entre as amostras analisadas, segundo os achados histopatológicos. Os linfócitos T CD8 prevaleceram nas amostras NIC II (66,7%) e NIC III (71,5%), seguindo o critério acima citado. Houve relação estatística significante entre a presença de células CD8 e os achados histopatológicos ($p=0,028$).

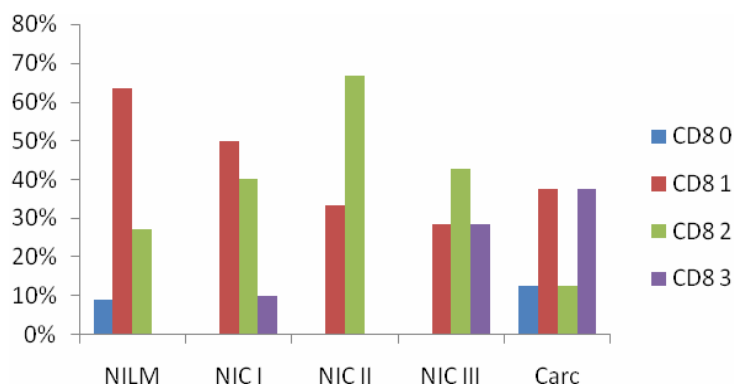


Figura 4 - Classificação das amostras segundo os achados histopatológicos e presença de linfócitos T CD8, (n=56). Obs: NIC (Neoplasia Intra-epitelial Cervical), Carc (carcinoma) e NLIM (Negativo para Lesão Intra-epitelial e Malignidade). CD8 0= negativo, CD8 1= presença discreta, CD8 2= quantidade moderada e CD8 3= presença abundante.

A distribuição das células CD8, entre as amostras analisadas, segundo a carga viral encontra-se na figura 5. Apesar de não haver correlação estatística ($p=0,241$), nota-se predomínio de células CD8 nas amostras CV 1 (58,9%) e CV 3 (71,4%), considerando o critério anteriormente adotado.

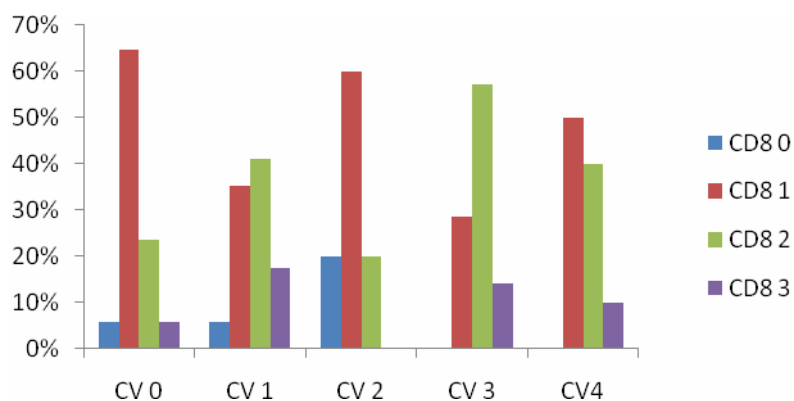


Figura 5 - Classificação das amostras segundo a carga viral e a presença de linfócitos T CD8, (n=56). Obs: CV 0= negativo para DNA de HPV, CV 1= 1 a < 10 RLU/PC, CV 2= 10 a < 100, CV 3= 100 a < 1000 e CV 4= ≥ 1000 . CD8 0= negativo, CD8 1= presença discreta, CD8 2= quantidade moderada e CD8 3= presença abundante.

Na figura 6 observa-se a marcação de células CD8 em biópsia de cérvix uterina.

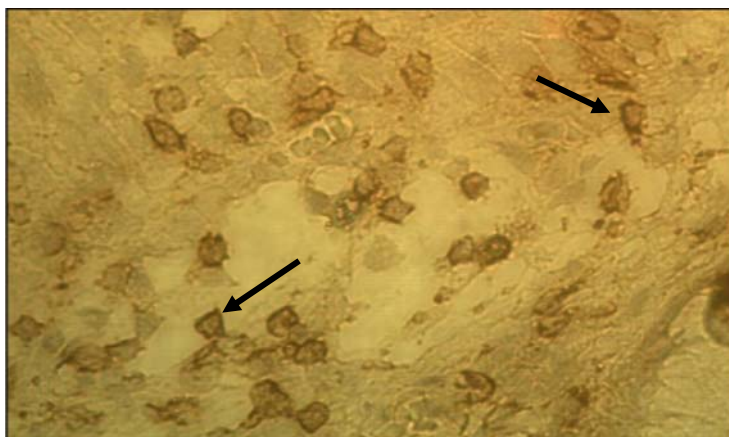


Figura 6 – Marcação de linfócitos T CD8 em biópsia de cérvix uterina. (IHQ, aumento de 400X).

5.1.3 Análise das células Natural Killer

Observa-se na figura 7 a distribuição das células NK entre as amostras analisadas, segundo os achados histopatológicos. Não ocorreu relação estatística significativa entre a presença de células NK e os achados histopatológicos ($p=0,445$). Houve predomínio, considerando a expressão CD57 em pequena quantidade, nas amostras NIC I (20%) e carcinoma (12,5%).

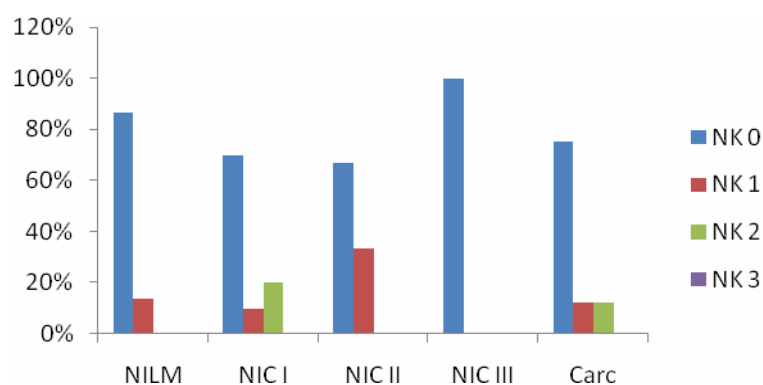


Figura 7 - Classificação das amostras segundo os achados histopatológicos e presença de células NK, (n=56). Obs: NIC (Neoplasia Intra-epitelial Cervical), Carc (carcinoma) e NILM (Negativo para Lesão Intra-epitelial e Malignidade). NK 0= negativo, NK 1= presença discreta, NK 2= quantidade moderada e NK 3= presença abundante.

A distribuição da presença de células NK entre as amostras analisadas, segundo a carga viral está apresentada na figura 8. Não houve correlação estatística

($p=0,268$). Apesar disto células NK foram identificadas nas amostras (95,7%) com carga viral menor que 1000 RLU/PCB.

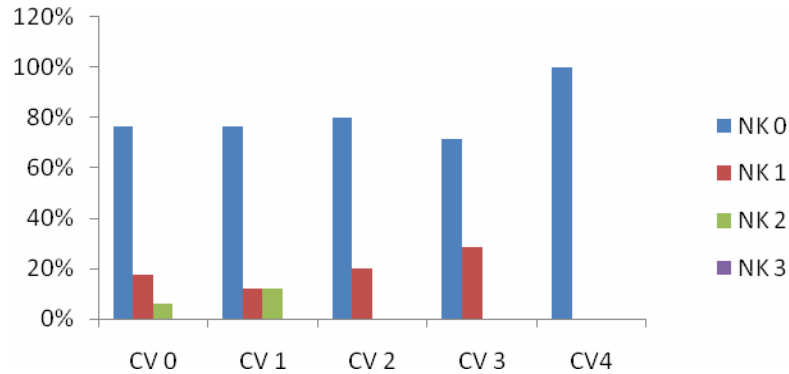


Figura 8 - Classificação das amostras segundo a carga viral e a presença de células NK, (n=56). Obs: CV 0= negativo para DNA de HPV, CV 1= 1 a < 10 RLU/PCB, CV 2= 10 a < 100, CV 3= 100 a < 1000 e CV 4= \geq 1000. NK 0= negativo, NK 1= presença discreta, NK 2= quantidade moderada e NK 3= presença abundante.

Na figura 9 pode-se observar a marcação de células NK em biópsia de cérvix uterina.

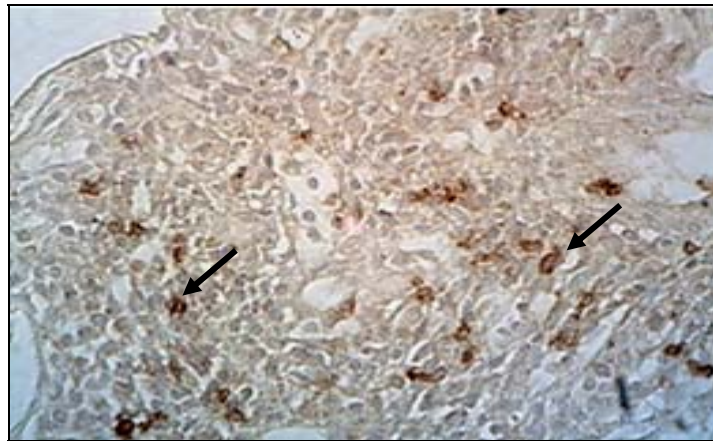


Figura 9 – Marcação de células Natural Killer, em biópsia de cérvix uterina. (IHQ, aumento de 400X).

5.1.4 Análise das amostras NILM e negativas para o DNA de HPV

Nas figuras 10, 11 e 12 estão apresentadas, respectivamente, a distribuição das células CD4, CD8, e NK entre as amostras NILM negativas para a pesquisa de

DNA de HPV. Foi observado predomínio de linfócitos T CD4, poucos linfócitos T CD8 e raras células NK nestas amostras.

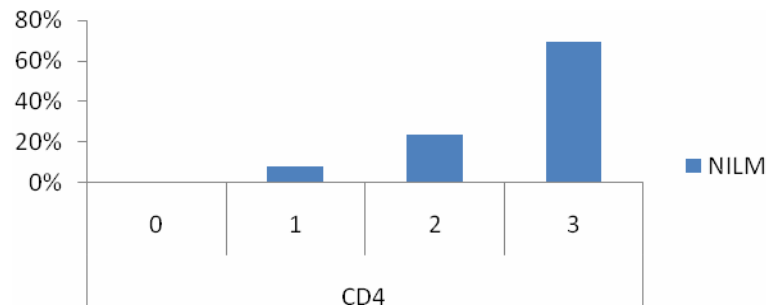


Figura 10 – Classificação das amostras de pacientes NILM negativas para o DNA de HPV, segundo a presença de linfócitos T CD4, (n=13). Obs: CD4 0= negativo, CD4 1= presença discreta, CD4 2= quantidade moderada e CD4 3= presença abundante.

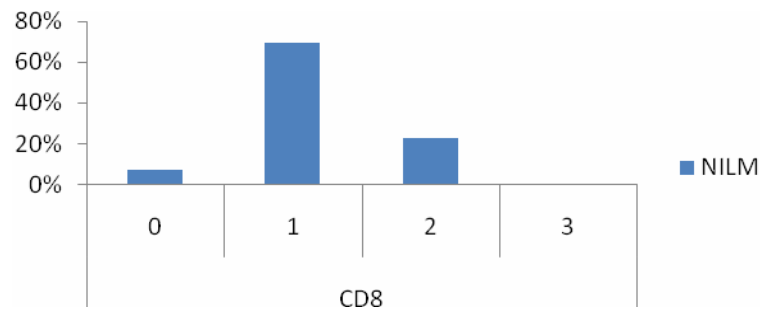


Figura 11 – Classificação das amostras de pacientes NILM negativas para o DNA de HPV, segundo a presença de linfócitos T CD8, (n=13). Obs: CD8 0= negativo, CD8 1= presença discreta, CD8 2= quantidade moderada e CD8 3= presença abundante.

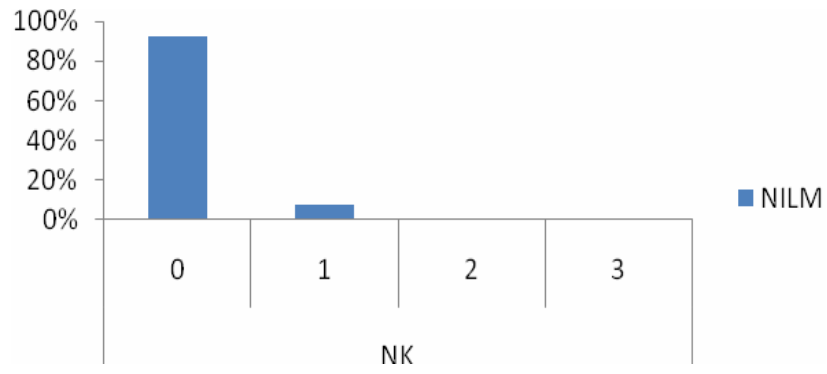


Figura 12 – Classificação das amostras de pacientes NILM negativas para o DNA de HPV, segundo a presença de células NK, (n=13). Obs: NK 0= negativo, NK 1= presença discreta, NK 2= quantidade moderada e NK 3= presença abundante.

6 DISCUSSÃO

Os processos malignos da cérvix uterina são atribuídos em sua maioria à infecção pelos tipos oncogênicos de HPV (BOSCH et al., 1995). O controle e a prevenção do câncer estão entre os mais importantes desafios da saúde pública do mundo atual. O câncer cervical é a segunda causa de morte, por câncer, mais comum em mulheres. São estimados aproximadamente 500 mil casos por ano, com quase 80% ocorrendo nos países em desenvolvimento (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2007).

Sabe-se que, com relação ao HPV, há forte associação entre a oncogênese e progressão neoplásica, relacionada ao controle da infecção pelo sistema imunológico. Entretanto, os mecanismos exatos que ativam uma resposta imune eficiente para a eliminação do HPV ainda não são conhecidos. Associação significativa entre o número de células imunocompetentes e o grau da Neoplasia Intra-epitelial Cervical foi encontrada. Este achado indica que a resposta imune local pode ser importante para o desenvolvimento e progressão do câncer cervical, principalmente em um estágio inicial do processo carcinogênico (TAKEHARA, 1996).

A análise por imunohistoquímica em amostras cervicais permitiu avaliar o perfil local da resposta imune, relacionando-o às alterações celulares detectadas pelo diagnóstico histopatológico e a carga viral. Com relação à presença das células CD4, verificou-se que a quantidade deste tipo de linfócito distribuiu-se quase que equitativamente entre as amostras NIC II, Carcinoma e NILM, ocorrendo significância estatística ($p=0,048$). Tais resultados divergem de estudo anterior, também realizado por imunohistoquímica, no qual foi encontrado que os linfócitos T CD4 diminuíam com o grau da lesão (MONNIER-BRENOIT et al., 2006).

Avaliando outros trabalhos que detectaram células CD4, foi observado o predomínio destas em lesões de baixo grau e associadas às lesões verrugosas (COLEMAN et al., 1994; MONNIER-BRENOIT et al., 2006; HONG et al., 1997). Estudos anteriores, em pacientes com deficiência de linfócitos T CD4, mostraram maior prevalência de HPV associado às lesões pré-invasivas e com maior progressão, demonstrando que a presença destas células seria importante para o controle da replicação viral e a supressão da transformação maligna (PALEFSKY, 1998; PETRY et al., 1994).

No presente estudo os resultados relativos à presença de células CD4 nas amostras NILM podem ser justificados pela presença inicial de CD4, em tecidos normais (fig.10). Por outro lado, a presença expressiva, destas células em lesões de alto grau (NIC II, III/ Carcinoma), pode ser explicada pela ativação da resposta imune em função da intensa replicação viral que ocorrem nestas situações.

A análise da distribuição de células T CD4 segundo a carga viral não revelou correlação estatística. Entretanto, como alguns estudos demonstram que a carga viral de pacientes de alto risco oncogênico, pode ser usada como marcador de progressão para lesão pré-cancerosa, a investigação da presença destas células em um número maior de amostras poderia elucidar melhor esta relação (TOZETTI, 2006; RABELO-SANTOS et al., 2005; SANTOS et al., 2003).

Ao avaliar a presença de células CD8 deve-se considerar que, para estas células estarem presentes já ocorreu o reconhecimento antigênico e ativação pelas células CD4. Este fato permite a produção de citocinas para o recrutamento das células CD8. Neste estudo a presença de células T CD8 aumentou com o grau da lesão ($p=0,028$), com predomínio nas amostras NIC II e III. Monnier-Brenoit et al. (2006) observaram elevada presença desses linfócitos em amostras NIC III, concordando com os achados do presente trabalho. Tais autores deduziram que o início da fase efetora da resposta imune poderia ocorrer em NIC III. Nas etapas anteriores, os sinais necessários para ativação das células CD8, tais como interleucina-2 (IL-2) e a presença de moléculas co-estimulatórias, poderiam estar ausentes. Lee e colaboradores (2004) demonstraram que a deficiência na produção de IL-2, tanto por células T CD8 como por células CD4, em pacientes com lesão cervical de alto grau, poderia limitar a expansão de clones de CD8 específicos para o HPV. Tal ocorrência pode prejudicar a capacidade das pacientes em sustentar respostas competentes mediadas por células.

A literatura aponta que em infiltrados linfocíticos de lesões pré-cancerosas, o número de CD4 parece ser maior que o número de CD8, demonstrando um perfil que favoreceria a regressão da lesão, enquanto o predomínio de CD8 poderia significar a persistência da infecção e risco de progressão da lesão para a forma maligna (EDWARDS et al., 1995). Tal achado pode ser explicado, pois a condição de presença de células CD8, mesmo em grande quantidade, mas na ausência ou na presença de pouca quantidade de células CD4, não permitiria a ativação adequada dos linfócitos T citotóxicos.

O predomínio das células CD8 nas alterações NIC II e III, com carga viral acima de 1 RLU/PCB, demonstra que seu surgimento ocorre na fase efetora da resposta imune, após existência da replicação viral e na presença de células CD4, as quais poderiam fornecer os elementos necessários a sua ativação. Portanto, o surgimento de maneira efetiva das células CD4 nas fases iniciais da infecção, na presença de alterações celulares de baixo grau e em baixa carga viral, asseguraria a presença mais precoce de células efectoras (T CD8) para eliminação do vírus.

Monnier-Brenoit et al. (2006) afirmaram que a quantidade de células T CD8 ultrapassou largamente a presença de células CD4 em amostras de cânceres invasivos. Considerando o mesmo tipo de lesão, e critério adotado de união dos parâmetros de observação celular, no presente estudo ocorreu o contrário, com 87,5% das amostras de carcinoma apresentando células CD4 em quantidade de moderada à abundante, enquanto que, apenas 50% destas mesmas amostras demonstram igual proporção de células CD8. Já Edwards et al. (1995), por outro lado, não encontraram diferenças na densidade de células T CD4 e CD8 nas lesões intra-epiteliais de baixo e alto grau.

As células NK predominaram, em pequena proporção, nas amostras NIC I e carcinoma. Menor quantidade de células NK tem sido descrita em condiloma acuminado e em lesões de baixo grau, quando comparada a quantidade observada em lesões de alto grau (SATAM; SURAIYA; NADKARNI, 1986). A progressão da lesão para a forma maligna costuma ser acompanhada pela resistência das células neoplásicas à lise pela célula NK, fato reversível através da imunoterapia (WU; COLEMAN; HIGGINS, 1994). A resistência das células neoplásicas à lise pode ocorrer pela diminuição da expressão de moléculas de classe I (MHC I), necessária à discriminação pela NK, da célula alvo ou mesmo pela produção de fatores supressores da NK (GEORGOPOULOS; PROFFITT; BLAIR, 2000). A modulação da resposta imune poderia, então, estimular a expressão de MHCI ou a produção de citocinas tóxicas para a célula alvo, por parte da NK.

A presença da NK, portanto, é de grande importância nas fases iniciais da infecção, quando a paciente apresenta baixa carga viral, nas fases que ainda não existe alteração celular ou esta é de baixo grau (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Neste estudo foi constatado que as células NK estavam presentes nas amostras com carga viral menor que 1000 RLU/PCB e apesar de em pequena quantidade, nas

lesões de baixo grau, permite sugerir uma tentativa de controle da progressão da infecção pela resposta imune.

A associação destes tipos celulares, CD4, CD8 e células NK com a carga viral, embora não tenha resultado em uma correlação estatística positiva, é algo inédito na literatura, não permitindo desta forma a comparação direta com outros estudos. Entretanto, a carga viral é utilizada amplamente na clínica para acompanhamento da infecção e como marcador para tratamento e possível progressão da lesão. Tal fato poderia permitir extrapolar estes dados para parâmetros que indiquem a possível presença destas células.

A análise isolada das amostras NILM, negativas para a pesquisa de DNA de HPV, demonstrou a presença de raras células NK, predomínio de linfócitos T CD4, poucos linfócitos T CD8, confirmando os achados da literatura que demonstram normalmente uma razão 2:1 de CD4 para CD8 em amostras normais (EDWARDS et al., 1995).

A avaliação entre a relação da presença de células efetoras da imunidade viral, com os diferentes tipos de lesões cervicais e a carga viral em pacientes infectadas pelo HPV, torna-se importante, pois traduz o grau de ativação do sistema imune e seu possível papel no controle da progressão neoplásica.

Os resultados deste estudo podem contribuir para melhor adequação da conduta clínica, para o acompanhamento e tratamento das pacientes, uma vez que dados como carga viral e grau da lesão levariam o clínico a pensar na eficiência ou não da resposta imune individual para a resolução da infecção. Comprovam-se também com esta pesquisa, que os tratamentos mais adequados seriam aqueles que têm por base a imunomodulação.

7 CONCLUSÕES

De acordo com o estudo realizado encontrou-se maior quantidade de células CD4 em amostras NIC II, carcinoma e NILM, com associação estatística significativa.

A presença de linfócitos T CD8 ocorreu em maior proporção nas amostras NIC II e III e em amostras cuja replicação viral estava ocorrendo.

As células NK prevaleceram nas amostras com lesões de baixo grau, carcinoma e em amostras com carga viral baixa.

As amostras NILM negativas para a pesquisa de DNA de HPV apresentaram proporções das células analisadas compatíveis com tecidos normais da cérvix uterina.

Apesar de não ter ocorrido relação estatística significativa entre presença de células CD4, CD8, NK e a carga viral, esta também poderá indicar ao clínico o início da resposta imune.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

BAYER SCHERING PHARMA BRASIL. **Tratamento do HPV**. Disponível em: <<http://www.bayerscheringpharma.com.br/site/homem/hpv/tratamentodohpv.fss>>. Acesso em: 10 de jan. 2010.

BELL, M. C.; EDWARDS, R. P.; PARTRIDGE, E. E.; KUYKENDALL, K.; CONNER, W.; GORE, H.; TURBAT-HERRARA, E.; CROWLEY-NOWICK, P. A. C. CD8+ T lymphocytes are recruited to neoplastic cervix. **Journal of Clinical Immunology**, New York, v. 15, n. 3, p. 130-136, 1995.

BEUTNER, K. R.; TYRING, S. Human papillomavirus and human disease. **The American Journal of Medicine**, Washington, v. 102, n. 5A, p. 9-15, May 1997.

BONTKES, H. J.; DE GRUIJL, T. D.; VAN DEN MUYSENBERG, A. J.; VERHEIJEN, R. H.; STUKART, M. J.; MEIJER, C. J.; SCHEPER, R. J.; STACEY, S. N.; DUQQAN-KEEN, M. F.; STERN, P. L.; MAN, S.; BORYSIEWICZ, L. K.; WALBOOMERS, J. M. Human papillomavirus type 16 E6/E7-specific cytotoxic T lymphocytes in women with cervical neoplasia. **International Journal of Cancer**, Hoboken, v. 88, n. 1, p. 92-98, Oct. 2000.

BOSCH, F. X.; MANOS, M. M.; MUÑOZ, N.; SHERMAN, M.; JANSEN, A. M.; PETO, J.; SCHIFFMAN, M. H.; MORENO, V.; KURMAN, R.; SHAH, K. V. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v. 87, n. 11, p. 796-802, June 1995.

BOSCH, F. X. Epidemiología de las infecciones por el papilomavirus humano: nuevas opciones para la prevención del cáncer cervical. **Salud Pública de Mexico**, Morelos, v. 45, n. 3, p. 326-339, feb. 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2009. Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/estimativa20091201.pdf>>. Acesso em: 04 dez. 2009.

CASTLE, P. E.; WACHOLDER, S.; LORINCZ, A. T.; SCOTT, D. R.; SHERMAN, M. E.; GLASS, A. G.; RUSH, B. B.; SCHUSSLER, J. E.; SCHIFFMAN, M. A prospective study of high-grade cervical neoplasia risk among human papillomavirus-infected women. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v. 94, n. 18, p. 1406-1414, Sept. 2002.

CASTRO, T. M. P. G.; NETO, C. E. R.; SCALA, K. A.; SCALA, W. A. Manifestações orais associada ao papilomavírus humano (HPV) conceitos atuais: revisão bibliográfica. **Revista Brasileira Otorrinolaringologia**, São Paulo, v. 70, n. 4, p. 546-550, jul./ago. 2004.

CHAOUKI, N.; BOSCH, F. X.; MUÑOZ, N.; MEIJER, C. J.; EI GUEDDARL, B.; EI GAHZI, A.; DEACON, J.; CATELLSAGUE, X.; WALBOOMERS, J. M. The viral origin of cervical cancer in Rabat, Morocco. **International Journal of Cancer**, Hoboken, v. 75, n. 4, p. 546-554, Feb. 1998.

CLIFFORD, G. M.; GALLUS, S.; HERRERO, R.; MUÑOZ, N.; SNIJDERS, P. J.; VACCARELLA, S.; ANH, P. T.; FERRECCIO, C.; HIEU, N. T.; MATOS, E.; MOLANO, M.; RAJKUMAR, R.; RONCO, G.; DE SANJOSÉ, S.; SHIN, H. R.; SUKVIRACH, S.; THOMAS, J. O.; TUNSAKUL, S.; MEIJER, C. J.; FRANCESCHI, S. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. **Lancet**, London, v. 366, n. 9490, p. 991-998, Sept. 2005.

COLEMAN, N.; BIRLEY, H. D.; RENTON, A. M.; HANNA, N. F.; RYAIT, B. K.; BYME, M.; TAYLOR-ROBINSON, D.; STANLEY, M. A. Immunological events in regressing genital warts. **American Journal of Clinical Pathology**, Chicago, v. 102, n. 6, p. 768-774, Dec. 1994.

COPE, J. U.; HILDESHEIM, A.; SCHIFFMAN, M. H.; MANOS, M. M.; LORINCZ, A. T.; BURK, R. D.; GLASS, A. G.; GREER, C.; BUCKLAND, J.; HELGESEN, K.; SCOTT, D. R.; SHERMAN, M. E.; KURMAN, R. J.; LIAW, K. Comparison of the hybrid capture tube test and PCR for detection on human papillomavirus DNA in cervical specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 35, n. 9, p. 2262-2265, Sept. 1997.

DUNN, A. E. G.; OGILVE, M. M. Intranuclear virus particles in human genital wart tissue: observations on the ultrastructure of the epidermal layer. **Journal of Ultrastructure Research**, New York, v. 22, n. 3, p. 282-295, Feb. 1968.

EDWARDS, R. P.; KUYKENDALL, K.; CROWLEY-NOWICK, P.; PARTRIDGE, E. E.; SHINGLETON, J.; MESTECKY, J. T. Lymphocytes infiltrating advanced grades of cervical neoplasia: CD8-positive cells are recruited to invasion. **Cancer**, New York, v. 76, n. 8, p. 1411-1415, 1995.

ELUF NETO, J. Epidemiologia das lesões relacionadas ao HPV no trato anogenital. In: BIBBO, M.; MORAES FILHO, A. (Org.). **Lesões relacionadas à infecção por HPV no trato anogenital**. Rio de Janeiro: Revinter, 1998. cap. 2, p. 9-27.

ELUF-NETO, J.; BOOTH, M.; MUÑOZ, N.; BOSCH, F. X.; MEIJER, C. J.; WALBOOMERS, J. M. Human papillomavirus and invasive cervical cancer in Brazil. **British Journal of Cancer**, London, v. 69, n. 1, p. 114-119, Jan. 1994.

FRANCO, E. L.; VILLA, L. L.; SOBRINHO, J. P.; PRADO, J. M.; ROUSSEA, M. C.; DESY, M.; ROHAN, T. E. Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. **The Journal of Infectious Diseases**, Boston, v. 180, n. 5, p. 1415-1423, Nov. 1999.

FRAZER, I. H. Interaction of human papillomaviruses with the host immune system: a well evolved relationship. **Virology**, Illinois, v. 384, n. 2, p. 410-414, Feb. 2009.

GEORGOPOLOS, N. T.; PROFFITT, J. L.; BLAIR, G. E. Transcriptional regulation of the major histocompatibility complex (MHC) class I heavy chain, TAP1 and LMP2 genes by human papillomavirus (HPV) type 6b, 16, and 18 E7 oncoproteins. **Oncogene**, New York, v. 19, n. 42, p. 4930-4935, Oct. 2000.

GIBSON, U. E.; HEID, C. A.; WILLIAMS, P. M. A novel method for real time quantitative RT-PCR. **Genome Research**, California, v. 6, n. 10, p. 995-1001, Oct. 1996.

GISSMANN, L.; ZUR HAUSEN, H. Human papillomavirus DNA: physical mapping and genetic heterogeneity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 73, n. 4, p. 1310-1313, Apr. 1976.

GONÇALVES, M. A.; DONADI, E. A. Immune cellular response to HPV: current concepts. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 8, n. 1, p. 1-9, Feb. 2004.

GRAVITT, P. E.; PEYTON, C. I.; ALESSI, T. G.; WHEELER, C. M.; COUPLÉE, F.; HILDSHEIM, A.; SCHIFFMAN, M. H.; SCOTT, D. R.; APPLE, R. J. Improved amplification of genital human papillomaviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, n. 1, p. 357-361, 2000.

GUZMÁN-ROJAS, L.; ALCOCER-GONZÁLEZ, J. M.; MADRID-MARINA, V. Perspectiva para El desarrollo de vacunas e inmunoterapia contra câncer cervicouterino. **Salud Publica de Mexico**, Morelos, v. 40, n. 1, p. 38-46, feb. 1998.

HILDESHEIM, A.; WANG, S. S. Host and viral genetics and risk of cervical cancer: a review. **Virus Research**, Atlanta, v. 89, n. 2, p. 229-240, Nov. 2002.

HO, G. Y. F.; BIERMAN, R.; BEARDSLEY, L.; CHANG, C. J.; BURK, R. D. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. **New England Journal of Medicine**, Massachusetts, v. 238, n. 7, p. 423-428, Feb. 1998.

HONG, K.; GREER, C. E.; KETTER, N.; VAN NEST, G.; PALIARD, X. Isolation and characterization of human papillomavirus type 6-specific T cells infiltrating genital warts. **Journal of Virology**, Knoxville, v. 71, n. 9, p. 6427-6432, Sept. 1997.

HOWLEY, P. Papillomaviridae: the viruses and their replication. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields virology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 2007. cap. 62, p. 2045-2076.

HUBBARD, R. A. Human papillomavirus testing methods. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, Northfield, v. 127, n. 8, p. 940-945, Aug. 2003.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Monographs on the evolution of carcinogenic risks to humans: human Papillomaviruses**. Lyon: IARC, 2007. (v. 90).

JACOBS, M. V.; WALBOOMERS, J. M.; VAN BEEK, J.; VOORHORST, F. J.; VERHEIJEEN, R. H.; MEIJER, C. J.; VAN DEN BRULE, A. J.; HELMERHOST, T. J.; SNIJDERS, P. J. A quantitative polymerases chain reaction-enzyme immunoassay for accurate measurements of human papillomavirus type 16 DNA level in cervical scarpings. **British Journal of Cancer**, London, v. 81, n. 1, p. 114-121, Sept. 1999.

JENSON, A. B.; ROSENTHAL, J. D.; OLSON, C.; PASS, F.; LANCASTER, W. D.; SHAH, K. Immunologic relatedness of papillomaviruses from different species. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v. 64, n. 3, p. 495-498, Mar. 1980.

JIMENEZ-FLORES, R.; MENDEZ-CRUZ, R.; OJEDA-ORTIZ, J.; MUÑOZ-MOLINA, R.; BALDERAS-CARRILLO, O.; DIAZ-SOBERANES, M. L.; LEBECQUE, S.; SAELAND, S.; DANERI-NAVARRO, A.; GARCIA-CARRANCA, A.; ULRICH, S. E.; FLORES-ROMO, L. High-risk human papilloma virus infection decreases the frequency of dendritic Langerhans' cells in the human female genital tract. **Immunology**, London, v. 117, n. 2, p. 220-228, Nov. 2005.

KADISH, A. S.; TIMMINS, P.; WANG, Y.; HO, G. Y.; BURK, R. D.; KETZ, J.; HE, W.; ROMNEY, S. L.; JOHNSON, A.; ANGELETTI, R.; ABADI, M. Regression of cervical intraepithelial neoplasia and loss of human papillomavirus (HPV) infection is associated with cell-mediated immune responses to an HPV type 16 E7 peptide. **Cancer Biomarkers and Prevention**, Washington, v. 11, n. 5, p. 483-488, May 2002.

KOBAYASHI, A.; GREENBLATT, R. M.; ANASTOS, K.; MINKOFF, H.; MASSAD, L. S.; YOUNG, M.; LEVINE, A. M.; DARRAGH, T. M.; WEINBERG, V.; SMITHMCCUNE, K. K. Functional attributes of mucosal immunity in cervical intraepithelial neoplasia and effects of HIV infection. **Cancer Research**, Philadelphia, v. 64, n. 18, p. 6766-6774, Sept. 2004.

KOBAYASHI, A.; MIASKOWSKI, C.; WALLHAGEN, M.; SMITH-MCCUNE, K. Recent developments in understanding the immune response to human papilloma virus infection and cervical neoplasia. **Oncology Nursing Forum**, v. 27, n. 4, p. 643-651, May 2000.

KOUTSKY, L. A.; HOLMES, K. K.; CRITCHLOW, C. W.; STEVENS, C. E.; PAAVONEN, J.; BECKMAN, A. M.; DE ROUEN, T. A.; GALLOWAY, D. A.; VERNON, D.; KIVIAT, N. B. A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. **New England Journal of Medicine**, Massachusetts, v. 327, n. 18, p. 1272-1278, Oct. 1992.

LEE, B. N.; FOLLEN, M.; SHEN, D. Y.; MALPICA, A.; STORTHZ, K. A.; SHEARER, W. T.; REUBEN, J. M. Deprimido tipo 1 citocina síntesis por superantígeno-CD4⁺ activado células T de mulheres com o papilomavírus humano-high-grade squamous relacionadas lesões intr-epiteliais. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 11, n. 2, p. 239-244, Mar. 2004.

LORINCZ, A. T.; CASTLE, P. E.; SHERMAN, M. E.; SCOTT, D. R.; GLASS, A. G.; WACHOLDER, S.; RUSH, B. B.; GRAVITT, P. E.; SCHUSSLER, J. E.; SCHIFMAN, M. Viral load of human papillomavirus and risk of CIN 3 or cervical cancer. **Lancet**, London, v. 360, n. 9328, p. 228-229, July 2002.

MCCANCE, D. J. Human Papillomaviruses. **Infectious Disease Clinics of North America**, Philadelphia, v. 8, n. 4, p. 751-767, Dec. 1994.

MCCANCE, D. J.; CAMPION, M. J.; CLARKSON, P. K. Prevalence of human papillomavirus type 16 DNA sequences in cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma of the cervix. **International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, Saint Louis, v. 92, n. 11, p. 1101-1105, Aug. 1985.

MELNICK, J. L. Papova virus group. **Science**, Washington, v. 135, n. 3509, p. 1128-1130, Mar. 1962.

MONNIER-BENOIT, S.; MAUNY, F.; RIETHMULLER, D.; GUERRINI, J.; CAPILINA, M.; FÉLIX, S.; SEILLES, E.; MOUGIN, C.; PRÉTET, J. Immunohistochemical analysis of CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subsets in high risk human papillomavirus-associated pre-malignant and malignant lesions of uterine cervix. **Gynecologic Oncology**, Saint Louis, v. 102, n. 1, p. 22-31, July 2006.

MOTTA, E. V.; FONSECA, A. M.; BAGNOLI, V. R.; RAMOS, L. O.; PINOTTI, J. A. Colpocitologia em ambulatório de ginecologia preventiva. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 47, n. 4, p. 302-310, out./dez. 2001.

MUÑOZ, N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. **Journal of Clinical Virology**, Daytona Beach, v. 19, n. 1-2, p. 1-5, Oct. 2000.

NORUSIS, M. J. **SPSS 10.0**: Guide to Data Analysis. Upper Saddle River, New Jersey: Prentice-Hall, 2000.

ORIEL, J. D. Natural history of genital warts. **British Journal of Venereal Diseases**, London, v. 47, n. 1, p. 1-13, Feb. 1971.

PALEFSKY, J. M. Human papillomavirus infection and anogenital neoplasia in human immunodeficiency virus-positive men and women. **Journal of the National Cancer Institute Monographs**, v. 1998, n. 23, p. 15-20, Apr. 1998.

PAPANICOLAOU, G. N.; TRAUT, H. F. Diagnosis of uterine cancer by the vaginal smear. **Archives of Internal Medicine**, Chicago, v.72, n. 5, p. 707, Nov. 1943.

PENN, I. Cancers of the anogenital region in renal transplant recipients: analysis of 65 cases. **Cancer**, Philadelphia, v. 58, n. 3, p. 611-616, Aug. 1986.

PETRY, K. U.; SCHEFFEL, D.; BODE, U.; GABRYSIK, T.; KOCHER, H.; KUPSEH, F. Cellular immunodeficiency enhances the progression of human papillomavirus-associated cervical lesion. **International Journal of Cancer**, Hoboken, v. 57, n. 6, p. 836-840, 1994.

PINTO, A. P.; TULIO, S; CRUZ, O. R. Co-fatores do HPV na oncogênese cervical. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 48, n.1, p. 73-78, jan./mar. 2002.

RABELO-SANTOS, S. H.; LEVI, J. E.; DERCHAIN, S. F.; SARIAN, L. O.; ZEFERINO, L. C.; MESSIAS, S.; MORAES, D. L.; CAMPOS, E. A.; SYRJÄNEN, K. J. DNA recovery from hybrid capture II samples stored in specimen transport médium with denaturing reagent, for the detection of human papillomavirus by PCR. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 126, n. 1-2, p.197-201, June 2005.

RICHART, R. M.; BARRON, B. A. A follow-up study of patients with cervical dysplasia. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, Irvine, v. 105, n. 3, p. 386-393, Oct. 1969.

ROMAGNANI, S. Human TH1 and TH2 subsets: regulation of differentiation and role in protection and immunopathology. **International Archives Allergy and Immunology**, Basel, v. 98, n. 4, p. 279-285, 1992.

ROSA, M. I.; MEDEIROS, L. R.; ROSA, D. D.; BOZZETI, M. C.; SILVA, F. R.; SILVA, B. R. Papilomavírus humano e neoplasia cervical. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 5, p. 953-964, maio 2009.

ROWSON, K.; MAHY, B. W. J. Human papova (wart) virus. **Bacteriological Reviews**, Washington, v. 31, n. 2, p. 110-131, June 1967.

SANTOS, R. T. M.; WAKAMATSU, A.; KANAMURA, C.; NONOGAKI, S.; PINTO, G. A. Procedimentos Laboratoriais em Imunohistoquímica e Hibridação "in situ". In: ALVES, V. A. F.; BACCHI, C. E.; VASSALO, J. **Manual de Imunohistoquímica**. 1. ed. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999. cap. 21, p. 237-259.

SANTOS, A. L. F.; DERCHAIN, S. F. M.; MARTINS, M. R.; SARIAN, L. O.; MARTINEZ, E. Z.; SYRJÄNEN, K. J. Human papillomavirus viral load in predicting high grade CIN in women with cervical smears showing only atypical squamous cells or low-grade squamous intraepithelial lesion. **São Paulo Medical Journal**, São Paulo, v. 121, n. 6, p. 238-243, Jan. 2003.

SATAM, M. N.; SURAIYA, J. N.; NADKARNI, J. J. Natural killer and antibody-dependent cellular cytotoxicity in cervical carcinoma patient. **Cancer Immunology and Immunotherapy**, New York, v. 23, n. 1, p. 56-59, 1986.

SEDER, R. A.; PAUL, W. E. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ cells. **Annual Review Immunology**, Palo Alto, v. 12, p. 635-673, 1994.

SOUTO, R.; FALHARI, J. P. B.; CRUZ, A. D. O Papilomavírus Humano: um fator relacionado com a formação de neoplasias. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 51, n. 2, p. 155-160, maio 2005.

STANLEY, M.; GISSMANN, L.; NARDELLI-HAEFLIGER, D. Immunobiology of human papillomavirus infection and vaccination-implications for second generation vaccines. **Vaccine**, Guildford, v. 26, supl. 10, p. K62-K67, Aug. 2008.

STEELE, J. C.; MANN, C. H.; ROOKES, S.; ROLLASON, T.; MURPHY, D.; FREETH, M. G.; GALLIMORE, P. H.; ROBERTS, S. T-cell responses to human papillomavirus type 16 among women with different grades of cervical neoplasia. **British Journal of Cancer**, London, v.93, n.2, p. 248-259, July 2005.

STRAUSS, M. J.; SHAW, E. W.; BUNTING, H.; MELNICK, J. L. "Crystalline" virus like particles from skin papillomas characterized by Intranuclear inclusion bodies. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, New York, v. 72, n. 21, p. 46-50, Oct. 1949.

TAKEHARA, K. Local immune responses in uterine cervical carcinogenesis. **Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi**, Tokyo, v. 48, n. 11, p. 1063-1070, Nov. 1996.

TINDLE, R. W. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. **Nature Reviews Cancer**, London, v. 2, n. 1, p. 59-64, Jan. 2002.

TOZETTI, I. A. **Correlação entre os resultados da citologia, captura híbrida, nested PCR PGMY/GP+ e PCR tipo-específico na infecção por papilomavírus humano**. 2006. 122 f. Tese (Doutorado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas/USP, São Paulo, 2006.

TOZETTI, I. A.; SCAPULATEMPO, I. D. L.; KAWSKI, V. L.; FERREIRA, A. W.; LEVI, J. E. Multiple types of human papillomavirus in cervical samples in women in Campo Grande, MS, Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 10, n. 5, p. 309-310, Oct. 2006.

VAN DER BURG, S. H.; PIERSMA, S. J.; JONG, A.; VAN DER HULST, J. M.; KWAPPENBERG, K. M. C.; VAN DEN HENDE, M.; WELTERS, M. J. P.; VAN ROOD, J. J.; FLEUREN, G. J.; MELIEF, C. J. M.; KENTER, G. G.; OFFRINGA, R. Association of cervical cancer with the presence of CD4⁺ regulatory T cells specific for human papillomavirus antigens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 104, n. 29, p. 12087-12092, July 2007.

VILLA, L. L. Aspectos moleculares da oncogênese por papilomavírus. In: BIBBO, M.; SILVA FILHO, A. M. **Lesões relacionadas à infecção por HPV no trato anogenital**. Rio de Janeiro: Revinter, 1998. p. 51-58.

VILLADA, I. B.; BARRACO, M. M.; ZIOL, M.; CHABOISSER, A.; BARGET, N.; BERVILLE, S.; PANIEL, B.; JULIAN, E.; CLERICI, T.; MAILLÈRE, B.; GUILLET, J. G. Spontaneous regression of grade 3 vulvar intraepithelial neoplasia associated with human papillomavirus-16-specific CD4⁺ and CD8⁺ T-cell responses. **Cancer Research**, Philadelphia, v. 64, n. 23, p. 8761-8766, Dec. 2004.

WAGNER, D.; IKENBERG, H.; BOEHM, N.; GISSMANN, L. Identification of human papillomavirus in cervical swabs by deoxyribonucleic acid in situ hybridization. **Obstetrics and Gynecology**, Washington, v. 64, n. 6, p. 767-772, Dec. 1984.

WEAVER, B. R. Epidemiology and natural history of genital human papillomavirus infection. **Journal of the American Osteopathic Association**, Chicago, v. 106, n. 3, supl 1, p. 2-8, Mar. 2006.

WHITE, H. D.; YEAMAN, G. R.; GIVAN, A. L.; WIRA, C. R. Mucosal immunity in the human female reproductive tract: cytotoxic T lymphocyte function in the cervix and vagina of premenopausal and postmenopausal women. **American Journal Reproductive Immunology**, Boston, v. 37, n. 1, p. 30-38, Jan. 1997.

WILEY, D.; MASONGSONG, E. Human papillomavirus: the burden of infection. **Obstetrical and Gynecological Survey**, Philadelphia, v. 61, supl. 6, p. 3-14, June 2006.

World Health Organization. WHO. **Human papillomavirus (HPV)**. Nov. 2009. Disponível em: <<http://www.who.int/immunization/topics/hpv/en/>>. Acesso em: 09 mar. 2010.

WU, R.; COLEMAN, N.; HIGGINS, G. Lymphocyte-mediated cytotoxicity to HPV 16 infected cervical keratinocytes. In: STANLEY, M. A. **Immunology of human papillomaviruses**. Plenum Press: New York, 1994, p. 255-259.

YAMAMOTO, L. S. U.; ALVES, V. A. F. Histórico. In: BIBBO, M.; MORAES FILHO, A. (Org.). **Lesões relacionadas à infecção por HPV no trato anogenital**. Rio de Janeiro: Revinter, 1998. cap. 1, p. 1-5.

ZANINI, M. **Verrugas**. Sociedade Brasileira de Cirurgia Dermatológica, 2008. Disponível em: <<http://www.sbcd.org.br/pagina.php?id=233>>. Acesso em: 10 jan. 2010.

ZUR HAUSEN, H. Human genital cancer: synergism between two virus infections or synergism between a virus infection and initiating events? **Lancet**, London, v. 2, n. 8312, p. 1370-1372, Dec. 1982.

ZUR HAUSEN, H.; MENHOF, W.; SCHEIBER, W.; BORNKAMM, G. W. Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. **International Journal of Cancer**, Heidelberg, v. 13, n. 5, p. 650-656, Jan. 1974.

ANEXO A – CARTA DE AUTORIZAÇÃO

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Comitê de Ética em Pesquisa /CEP/UFMS

*Carta de Autorização*

A minha assinatura neste documento, atesta que após a análise em Plenária do dia 04 de maio de 2009 o Comitê de Ética/CEP/UFMS acatou o pedido de registro para Banco de Material Biológico sob a responsabilidade da Pesquisadora Inês Aparecida Tozetti, conforme descrito na CI 03/2009 de 04 de maio de 2009.

Informamos que a utilização desse material fica autorizado pelo período inicial de 5(cinco) anos, ficando condicionado seu uso à submissão de protocolo de pesquisa específico ao CEP para cada novo procedimento, conforme Resolução nº 347, de 13 de janeiro de 2005- Conselho Nacional de Saúde, e que a incorporação de novos materiais biológicos deve estar vinculados aos seus respectivos Termo de Consentimento Livre e Esclarecido/TCLÉ.

Prof. Paulo Roberto Haidamus de Oliveira Bastos

Coordenador em exercício do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS

Campo Grande, 05 de junho de 2009.

Comitê de Ética da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
<http://www.propp.ufms.br/bioetica/cep/>
bioetica@propp.ufms.br
fone 0XX67 345-7187

ANEXO B – CARTA DE APROVAÇÃO



Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Comitê de Ética em Pesquisa /CEP/UFMS

*Carta de Aprovação*

A minha assinatura neste documento, atesta que o protocolo nº 1353 da Pesquisadora Daniella Borges Alves intitulado “Identificação “in situ” de linfócitos T CD4+ e CD8+ e células NK em lesões de alto e baixo grau em pacientes HPV infectadas em Campo Grande, MS”, foi revisado por este comitê e aprovado em reunião ordinária no dia 4 de junho de 2009, encontrando-se de acordo com as resoluções normativas do Ministério da Saúde.

Prof. Paulo Roberto Haidamus de Oliveira Bastos
Coordenador em exercício do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS

Campo Grande, 04 de junho de 2009.